

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

JULIANA CABRAL LEAL

**PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES NEUROKINÉRGICOS NK₁ NAS
ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS, OXIDATIVAS E
NEUROINFLAMATÓRIAS EM MODELOS ANIMAIS DE DOENÇA DE
ALZHEIMER E PARKINSON**

Recife

2022

JULIANA CABRAL LEAL

**PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES NEUROKINÉRGICOS NK₁ NAS
ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS, OXIDATIVAS E
NEUROINFLAMATÓRIAS EM MODELOS ANIMAIS DE DOENÇA DE
ALZHEIMER E PARKINSON**

Tese de Doutorado apresentada como um dos requisitos para o cumprimento parcial das exigências para obtenção do título de Doutor em Bioquímica e Fisiologia pela Universidade Federal de Pernambuco.

Orientador: Prof. Dr. Filipe Silveira Duarte

Recife

2022

Catálogo na Fonte:

Bibliotecária Elaine Cristina Barroso, CRB-4/1728

Leal, Juliana Cabral

Participação dos receptores neurocinérgicos NK1 nas alterações comportamentais, oxidativas e neuroinflamatórias em modelos animais de doença de Alzheimer e Parkinson / Juliana Cabral Leal. – 2022.

188 f.: il., fig., tab.

Orientador: Filipe Silveira Duarte

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia, Recife, 2022.

Inclui referências e anexo

1. Doenças neurodegenerativas 2. Antioxidantes 3. Envelhecimento da população I. Duarte, Filipe Silveira (orientador) II. Título.

616.83

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2022-082

JULIANA CABRAL LEAL

PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES NEUROKINÉRGICOS NK₁ NAS ALTERAÇÕES
COMPORTAMENTAIS, OXIDATIVAS E NEUROINFLAMATÓRIAS EM MODELOS
ANIMAIS DE DOENÇA DE ALZHEIMER E PARKINSON

Tese de Doutorado apresentada como um dos requisitos para o cumprimento parcial das exigências para obtenção do título de Doutor em Bioquímica e Fisiologia pela Universidade Federal de Pernambuco.

Data de aprovação: 31/03/ 2022.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Filipe Silveira Duarte (Orientador)

Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Belmira Lara da Silveira Andrade da Costa (Examinadora Interna)

Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Rubem Carlos Araújo Guedes (Examinador Interno)

Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Marcelo Duzzioni (Examinador Externo)

Universidade Federal de Alagoas

Prof. Dr. Axel Helmut Rulf Cofre (Examinador Externo)

Universidade Federal de Alagoas

Dedico esse trabalho aos meus colegas e familiares, sempre presentes em todas as etapas da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Professor Dr. Filipe Silveira Duarte, meu orientador, pela confiança, pelas oportunidades, ensinamentos e dedicação. É sem dúvida grande fonte de inspiração para mim e demais colegas do laboratório. Eternamente grata por todo o apoio.

Agradeço à Profa. Dra. Michelly Cristiny Pereira, por toda atenção, suporte e orientação durante esta trajetória. Deixo ainda minha gratidão às alunas, Silvia e Júlia, pela disponibilidade e ajuda nos experimentos.

Agradeço ao Prof. Dr. Marcelo Duzzioni e toda sua equipe da UFAL, em especial ao Neto e Fernanda, pela colaboração e suporte, sempre quando solicitados.

Agradeço à Gláucia e Joteli, por toda colaboração e parceria nos experimentos.

Agradeço à Polliany Mendonça, colega de laboratório, com quem dividi intensamente os experimentos. Obrigada pelas conversas, por compartilhar os momentos de alegria e angústias, e toda sua disponibilidade durante essa trajetória.

Agradeço aos demais colegas de laboratório, pela convivência, por toda ajuda prestada, pela parceria e palavras de incentivos.

Agradeço em especial a minha família por todo o apoio, o incentivo e amor incondicional, presentes ao meu lado em todos os momentos durante essa trajetória.

Agradeço também aos amigos que embora não tenham participado diretamente deste trabalho, vibram junto a mim a cada etapa concluída na minha vida.

Agradeço aos funcionários do Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFPE, pelo cuidado e zelo com os animais.

Agradeço a todos os professores do programa de Pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia da UFPE, pela qualidade do curso e por contribuírem na minha formação.

Agradeço aos demais funcionários e alunos do Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia, pelo auxílio técnico e disponibilidade em sempre ajudar.

Agradeço à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pelo apoio financeiro.

RESUMO

A doença de Alzheimer (DA) e Parkinson (DP) estão entre as doenças neurodegenerativas mais prevalentes e incapacitantes na população mundial. Estudos mostram que o dano neuronal progressivo subjacente à DA e DP está associado a processos envolvendo estresse oxidativo, neuroinflamação e neurodegeneração. Infelizmente o tratamento atual ainda é paliativo por ser incapaz de impedir e reverter a sua evolução. A neurocinina substância P (SP), o ligante endógeno dos receptores neurocinérgicos NK₁ (RNK₁), é um neuropeptídeo biologicamente ativo envolvido na neuromodulação. No entanto, a SP-RNK₁ vêm sendo apontados estar envolvidos em vários processos fisiopatológicos. No presente estudo, investigamos a possível participação dos RNK₁ para SP nas alterações comportamentais (cognitivas e motoras) e bioquímicas (marcadores de estresse oxidativo, neuroinflamação e apoptose neuronal) em modelos animais de DA e DP. Para isso, ratos Wistar adultos machos receberam por via intracerebroventricular (i.c.v.) a neurotoxina estreptozotocina (ETZ), para indução do modelo animal de DA esporádica, sendo investigados os efeitos do tratamento com o antagonista dos RNK₁ L-733,060 nas alterações cognitivas e bioquímicas induzidas pela ETZ. Em outros grupos experimentais, investigamos os efeitos do tratamento intraestriatal ou intranigral com L-733,060 nas alterações motoras e bioquímicas em um modelo de parkinsonismo induzido pela administração sistêmica de haloperidol ou de hemiparkinsonismo induzido pela infusão unilateral intraestriatal da neurotoxina 6-OHDA. Nossos resultados mostraram que o tratamento i.c.v. com L-733,060 aboliu o prejuízo cognitivo induzido pela ETZ em ratos avaliados no teste da esQUIVA inibitória e de reconhecimento de objetos. Nenhum dos tratamentos alterou as atividades exploratória e motora nos testes do campo aberto (CA) e da roda giratória (RR), respectivamente. A ETZ reduziu a atividade da CAT e aumentou os níveis de TBARS no córtex e hipocampo, assim como reduziu a SOD e aumentou o conteúdo de NOx no córtex. Essas alterações foram abolidas pelo tratamento repetido com L-733,060. Embora a ETZ *per se* não tenha modificado os indicadores de apoptose e neuroinflamação/neurodegeneração, o tratamento com L-733,060 aumentou o imunoc conteúdo da CASP-3 concomitantemente com uma redução da BAX no grupo que recebeu a neurotoxina. No modelo experimental de parkinsonismo farmacológico, nossos resultados mostraram que o tratamento com L-733,060 intraestriatal, mas não intranigral, diminuiu a catalepsia induzida pelo haloperidol. No modelo de hemiparkinsonismo induzido pela 6-OHDA, o tratamento com L-733,060 reverteu o prejuízo motor no CA, no RR e no teste de rotações contralaterais induzidas pela apomorfina. A 6-OHDA reduziu a CAT e SOD no estriado e substância nigra, efeito que foi revertido pelo L-

733,060. O antagonista dos RNK₁ *per se* aumentou a atividade da CAT e SOD e reduziu o conteúdo de NOx no estriado e substância nigra. A 6-OHDA reduziu o imunoc conteúdo de tirosina-hidroxilase (TH), porém este efeito não foi revertido pelo L-733,060. Os demais indicadores de apoptose e neuroinflamação não foram alterados pelos diferentes tratamentos. No modelo experimental de DA esporádica, nossos resultados sugerem que os RNK₁ para SP estão envolvidos nas alterações mnemônicas induzidas pela ETZ e que o antagonista dos RNK₁ exerce efeito neuroprotetor envolvendo atividade antioxidante e antiapoptótica. Nos modelos experimentais de DP, nossos resultados sugerem o envolvimento dos receptores RNK₁ nas alterações motoras e oxidativas induzidas pelo haloperidol ou pela neurotoxina 6-OHDA.

Palavras-chaves: L-733,060; antagonista NK₁; antioxidante; antiapoptótico;alzheimer; parkinson.

ABSTRACT

Alzheimer's (AD) and Parkinson's (PD) neurodegenerative diseases are among the most prevalent and disabling disorders in the world population. Studies show that progressive neuronal damage related to AD and PD involves oxidative stress, neuroinflammation and neurodegeneration. Unfortunately, the current treatment is still palliative as it cannot prevent and reverse its evolution. Substance P (SP), the endogenous ligand of NK₁ neurokinergic receptors (NK₁R), is a biologically active neuropeptide involved in neuromodulation. However, SP-NK₁R has been reported to be involved in several pathophysiological processes. In the present study, we investigated the possible participation of NK₁R in cognitive and motor behaviors and biochemical changes (markers of oxidative stress, neuroinflammation and neuronal apoptosis) in animal models of AD and PD. Thus, adult male Wistar rats received intracerebroventricular (icv) injection of the neurotoxin streptozotocin (STZ) to induce the AD animal model. Also, the effects elicited by the treatment with the NK₁R antagonist L-733,060 on STZ-induced cognitive and biochemical changes were investigated. In other experimental groups, we investigated the impact of intrastriatal or intranigral treatment with L-733,060 on motor and biochemical alterations in a model of parkinsonism induced by systemic haloperidol or hemiparkinsonism induced by unilateral intrastriatal infusion of neurotoxin 6-OHDA. We showed that treatment with L-733,060 abolished STZ-induced cognitive impairment in rats evaluated in the inhibitory avoidance and object recognition test. None of the treatments altered exploratory and motor activities in the open-field (OF) and rotarod (RR) tests, respectively. STZ reduced CAT activity, increased TBARS levels in the cortex and hippocampus, and reduced SOD and increased NO_x content in the cortex. These changes were abolished by repeated treatment with L-733,060. Although STZ per se did not change the apoptosis and neuroinflammation/neurodegeneration markers, treatment with L-733,060 increased CASP-3 immunocontent and reduced BAX in the neurotoxin group. Our results showed that intrastriatal but not intranigral treatment with L-733,060 decreases haloperidol-induced catalepsy in the experimental model of parkinsonism. In the 6-OHDA-induced hemiparkinsonism model, the treatment with L-733,060 reversed the motor impairment in the OF, RR and apomorphine-induced contralateral rotation test. 6-OHDA reduced CAT and SOD in the striatum and substantia nigra, an effect that was reversed by L-733,060. The NK₁R antagonist per se increased CAT and SOD activity and reduced NO_x content in the striatum and substantia nigra. 6-OHDA reduced the tyrosine hydroxylase immunocontent, but this effect was not reversed by L-733,060, while the other indicators of apoptosis and neuroinflammation were not altered by the different treatments. In

the experimental model of sporadic AD, our results suggest that NK₁R are involved in STZ-induced mnemonic alterations and that the NK₁R antagonist exerts a neuroprotective effect involving antioxidant and antiapoptotic activity. In experimental PD models, our results suggest the involvement of NK₁R in the motor and oxidative changes induced by haloperidol or the neurotoxin 6-OHDA.

Keywords: L-733,060; NK₁ antagonist; antioxidante; antiapoptotic; alzheimer; parkinson.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
1.1 OBJETIVOS.....	16
1.1.1 Objetivo geral.....	16
1.1.2 Objetivos específicos.....	16
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	18
2.1 ENVELHECIMENTO POPULACIONAL E DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS.....	18
2.1.1 Doença de Alzheimer (DA).....	20
2.1.2 Doença de Parkinson (DP).....	26
2.2 MODELOS ANIMAIS DE DOENÇA DE ALZHEIMER (DA) E PARKINSON (DP).....	33
2.2.1 Modelo animal de DA induzido pela estreptozotocina (ETZ).....	33
2.2.2 Modelo animal de parkinsonismo farmacológico induzido pelo haloperidol.....	34
2.2.3 Modelo animal de DP induzido pela 6-hidroxidopamina (6-OHDA).....	35
2.3 SUBSTÂNCIA P E RECEPTORES NEUROKINÉRGICOS NK ₁	37
2.4 NEUROINFLAMAÇÃO E NEURODEGENERAÇÃO.....	42
2.5 ESTRESSE OXIDATIVO.....	49
3 ARTIGO 1 - NEUROKININAS NAS DOENÇAS DE ALZHEIMER E PARKINSON: VILÕES OU HERÓIS? UMA REVISÃO BASEADA NA PESQUISA PRÉ-CLÍNICA.....	53
4 ARTIGO 2 - ANTAGONISTA DOS RECEPTORES NEUROKINÉRGICOS NK₁, L-733,060, EXERCE EFEITO PROTETOR CONTRA O DÉFICIT COGNITIVO, ESTRESSE OXIDATIVO E APOPTOSE INDUZIDOS PELA ADMINISTRAÇÃO CENTRAL DE ESTREPTOZOTOCINA EM RATOS WISTAR.....	94
5 ARTIGO 3 - ANTAGONISMO DOS RECEPTORES NEUROKINÉRGICOS NK₁ REVERTE O DÉFICIT MOTOR NO MODELO EXPERIMENTAL DE PARKINSONISMO INDUZIDO POR HALOPERIDOL E HEMIPARKINSONISMO INDUZIDO POR 6-HIDROXIDOPAMINA (6-OHDA) EM RATOS WISTAR.....	129
6 CONCLUSÃO.....	161
REFERÊNCIAS.....	162

ANEXO A - CÓPIA DO PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (CEUA-UFPE) 188

1 INTRODUÇÃO

O envelhecimento populacional, o aumento da expectativa de vida e a mudança do perfil demográfico são fenômenos mundiais que resultam no aumento da incidência e prevalência do número de casos de pessoas sofrendo de doenças crônico-degenerativas. Esses dados servem de alarme para a comunidade científica frente ao grande impacto proporcionado aos setores econômico, previdenciário, social e de saúde pública e privada (Miranda *et al.*, 2016).

Dentre as doenças neurodegenerativas mais prevalentes mundialmente estão a Doença de Alzheimer (DA) e a Doença de Parkinson (DP) (De Lau e Breteler, 2006; Prince *et al.*, 2016). No Brasil estima-se que há cerca de 1,2 milhões de casos da DA (Associação Brasileira de Alzheimer, ABRAz, 2020) e 250 mil casos da DP (Associação Brasileira de Parkinson, ABP, 2015). Aproximadamente 1-2% da população mundial com mais de 65 anos é afetada com a DP, e até 4–5% das pessoas com mais de 85 anos (De Lau e Breteler, 2006). Ambas as doenças são crônico-degenerativas, progressivas e ainda incuráveis, e levam ao comprometimento físico, mental e emocional, diminuem a qualidade de vida do paciente e de sua família, representando, portanto, um grande problema de saúde pública. Diante disso, pesquisadores de diversas partes do mundo vem cada vez mais investindo esforços e recursos a fim de melhor compreender os principais mecanismos envolvidos na fisiopatogenia da DA e DP, na perspectiva de desenvolvimento de fármacos inovadores e com maior eficácia.

A DA é a principal causa de demência entre os idosos, sendo caracterizada por alterações cognitivas (perda progressiva da memória e demais habilidades cognitivas), atrofia cerebral, perda neuronal, presença de placas senis, emaranhados neurofibrilares e alterações sinápticas no cérebro (Selkoe, 2001; Duyckaerts *et al.*, 2009). Estas alterações estão presentes principalmente em regiões cerebrais relacionadas a habilidades cognitivas, como córtex entorrinal, hipocampo e amígdala (Mattson, 2004). Já a DP é a segunda doença neurodegenerativa mais prevalente, causada pela degeneração de neurônios nigroestriatais responsáveis pela produção das monoaminas, como a dopamina, um dos principais neurotransmissores envolvidos na coordenação dos movimentos (Thornton e Vink, 2012). As características motoras da DP são tremor em repouso, bradicinesia, alta rigidez muscular e alterações do equilíbrio (Rodríguez-Oroz *et al.*, 2009). O achado histopatológico mais consistente com a DP é a perda de células pigmentadas da substância negra parte compacta (Rocha, 2004). Na DP, os astrócitos e as microglias são as principais células cerebrais envolvidas na neuroinflamação e morte de neurônios dopaminérgicos. As células gliais

correspondem a um eficiente sistema imune inato, e assim, sob condições patológicas, a desregulação ou ativação glial excessiva pode resultar na neurodegeneração (Liu e Hong, 2003; Ziegler-Heitbrock *et al.*, 2010). A micróglia, quando ativada, expressa vários receptores e moléculas de adesão, podendo entrar em replicação, aumentando em número, e, posteriormente, na persistência do estímulo, pode adquirir a capacidade de célula apresentadora de antígenos, fagocítica e pró-inflamatória, por meio da secreção de citocinas e quimiocinas (Trudler *et al.*, 2010). Sob condições inflamatórias, citocinas e quimiocinas favorecem a entrada de leucócitos do sangue periférico para o cérebro, especialmente linfócitos e monócitos (Kawanaka *et al.*, 2002; Wong *et al.*, 2012). Uma vez no cérebro, estas células podem comprometer diretamente neurônios dopaminérgicos, assim como ativar a microglia residente e astrócitos contribuindo indiretamente para a perda celular (Brochard *et al.*, 2009). O desequilíbrio entre sinais pró e anti-inflamatórios pode favorecer um processo inflamatório crônico, com ativação sustentada da microglia que, nestas condições, além de produzir citocinas pró-inflamatórias, passa a secretar espécies reativas de oxigênio (EROS), óxido nítrico e prostaglandinas, todos com alto potencial tóxico para os neurônios dopaminérgicos da substância negra. As EROS podem ocasionar apoptose neuronal pela disfunção mitocondrial e danos aos lipídios, proteínas e DNA (Blum, 2001). A neurodegeneração na DP, portanto, pode ser consequência da neuroinflamação mediada pela ativação das células microgliais. O aumento da expressão e dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1, IL-6 e TNF- α , já foi encontrado no líquido cefalorraquidiano, soro e em cérebros de pacientes com DP, bem como um aumento dos receptores solúveis para o TNF- α no soro dos pacientes (Choi *et al.*, 2007; Etemad *et al.*, 2012).

Na DA, tem sido proposto que uma ineficiente fagocitose da proteína A β por parte de células microgliais, e consequente hiperativação celular e liberação de mediadores pró-inflamatórios e fatores neurotóxicos, contribuiria de maneira decisiva no processo neurodegenerativo da doença (Akiyama *et al.*, 2000a,b). O recrutamento e/ou ativação de células gliais e leucócitos estão associados com altos níveis de mediadores inflamatórios no SNC, resultando em disfunções neurológicas. A inflamação ainda parece contribuir lesando diretamente as células e facilitando outros fatores de lesão, como edema e estresse oxidativo (Liao *et al.*, 2013). Também tem sido demonstrado um aumento nos níveis de diversos mediadores pró-inflamatórios (interleucinas, COX-2, EROS) no cérebro de pacientes com a DA (Galimberti *et al.*, 2003). O estresse oxidativo também desempenha papel central nas doenças neurodegenerativas, amplificando a resposta inflamatória, levando a um dano tecidual potencial, resultado do aumento da produção de EROS e de espécies reativas de

nitrogênio (ERNS) (Halliwell e Gutteridge, 1995, 1997; Ricciarelli *et al.*, 2007). O estresse oxidativo desempenha um papel muito importante, não apenas por causa da produção excessiva de EROS, mas também devido ao esgotamento do sistema antioxidante endógeno. Este aumento de vários oxidantes e seus derivados eleva a produção de EROS ao longo do tempo, causando uma exaustão dos sistemas enzimáticos antioxidantes (Özay *et al.*, 2017). O estresse oxidativo severo produz dano ao DNA, às proteínas e peroxidação lipídica, podendo resultar em injúria e morte celular (Halliwell, 1996). Os produtos provenientes da oxidação de constituintes importantes de neurônios foram reportados em pacientes com DP e DA. Este conjunto de evidências sobre o envolvimento dos processos neuroinflamatórios e do estresse oxidativo na DP e DA serve de estímulo para tentar identificar e compreender os mecanismos envolvidos na patogênese destas duas doenças tão incapacitantes, com a expectativa de identificar novas opções de tratamento, com maior eficácia e menor perfil de reações adversas frente ao tratamento atual.

A substância P (SP), uma das principais neurocininas endógenas, pertence à família das taucicinininas sendo amplamente distribuída tanto no Sistema Nervoso Central (SNC) quanto periférico (SNP). Sabe-se que a SP se liga preferencialmente ao receptor neurocinérgico NK₁ (RNK₁) acoplado à proteína G, cuja ativação regula inúmeras respostas fisiológicas, mas também patológicas, incluindo processos inflamatórios, aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE) e o desenvolvimento de edema (Leonard e Vink, 2013; Li *et al.*, 2019). Além disso, a SP é um potente iniciador da inflamação neurogênica, que difere da inflamação clássica por ser induzida neuralmente, e resulta em vasodilatação, extravasamento plasmático, edema tecidual, degranulação de mastócitos e aumento da permeabilidade da BHE através da liberação de neuropeptídeos (Lewis *et al.*, 2013; Corrigan *et al.*, 2016). As principais vias ativadas pelo complexo SP/RNK₁ envolvem a hidrólise do fosfoinositídeo, mobilização do cálcio e ativação da MAPK, as quais estão envolvidas na excitação neuronal, sobrevivência e migração celular, bem como na neuroinflamação (Rosso *et al.*, 2012; Martinez e Philipp, 2016). A SP é capaz de ativar o fator de transcrição nuclear kappa β (NF-kβ) que, por sua vez, afeta a regulação de vários genes inflamatórios, justificando seus efeitos promotores da quimiotaxia e outros mecanismos inflamatórios (Vilisaar *et al.*, 2015). Estudos recentes detectaram altos níveis de SP na substância nigra em modelos animais de DP. Pacientes com DA também apresentaram níveis elevados de SP no líquido cefalorraquidiano (LCR) (Martinez e Philipp, 2016). Sabe-se que a inibição da ligação da SP aos RNK₁ através do uso de antagonistas do RNK₁ exerce efeitos protetores em modelos experimentais de DP (Thornton e Vink, 2012), isquemia cerebral (Yu

et al., 1997), lesão da medula espinhal (Leonard e Vink, 2013) e traumatismo cranioencefálico (Li *et al.*, 2019). Considerando que os antagonistas não peptídicos dos RNK_1 possuem a capacidade de atravessar a BHE e exercer efeitos no SNC (Rosso *et al.*, 2012), cada vez mais os antagonistas dos RNK_1 vêm sendo utilizados como ferramenta farmacológica para melhor compreensão da fisiopatogenia de doenças relacionadas ao SNC, e como estratégia promissora para o tratamento futuro de condições neuroinflamatórias e neuroinfecciosas (Martinez e Philipp, 2016). Entretanto, o envolvimento da SP e dos seus receptores em modelos de neurodegeneração ainda permanece inconclusivo. Neste sentido, o presente trabalho se propôs investigar a possível participação dos receptores neurocinérgicos NK_1 para SP em modelos experimentais de DA e DP.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Investigar o envolvimento dos receptores neurocinérgicos NK_1 nas alterações comportamentais, oxidativas e neuroinflamatórias em modelos animais de Doença de Alzheimer e Parkinson.

1.1.2 Objetivos específicos

- Avaliar o envolvimento dos receptores neurocinérgicos NK_1 em um modelo animal de DA esporádica induzido pela administração central (i.c.v.) de ETZ, em ratos submetidos aos testes do campo aberto, roda giratória (*rotarod*), esquiiva inibitória (*step-down*) e de reconhecimento de objetos novos;
- Investigar a participação dos receptores neurocinérgicos NK_1 do estriado dorsal e substância nigra nas alterações motoras em um modelo de parkinsonismo farmacológico induzido por haloperidol;
- Avaliar o possível envolvimento dos receptores neurocinérgicos NK_1 do estriado dorsal em um modelo animal de DP induzido pela infusão intraestriatal da neurotoxina 6-OHDA, em ratos submetidos aos testes do campo aberto, roda giratória (*rotarod*) e rotações contralaterais induzidas por apomorfina;
- Analisar o possível envolvimento da neurodegeneração em ratos submetidos ao modelo animal de DA induzido pela ETZ, e estudar o possível efeito neuroprotetor do

antagonista de receptores NK_1 contra as ações da ETZ, utilizando o método histoquímico do Fluoro-Jade C (FJC);

- Mensurar os níveis de lipoperoxidação (TBARS), atividade das enzimas superóxido-dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona (GSH), nitrito/nitrato (NOx) no córtex e hipocampo de ratos submetidos ao modelo animal de DA induzido pela ETZ, e determinar a influência do tratamento com o antagonista de receptores NK_1 contra as ações da ETZ sobre os indicadores de estresse oxidativo;
- Mensurar os níveis de lipoperoxidação (TBARS), atividade das enzimas superóxido-dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona (GSH) e de nitrito/nitrato (NOx) no estriado e substância nigra de ratos submetidos ao modelo animal de DP induzido pela administração intraestriatal de 6-OHDA, e determinar a influência do tratamento com o antagonista de receptores NK_1 contra as ações da 6-OHDA sobre os indicadores de estresse oxidativo;
- Investigar eventuais alterações na expressão das proteínas caspase-1, caspase 3, BAX, IL-1 β e PAR-4 no hipocampo de ratos submetidos ao modelo animal de DA induzido pela ETZ, bem como a influência do tratamento com o antagonista de receptores NK_1 contra as ações da ETZ sobre os principais indicadores de apoptose neuronal e de neuroinflamação;
- Investigar eventuais alterações na expressão das proteínas tirosina hidroxilase (TH), caspase 1, caspase 3, IL-1 β e PAR-4 no estriado de ratos submetidos ao modelo animal de DP induzido pela 6-OHDA, bem como a influência do tratamento com o antagonista de receptores NK_1 contra as ações da 6-OHDA sobre os principais indicadores de apoptose neuronal e de neuroinflamação.

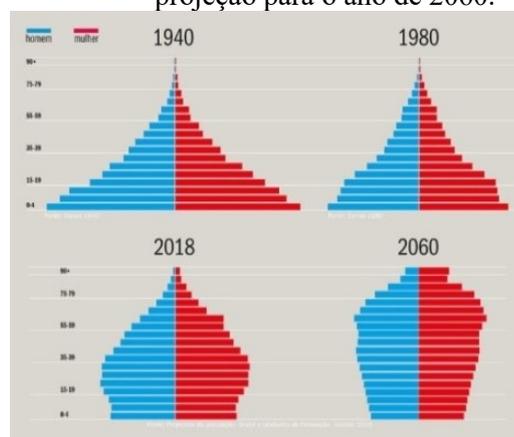
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 ENVELHECIMENTO POPULACIONAL E DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS

O envelhecimento populacional é um fenômeno global, que segundo diversos autores vêm se projetando a passos largos. O Programa Conjunto da União Europeia (UE) - Pesquisa sobre Doenças Neurodegenerativas (JPND) afirma que até o ano 2030, um quarto (25%) da população europeia terá mais de 65 anos, um aumento significativo em relação aos atuais 16% (JPND, 2017). Essa mudança demográfica é consequência do acentuado declínio na taxa de mortalidade e de fertilidade e do aumento da expectativa de vida observados, principalmente, a partir de meados do século XX (Lima-Costa, 2011), o que indica uma melhoria na qualidade de vida da população, mas por outro lado acarreta maiores custos aos serviços de saúde (Brito *et al.*, 2013).

Atualmente no Brasil observa-se um contingente cada vez mais significativo de pessoas com idade igual ou superior a 60 anos (Vasconcelos e Gomes, 2012). Dados populacionais do IBGE, 2015, apontam um crescimento do número de idosos em relação à população jovem, e estima-se a inversão da relação entre jovens e idosos, com 153 idosos para cada 100 pessoas menores de 15 anos. A relação entre a porcentagem de idosos e de jovens é chamada de “índice de envelhecimento”, que deve aumentar de 43,19%, em 2018, para 173,47%, em 2060. Esse processo pode ser observado graficamente pelas mudanças no formato da pirâmide etária ao longo dos anos, que segue a tendência mundial de estreitamento da base (menos crianças e jovens) e alargamento do corpo (adultos) e topo (idosos) (IBGE,2018).

Figura 1 – Pirâmide etária da população do Brasil entre os anos de 1940 e 2018 com projeção para o ano de 2060.



Fonte: IBGE, 2018.

A população brasileira já superou a marca dos 30,2 milhões em 2017, segundo a Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios Contínua - Características dos Moradores e Domicílios. E esse número tende a dobrar nas próximas décadas, segundo a Projeção da População, divulgada em 2018 pelo IBGE. Segundo projeções ainda, acredita-se que a população com mais de 80 anos pode chegar a 19 milhões de pessoas em 2060. Esse processo de envelhecimento da população vem acompanhado de alguns ônus como, internações hospitalares mais frequentes, aumento no tempo de ocupação do leito, mais incapacidades e maior carga de doenças nesta população, como as doenças crônicas e neurodegenerativas (Brito *et al.*, 2013). Segundo a Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia, 2016, observou-se uma redução das doenças do aparelho circulatório, respiratório e doenças endócrinas nutricionais e metabólicas; e por outro lado, identificou-se uma tendência crescente e significativa das neoplasias e as doenças crônicas não transmissíveis, sendo uma das principais prioridades na área da saúde no Brasil. As doenças crônico-degenerativas compreendem patologias progressivas e normalmente ainda incuráveis, que diminuem a qualidade de vida e podem levar ao comprometimento físico, mental e emocional do paciente. A doença neurodegenerativa é uma causa comum e crescente de mortalidade e morbidade em todo o mundo, particularmente em idosos. Tipicamente, as doenças neurodegenerativas são irreversíveis e associadas à perda de função (Katsnelson *et al.*, 2016). Os sinais fisiológicos típicos de condições neurodegenerativas são desmielinização, perda de dendritos e morte neuronal (Yaday *et al.*, 2013; Zis *et al.*, 2018). À medida que as estruturas neuronais se deterioram, ocorre uma perda gradual e progressiva das habilidades cognitivas (demência) e/ou habilidades motoras (ataxia), o que pode resultar em deficiência mental, perda funcional e debilitação (JPND, 2017). As doenças neurodegenerativas abrangem uma ampla gama de distúrbios com sintomas que variam de deterioração cognitiva na DA e demência do lobo frontal-temporal (FTLD), até o controle diminuído das funções motoras, conforme encontrado na esclerose lateral amiotrófica (ELA), doença de Huntington (HD) e DP. Para a maioria dessas doenças, a degeneração é restrita a populações neuronais específicas (Heemels, 2016). Formas de doenças neurodegenerativas incluem ainda atrofia muscular espinhal, doenças de príons, doenças do neurônio motor e ataxia espinocerebelar (JPND, 2017). Embora as doenças neurodegenerativas sejam mais prevalentes em idosos, elas podem ocorrer em pacientes de todas as idades (Pearce e Kromhout, 2013; Jette *et al.*, 2016; Montine, 2011). Dentre elas as mais prevalentes mundialmente são a DA e a DP (De Lau e Breteler, 2006; Prince *et al.*, 2016), motivo pelo qual escolhemos essas duas patologias para aprofundarmos.

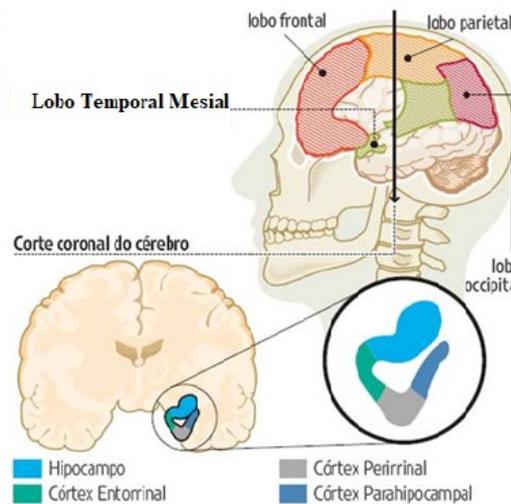
2.1.1 Doença de Alzheimer (DA)

A doença de Alzheimer (DA) descrita em 1907 por Alois Alzheimer, é a doença neurodegenerativa mais frequente, representando entre 60-80% de todos os casos de demência e afetando cerca de 35,6 milhões de pessoas em todo mundo (Reitz *et al.*, 2011; Mayeux e Stern, 2012). No Brasil, há cerca de 1,2 milhão de casos de pacientes com a DA (Associação Brasileira de Alzheimer, ABRAZ, 2020). Apesar da existência de casos em pessoas mais jovens, afeta principalmente os idosos. A prevalência da DA aumenta acentuadamente com o avanço da idade, com um aumento superior a 15 vezes relatado entre as idades de 65 e 85 (Evans *et al.* 1989; Mayeux e Stern 2012). Um estudo em uma comunidade nos EUA sugeriu que a prevalência é 50% mais alta em pessoas com mais de 85 anos (Evans *et al.*, 1989). A taxa de incidência também aumenta com a idade, dobrando a cada 5 anos; e a faixa de risco de 0,5% em indivíduos com idades entre 65 e 69 anos aumenta para 6% nos maiores de 85 anos (Jorm e Jolley 1998; Brookmeyer *et al.*, 1998; Mayeux e Stern 2012). Embora a idade represente o principal fator de risco para o desenvolvimento da DA, existe o envolvimento de outros fatores, entre eles merecendo destaque os fatores neurotróficos, a disfunção mitocondrial, o acúmulo de elementos neurotóxicos, o aumento da formação de radicais livres e/ou estresse oxidativo, as alterações no metabolismo energético e defeitos genéticos (Spire e Hyman, 2005). Alguns estudos mostram que o risco de desenvolver DA está relacionado ao histórico familiar. Por exemplo, caso um parente de primeiro grau tenha DA, isso aumentaria o risco em até 3,5 vezes de desenvolver a doença. O risco também aumenta em caso de mais parentes serem afetados. A DA raramente apresenta um padrão de herança autossômica dominante (1% dos casos), e quando isso ocorre, geralmente é causado por mutações em um dos três genes: presenilina 1 (PSEN1), que é o mais comum; presenilina 2 (PSEN2); ou proteína precursora de amiloide (APP). Essas formas genéticas normalmente ocorrem décadas antes da DA esporádica, ocorrendo antes dos 65 anos, por isso, sendo consideradas DA de “início precoce” (Ryman *et al.*, 2014). O gene APP está localizado no cromossomo 21, o que ajuda a justificar a relação entre a trissomia do 21 em pacientes com síndrome de Down e as elevadas taxas de DA de início precoce nesses indivíduos (Margallo-Lana *et al.*, 2004). O risco de desenvolver DA esporádica, também conhecida como DA de “início tardio” (forma mais comum da doença), está relacionado à presença de variantes alélicas específicas (e2, e3 e e4) da apolipoproteína polimórfica E (APOE), com a presença do alelo e4 associado ao maior risco de desenvolvimento da DA (Jarvik *et al.*, 1996). As apolipoproteínas (Apo) são proteínas plasmáticas, com a capacidade de se ligar a lipídeos e com a função de transportar

triglicerídeos e colesterol para os órgãos, sendo o colesterol liberado utilizado para apoiar a manutenção sinaptogênica e das conexões sinápticas (Pfrieger, 2003). O processo fisiopatológico da DA é marcado pela acentuada perda neuronal e diminuição das sinapses, e envolve fenômenos de estresse oxidativo e resposta inflamatória exacerbada, culminando na morte da célula neuronal. Ainda ocorre uma perda significativa de neurônios colinérgicos que reduz o conteúdo da acetilcolina, bem como alterações em receptores glutamatérgicos resultando em excitotoxicidade (Li *et al.*, 2011).

A DA se apresenta de duas formas diferentes. A DA típica, também conhecida como amnésica ou límbica, é caracterizada pelo início insidioso e pela perda gradual, progressiva e irreversível da memória. Esta forma normalmente se apresenta associada a outros declínios cognitivos (frequentemente da função visuoespacial e executiva) e pode ser acompanhada por mudanças no humor e do comportamento, conduzindo à dependência funcional (González e Pacheco, 2014). A amnésia observada na DA típica afeta principalmente a memória associada a eventos, tempos, lugares e emoções - e é geralmente mais evidente para memórias recentes no início da doença. Este padrão de perda mnemônica é resultante da disfunção em estruturas temporais mesiais, incluindo hipocampo (memória espacial) e amígdala (informações emocionais), e se manifestam de diversas maneiras. Os indivíduos podem colocar objetos em lugares errados, repetir conversas ou perguntas, ou ainda apresentar dificuldades em controlar datas e compromissos. As memórias que são processadas fora das áreas hipocampal e parahipocampal estão geralmente preservadas na DA típica (Markowitsch e Staniloiu, 2012). A forma atípica da DA inclui variantes que refletem disfunções externas às áreas temporais mesiais (região parieto-occipital posterior, frontal, motora e áreas da linguagem (Lee *et al.*, 2011; Dubois *et al.*, 2014; Sha e Rabinovici, 2016). As síndromes predominantes posteriores incluem uma variante occipitotemporal com déficits visuoperceptivos (por exemplo, rosto, objeto, reconhecimento de palavras) e uma variante biparietal com déficits visuoespaciais (por exemplo, apraxia) (McMonagle *et al.*, 2006; Alladi *et al.*, 2007). A variante frontal se apresenta com alterações comportamentais como apatia e desinibição (Ossenkoppele *et al.*, 2015b), enquanto a variante da linguagem se apresenta principalmente com dificuldades de recuperação de palavras e frases repetidas com pouca semântica e programas de fala motora (Gorno-Tempini *et al.*, 2011).

Figura 2 – Localização das principais regiões cerebrais acometidas pela doença de Alzheimer.

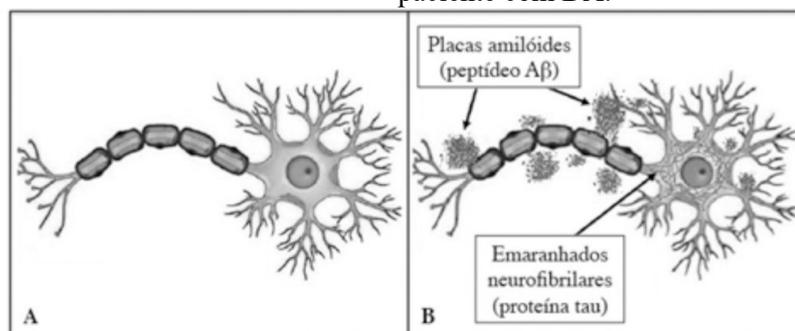


Fonte: Collucci, 2009.

Estudos de neuroimagem com a utilização da ressonância magnética estrutural em pacientes com DA mostraram atrofia em diversas estruturas cerebrais, como do hipocampo, temporal mesial e temporoparietal lateral (Baron *et al.*, 2001; Ishii *et al.*, 2005). O achado mais característico foi encontrado na região temporal mesial para a DA típica (Kantarci *et al.*, 2010; Whitwell *et al.*, 2012). O grau de atrofia observada pela técnica de ressonância magnética associado ao acúmulo de emaranhados neurofibrilares refletem a gravidade da doença (Silbert *et al.*, 2003; Whitwell *et al.*, 2008). A DA tem sido associada ao acúmulo intracelular da proteína Tau hiperfosforilada formando os emaranhados neurofibrilares, e pelo depósito extracelular dos peptídeos A β amilóides (A β) que formam as placas senis no cérebro (Querfurth e Laferia, 2010). A Tau é uma das principais proteínas microtubulares localizada principalmente nos axônios e corpos celulares neuronais, nos dendritos e células não neuronais, bem como nos astrócitos e oligodendrócitos. A principal função biológica da proteína Tau é a promoção da montagem microtubular e manutenção da estabilidade dos microtúbulos previamente formados, elementos essenciais para o transporte axonal dos neurônios. Quando a Tau está na sua forma hiperfosforilada, vários eventos cruciais ocorrem, incluindo: (i) perda da capacidade de promover a montagem de microtúbulos; (ii) ligação e sequestro da Tau normal (não fosforilada) dos microtúbulos; e (iii) promoção da automontagem da Tau não fosforilada em filamentos helicoidais emparelhados (Tanimukai *et al.*, 2009). Normalmente, os emaranhados neurofibrilares são vistos inicialmente no córtex entorrinal espalhando-se para o hipocampo e outras estruturas paralímbicas (por exemplo, núcleos basais do prosencéfalo, amígdala, núcleos talâmicos ântero-dorsal), para demais estruturas subcorticais e, finalmente, para as áreas pré-frontais. O córtex motor primário e

sensorial, bem como as áreas visuais tendem a acumular as placas senis apenas nos estágios mais tardios ao longo do curso da doença (Braak e Braak, 1991). As placas senis consistem em fibrilas formadas a partir da degradação proteolítica da proteína precursora amilóide (APP). A APP possui um domínio transmembrana, uma pequena cauda citoplasmática e um grande domínio extracelular (Yankner, 1996). A APP é fisiologicamente clivada pela enzima α -secretase formando o fragmento solúvel α APPs que está envolvido na estimulação da proliferação celular, na adesão ao substrato celular e crescimento de neuritos. Em pacientes com DA, a proteína APP é processada em um fragmento peptídico de 40-42 aminoácidos que inclui parte dos domínios transmembrana e extracelular. É este fragmento $A\beta$ que se encontra acumulado nas placas senis (Jordan-Sciutto e Bownser, 1998). Diferente da proteína Tau, a formação da placa $A\beta$ tende a ser mais irregular. Em geral, as placas $A\beta$ tendem a se formar inicialmente no neocórtex (frontal, temporal, occipital), sendo o hipocampo amplamente poupado. Estruturas subcorticais (incluindo o estriado, tálamo e hipotálamo) também acumulam peptídeos $A\beta$ amilóides (Braak e Braak, 1991). Diversos estudos demonstraram que a proteína Tau, normalmente solúvel, encontra-se hiperfosforilada em quadros de DA. Isto acaba tornando-a um polímero insolúvel filamentososo, o que parece desregular a cascata citoplasmática de fosforilações e desfosforilações. Diversos estudos indicam que o acúmulo de placas $A\beta$ pode ser o evento ativador da hiperfosforilação da proteína Tau (Selkoe, 1996; Selkoe *et al.*, 2012; Zheng *et al.*, 2002). Os emaranhados neurofibrilares constituídos pela proteína Tau hiperfosforilada são encontrados também em outras doenças neurológicas, sugerindo que estas alterações do citoesqueleto possam representar uma resposta secundária, embora de importância vital, a diversas lesões cerebrais (Blennow *et al.*, 2006; Weiner *et al.*, 2012).

Figura 3 - Diferenças esquemáticas entre um neurônio saudável e um neurônio de um paciente com DA.



Fonte: Falco *et al.*, 2016. Legenda: neurônio saudável (A) e um neurônio característico de um paciente com DA (B). As placas amiloides (placas senis) são depósitos patológicos extracelulares de peptídeos $A\beta$ -amilóides, enquanto os emaranhados neurofibrilares são depósitos patológicos intracelulares da proteína Tau hiperfosforilada.

Diversas hipóteses a respeito das bases moleculares da DA têm sido postuladas ao longo do tempo. A teoria mais antiga é representada pela hipótese colinérgica, proposta no início da década de 80, e que postula o envolvimento da disfunção colinérgica na amnésia do idoso com DA (Bartus *et al.*, 1982; Coyle *et al.*, 1983). Pesquisas a respeito do envolvimento do sistema colinérgico na DA mostraram diversas características importantes, como a diminuição da concentração da colina acetiltransferase (enzima responsável pela síntese da acetilcolina) no córtex e no hipocampo, assim como uma redução variável de neurônios colinérgicos localizados no núcleo basal de Meynert. Uma observação bastante pertinente foi a correlação positiva entre a depleção colinérgica e o grau de severidade do déficit cognitivo encontrada em pacientes em vida (Kása *et al.*, 1997). Já na metade da década de 80 foi proposta a hipótese glutamatérgica, também conhecida como "hipótese excitotóxica" (Greenamyre *et al.*, 1988). O glutamato, o principal neurotransmissor excitatório do SNC, tem sua atividade mediada por 3 tipos de receptores: N-metil-D-aspartato (NMDA), ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico (AMPA) e cainato. A hipótese glutamatérgica prevê que em condições específicas, como por exemplo, na alteração do metabolismo energético celular, ocorre uma ativação excessiva dos receptores NMDA, podendo alterar a homeostase dos níveis de cálcio, levando a um aumento intracelular deste metal que é capaz de iniciar o processo de apoptose (degeneração e morte) neuronal (Danysz *et al.*, 2000; Parsons *et al.*, 2007). Postula-se, portanto, que essa "excitotoxicidade" mediada pelo glutamato possa constituir um dos mecanismos patogênicos necessários para que o processo neurodegenerativo seja mantido e amplificado (Greenamyre e Young, 1989). Já a hipótese da "cascata amiloide", proposta em 1992, postula que o peptídeo A β e/ou os produtos da clivagem da proteína APP são neurotóxicos e podem levar à formação e acúmulo das placas senis, resultando na morte celular. A formação do peptídeo A β , constituído por 39-42 resíduos de aminoácidos, é o resultado da digestão normal (fisiológica) da APP, e parece exercer um papel fundamental nos fenômenos de neuroplasticidade (Hardy e Higgins, 1992; Haas *et al.*, 1992; Mattson, 1997). No entanto, outros fragmentos peptídicos com funções patológicas podem ser gerados, especialmente os peptídeos A β 1-40 e A β 1-42, que possuem alto potencial amiloidogênico e capazes de se agregarem e formarem placas insolúveis. Existem outras hipóteses, como a oligomérica e a metálica, que podem ser consideradas extensões da hipótese amiloide. A hipótese oligomérica postula que o peptídeo A β , além de formar fibrilas, também possui a capacidade de se agrupar em oligômeros solúveis. Esta forma oligomérica danifica as sinapses neuronais, reduzindo a plasticidade sináptica e levando à morte celular, embora o mesmo não ocorra com as fibrilas de A β (Beyreuther *et al.*, 1996; Lambert *et al.*,

1998; Bieschke *et al.*, 2012). Já a hipótese metálica é baseada em um número crescente de evidências que sugerem que os íons metálicos endógenos, especialmente aqueles com atividade redox, como o cobre (II) e ferro (III), além de certos íons não redox-ativos, como o zinco (II), possam contribuir para a evolução das doenças neurodegenerativas, favorecendo a agregação de A β e aumentando a sua toxicidade (Tougu *et al.*, 2008; Azimi e Rauk, 2011; Craddock *et al.*, 2012). A hipótese postulada mais recentemente correlaciona a DA com o diabetes, atribuindo o termo "diabetes tipo 3". Essa terminologia foi introduzida em 2005 por Suzanne de la Monte, cujo grupo de pesquisa examinou o tecido cerebral de pacientes com DA que vieram a óbito, e observaram que a patologia apresenta elementos dos diabetes tipo 1 e 2, ou seja, além da diminuição na produção de insulina, também é observada a resistência dos receptores da insulina, sugerindo que a DA possa ser uma doença neuroendócrina associada à uma disfunção na sinalização deste hormônio (Steen *et al.*, 2005; Rivera *et al.*, 2005). Do ponto de vista metabólico, o cérebro humano é altamente dependente da glicose, principal substrato utilizado para produção de energia. Em situações de escassez ou interrompimento do fornecimento do substrato, ou diante da incapacidade de metabolização da glicose, o cérebro se torna incapaz de proteger as sinapses e as células neuronais deixam de funcionar adequadamente, resultando nas alterações cognitivas. Essa hipótese, portanto, traz evidências da inter-relação entre o diabetes e a DA (Ferreira *et al.*, 2014; Lourenço *et al.*, 2015).

Ainda não existe um tratamento farmacológico comprovadamente capaz de curar a DA e as opções de fármacos atualmente disponíveis na clínica são direcionadas apenas para melhorar paliativamente os sintomas, na tentativa de retardar o avanço da doença e otimizar a qualidade de vida do paciente. Na DA ocorre uma redução significativa dos níveis de acetilcolina, um neurotransmissor amplamente distribuído pelo SNC e com papel fundamental nos processos cognitivos. A utilização de inibidores da enzima acetilcolinesterase, como a donepezila, rivastigmina e galantamina, eleva os níveis de acetilcolina ajudando na cognição (Olin e Schneider, 2001; Birks e Harvey, 2003; Birks *et al.*, 2015). Outro fármaco utilizado é a memantina, um antagonista dos receptores NMDA, que atua suprimindo a excitotoxicidade mediada pelo glutamato (Reisberg *et al.*, 2003; Howard *et al.*, 2012). Em alguns casos, a combinação de inibidores de acetilcolinesterase com a memantina pode trazer maior benefício em comparação ao tratamento realizado pela monoterapia. Além disso, os benefícios relativamente modestos desses tratamentos devem ser considerados juntamente com o potencial efeito colateral de cada opção (Erkkinen *et al.*, 2018). O último medicamento recentemente aprovado nos EUA pela *Food and Drug Administration* (FDA) para o

tratamento da DA foi o aducanumabe (Aduhelm[®]), um anticorpo monoclonal humano (imunoglobulina gama-1, IgG1) que tem como alvo molecular a causa subjacente da doença envolvendo a proteína A β -amiloide, apesar das controvérsias quanto a sua real eficácia e segurança (FDA, 2021).

Os sintomas neuropsiquiátricos são comuns na DA, e nestes casos, a abordagem não farmacológica é preferível, quando possível. Manifestações psiquiátricas podem responder ao tratamento sintomático padrão para DA, através do uso dos inibidores da acetilcolinesterase e/ou memantina, porém muitas vezes há a necessidade de tratamentos com outros psicofármacos (Erkkinen *et al.*, 2018). O uso dos inibidores seletivos da recaptção da serotonina (ISRS) com baixas propriedades anticolinérgicas (por exemplo, citalopram, escitalopram, fluoxetina) podem ajudar nos sintomas depressivos, ou ainda o uso de medicamentos antipsicóticos e reguladores do sono; no entanto, tais associações muitas vezes são evitadas devido à eficácia limitada e aumento do risco de mortalidade (Sink *et al.*, 2005; Seitz *et al.*, 2011). Em alguns casos, as intervenções não farmacológicas podem ajudar no tratamento da DA, como a reabilitação cognitiva (Woods *et al.*, 2012), exercícios regulares (Forbes *et al.*, 2015) e terapia ocupacional (Graff *et al.*, 2008).

O diagnóstico diferencial da DA inclui demência vascular, outras doenças neurodegenerativas (por exemplo, degeneração lobar frontotemporal, demência com corpos de Lewy), encefalopatias límbicas, deficiências de vitaminas e condições médicas gerais. A doença cerebrovascular e a DA se apresentam frequentemente em comorbidade, e distinguir suas relativas contribuições para o perfil cognitivo de um paciente pode ser desafiador. Outras condições médicas podem mimetizar alguns aspectos da DA, incluindo as anormalidades metabólicas (hipotireoidismo, distúrbios eletrolíticos), deficiências nutricionais (encefalopatia de Wernicke, pelagra, deficiência de B12), infecções (sífilis, vírus da imunodeficiência humana-HIV), efeitos colaterais de alguns medicamentos (benzodiazepínicos, anticolinérgicos), hidrocefalia de pressão normal, doenças psiquiátricas, entre outros. Outras causas de doença cérebro estrutural, como tumores de crescimento lento ou hematoma subdural crônica, raramente mimetizam a DA (Erkkinen *et al.*, 2018).

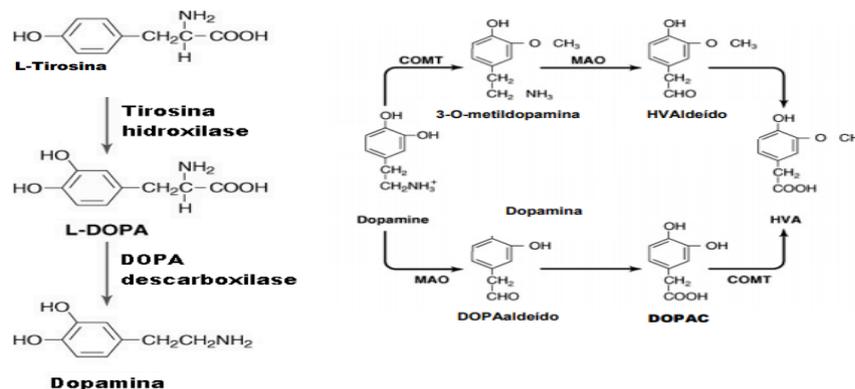
2.1.2 Doença de Parkinson (DP)

A DP é a segunda doença neurodegenerativa mais comum após a DA. A prevalência da DP também aumenta com a idade, com estimativas de 0,3% na população em geral, 1% nas pessoas com mais de 60 anos e 3% acima dos 80 anos (Miller e O'Callaghan, 2015). Em 2015, o número de indivíduos com mais de 50 anos com DP estava entre 4,1 e 4,6 milhões em

15 países analisados, incluindo o Brasil. Além disso, estimativas mostram que esse número possa dobrar por volta de 2030, atingindo entre 8,7 e 9,3 milhões (Dorsey *et al.*, 2007). No Brasil, a notificação da DP não é obrigatória, existindo apenas estimativas, portanto, não há dados oficiais sobre o número real de pacientes com a doença (Bovolenta e Felício, 2017). Uma estimativa não oficial sugere que existam 220.000 casos em todo o país (Bovolenta e Felício, 2017). Um estudo realizado no estado de Minas Gerais encontrou uma prevalência de 3,3% em idosos com idade ≥ 65 anos (Barbosa *et al.*, 2006). A taxa de incidência de DP é 8 a 18 indivíduos por 100.000 pessoas ao ano (Nussbaum e Ellis, 2003; de Lau e Breteler, 2006). O gênero masculino apresenta 1,5-2 vezes maior prevalência e incidência em relação ao feminino (Moisan *et al.*, 2016), com a idade de início nas mulheres sendo 2,1 anos após a dos homens, ou 53,4 anos contra 51,3 anos, respectivamente (Haaxma *et al.*, 2007). As mulheres apresentam sintomas mais leves, taxas mais altas de tremores (67% vs. 48% nos homens) e progressão mais lenta dos distúrbios motores.

A DP foi cientificamente descrita pela primeira vez em 1817 pelo médico inglês James Parkinson, em sua publicação intitulada “Ensaio da Paralisia Agitante”, nome originariamente dado à doença. No início do século XX, outros neurologistas estudaram a doença de forma mais aprofundada e sistemática, e a batizaram como DP em homenagem a sua primeira descrição (Menezes e Teive, 2003). A DP é irreversível, progressiva e de caráter neurodegenerativo (González e Pacheco, 2014). Com a progressão da doença, o paciente perde 50% a 70% de todos os neurônios dopaminérgicos na substância nigra, levando ao desenvolvimento progressivo dos sintomas motores, que representam a marca registrada da DP (Lees, 2007). A dopamina é uma catecolamina sintetizada a partir do aminoácido tirosina pela reação com a enzima tirosina hidroxilase (TH). A sua degradação é mediada pelas enzimas monoamino-oxidase (MAO) e catecol-o-metil-transferase (COMT), produzindo vários metabólitos, entre eles o ácido 3,4-diidroxifenilacético (DOPAC) e ácido homovanílico (HVA), conforme esquematizado na Figura 5 (Kandel *et al.*, 2000; Siegel *et al.*, 2006).

Figura 5 – Esquema da síntese e degradação da dopamina.



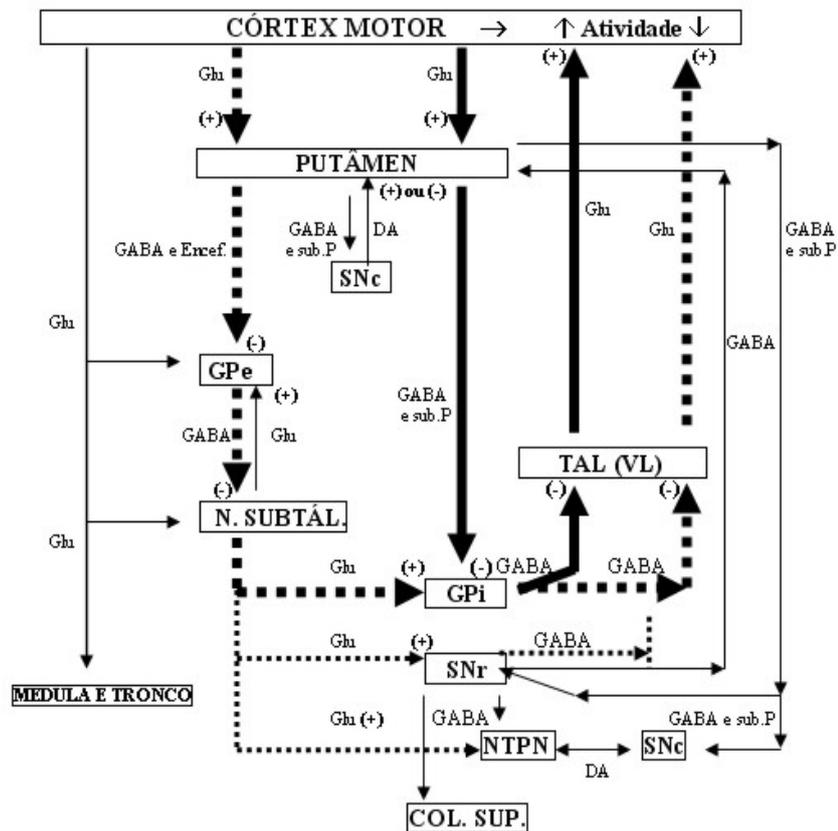
Fonte: Siegel *et al.*, 2006. Legenda: A biossíntese da dopamina ocorre em etapas catalisadas por enzimas específicas a partir do aminoácido tirosina. Na primeira etapa observa-se a hidroxilação da tirosina com formação da L-DOPA (3,4-dihidroxi-L-fenilalanina). Em seguida, ocorre a descarboxilação da L-DOPA formando a dopamina. A dopamina é inativada pelo transportador de recaptação, que por sua vez, é degradada pela COMT (catecol-o-metil transferase) e pela MAO-B (monoamino-oxidase-B), com a formação dos metabólitos DOPAC e ácido homovalínico (HVA).

Os efeitos da dopamina são mediados pela interação com receptores metabotrópicos (acoplados à proteína G) das famílias D1 e D2, sendo que os D1 ativam a cascata de síntese do AMPc, enquanto os D2 inibem a adenilil ciclase, desta forma modula os gânglios da base através de seu efeito nesses receptores (Siegel *et al.*, 2006). Os gânglios da base são componentes do sistema nervoso constituído por 5 núcleos: o caudado, o putâmen, o globo pálido, o núcleo subtalâmico e a substância negra. Apesar de separados por uma cápsula interna, o núcleo caudado e putamen formam um único núcleo, chamado de estriado, devido à semelhança da estrutura histológica. A substância negra é dividida em porção compacta (SNc) e porção reticulada (SNr). Esses núcleos estão situados em diferentes regiões do sistema nervoso e que tem conexões entre si e participação no mesmo sistema funcional de controle motor (Parent e Hazrati, 1995a, 1995b; Mello e Villares, 1997). Segundo Brooks (1995), há participação destes núcleos no planejamento e execução dos movimentos voluntários pela integração com regiões corticais. Estudos mostram que lesões nos núcleos da base podem causar distúrbios do movimento como a DP. A SNc, junto com a área tegmental ventral (VTA), no mesencéfalo, são as principais áreas com elevada concentração de neurônios dopaminérgicos. Os neurônios da SNc e da VTA deixam o mesencéfalo principalmente pelo feixe prosencefálico medial formando as três vias dopaminérgicas principais: nigroestriatal, mesocortical e a mesolímbica. A via nigroestriatal é responsável pela modulação dos núcleos da base, um grupo de estruturas subcorticais que modula os impulsos córtico-espinhais para início dos movimentos (Obeso *et al.*, 2000). O córtex envia projeções glutamatérgicas ao estriado, que é a principal porta de entrada dos núcleos da base. O estriado envia projeções GABAérgicas a outros núcleos, como o globo pálido e a SNr. Esses núcleos modulam o tálamo, que por sua vez, envia projeções glutamatérgicas estimulatórias de volta ao córtex, facilitando com maior ou menor intensidade o início do movimento (Obeso *et al.*, 2000; Gerfen, 2004). Essa modulação é realizada pelo balanço entre dois circuitos que ligam o estriado ao globo pálido, a via direta e a via indireta. A dopamina estimula a via direta e inibe a via indireta. Os receptores D1 modulam principalmente as fibras da via direta, enquanto os D2 são localizados em neurônios estriado-palidais da via indireta. Com isso, a ativação de D1 ativa a via excitatória e a ativação de D2 inibe a via inibitória (Obeso *et al.*, 2000; Gerfen,

2004; Siegel *et al.*, 2006). Desta forma ela funciona como um modulador dos núcleos da base, pois quando liberada no estriado facilita o movimento. Isso explica a lentidão de movimentos e a rigidez muscular do paciente parkinsoniano, já que a morte dos neurônios nigroestriatais causa a depleção dopaminérgica no estriado, o que causa a dificuldade de se movimentar. Por outro lado, o excesso de dopamina ou a supersensibilização de receptores dopaminérgicos no estriado causa aumento dos movimentos, fazendo com que esses sejam executados de forma descontrolada, como no caso de discinesias, causada pelo tratamento com agonistas dopaminérgicos, ou da Coréia de Huntington (Obeso *et al.*, 2000; Gerfen, 2004; Siegel *et al.*, 2006).

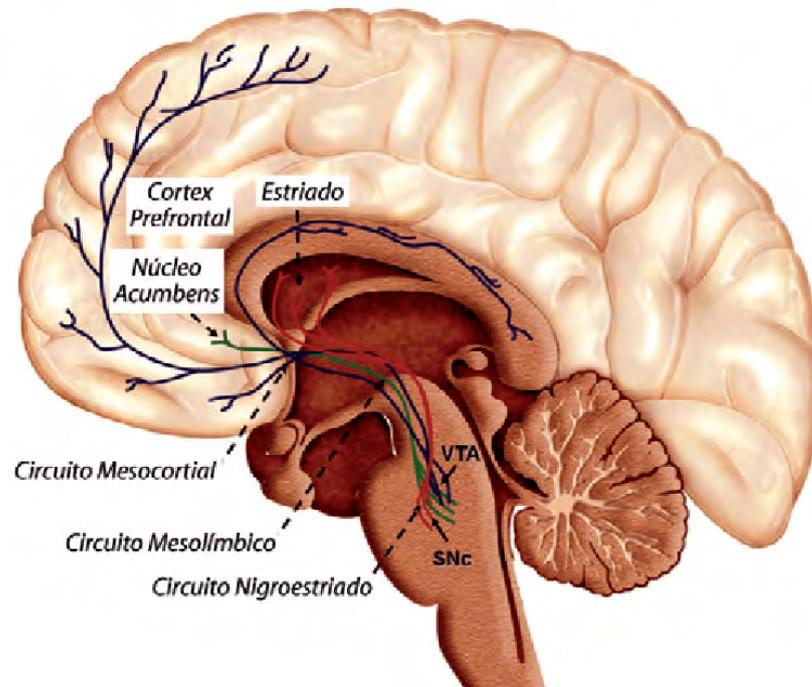
Figura 6 – Circuito motor: esquema simplificado das vias direta e indireta.

Legenda: Via Direta — / Via indireta - - - / Vias Secundárias —



Fonte: MA,T.P. The Basal Ganglia, 1997. Legenda: A via direta (setas cheias) fornece informações do corpo estriado para o globo pálido interno (GPI) e substância nigra reticulada (SNr), através de projeções inibitórias GABAérgicas. Essa inibição libera o disparo dos neurônios talamocorticiais para iniciar o movimento. A ativação da via direta, portanto, desinibe o tálamo para facilitar o movimento. Na via indireta (setas pontilhadas), os neurônios do globo pálido externo (GPe) enviam fibras inibitórias GABAérgicas para o núcleo subtalâmico que, por sua vez, envia fibras excitatórias Glutamatérgicas para o GPI e SNr. O GPe inibe tonicamente o núcleo subtalâmico. Quando a via indireta é ativada, as projeções estriado-GPe vão inibir o GPe, que então reduz sua inibição sobre o núcleo subtalâmico, permitindo que esse último núcleo ative os núcleos de saída. Quando o GPI/SNr estão ativados, eles inibem o tálamo e assim impedem que o tálamo facilite o movimento. Portanto, a via indireta, ao contrário da direta, inibe o movimento.

Figura 7 – Vias dopaminérgicas.



Fonte: Leiva e Tirapu-Ustárroz, 2017. Legenda: A via nigroestriatal inicia na substância negra e vai até o estriado (região formada pelos núcleos caudado e putâmen). Esta via possui 80% da dopamina do cérebro e está envolvida com os movimentos motores e intencionais. A via mesolímbica inicia na VTA (área tegmental ventral) e vai até o núcleo accumbens. Esta via está associada com as sensações de prazer, motivação e sintomas de alucinação. A via mesocortical também começa na região VTA e vai até o córtex pré-frontal, e está envolvida com os pensamentos orientados por metas, com o julgamento e a tomada de decisões.

A DP apresenta dois grandes grupos de sintomas, os motores e os não motores. Os sintomas motores cardinais da DP incluem bradicinesia, tremor de repouso, rigidez e instabilidade postural; outras características do motor incluem hipomímia, hipofonia, disfagia, mudanças na visão, micrografia, postura curvada e congelamento da marcha, entre outros (Ehringer e Homykiewi, 1960). As características não motoras incluem a disautonomia (constipação, ortostase e disfunção esfíncteriana), distúrbios do sono (insônia, parassonias comportamentais do sono REM), transtornos do humor, anosmia, alterações cognitivas e sensoriais, todos os quais podem impactar negativamente a qualidade de vida do paciente (Zhang *et al.*, 2016). Existem relatos descrevendo pacientes com sintomas depressivos e déficit de memória que posteriormente desenvolveram sintomas parkinsonianos, o que alimenta a hipótese de que estas deficiências sejam ocasionadas pelo mau funcionamento em sistemas neuronais comuns (Menezes e Teive, 2003). Pacientes mais jovens com DP (início antes dos 40 anos de idade) são mais propensos a apresentarem tremores, rigidez e distonia, e os sintomas apresentados tendem a progredirem mais lentamente, enquanto os pacientes com

PD de início tardio apresentam mais frequentemente o comprometimento cognitivo e progridem mais rapidamente (Jankovic *et al.*, 1990; Jankovic e Kapadia, 2001; Thenganatt e Jankovic, 2014). O declínio cognitivo na DP é variável. Entre 19% e 38% dos pacientes relatam sintomas de comprometimento cognitivo leve nos estágios iniciais da DP (Litvan *et al.*, 2011). Já pacientes com DP com mais de 10 anos de duração da doença, a prevalência de sintomas cognitivos e demência é maior que 75%, aumentando conforme a progressão da doença (Healy *et al.*, 2008).

A característica patológica central da DP é a perda de neurônios dopaminérgicos na substância nigra parte compacta, enquanto a característica microscópica são os corpos de Lewy (CLs), que são inclusões intracitoplasmáticas neuronais lameladas e eosinofílicas de agregados fibrilares insolúveis, que incluem α -sinucleína e ubiquitina. Embora os sintomas motores resultem da perda neuronal na substância nigra, este não é o sítio inicial envolvido. A distribuição anatômica e a disseminação dos CLs por toda parte do SNC é descrito por Braak *et al.*, (2003), e começa na parte dorsal dos núcleos motores do vago se projetando para o tronco cerebral e, finalmente, para o córtex. A α -sinucleína também é encontrada em processos neuronais (neuritos de Lewy), bem como em astrócitos e células oligodendrogliais na DP (Kalia e Lang, 2016). Embora a maioria dos casos de DP sejam considerados esporádicos, a genética tem sua importância. Por exemplo, pacientes com DP tem 2 vezes mais chances de ter um parente de primeiro grau com a doença (Marder *et al.*, 1996). Formas familiares raras de DP com herança autossômica dominante e recessiva já foram descritas. Vários genes foram associados a formas monogênicas da doença, incluindo a quinase 2 de repetição rica em leucina (LRRK2), α -sinucleína (SNCA) (Polymeropoulos *et al.*, 1997), parkina, quinase-1 putativa - induzida por homólogo fosfatase e tensina (PINK-1), DJ-1, ATPase tipo 13A2 (ATP13A2), PLA2G6, FBX07, VPS35 e DCTN1 (Singleton *et al.*, 2013). Dentre esses, as mutações LRRK2 são as mais comuns e são encontrados em 5-15% dos casos de parkinsonismo familiar (Gasser *et al.*, 2011). As mutações da parkina estão associadas ao início precoce da doença e são responsáveis por quase metade da doença forma familiar recessiva com início antes dos 45 anos (Singleton *et al.*, 2013).

O diagnóstico de DP é feito exclusivamente com base em sintomas clínicos (bradicinesia, tremor de repouso, rigidez e instabilidade postural). Exames complementares como a ressonância magnética (RM) são normais em pacientes com DP. Normalmente a RM é usado principalmente para avaliar estruturas (por exemplo, doenças vasculares, tumor, etc) e outras doenças neurodegenerativas (por exemplo, atrofia sistema múltiplo, DA) (Erkinen *et al.*, 2018). Não há líquido cefalorraquidiano específico ou testes de laboratório para DP

idiopática, mas alterações em alguns marcadores de sangue ou LCR mostraram se correlacionar com sintomas de DP (Chen-Plotkin *et al.*, 2011; Kang *et al.*, 2013). A utilização da RM, outros exames de imagem e testes de laboratório limitam-se a sua utilização apenas para excluir outras condições (diagnóstico diferencial) (Rizek *et al.*, 2016). Dentre as patologias a serem diferenciada incluem distúrbios vasculares (infarto estriatal); induzido por drogas (por exemplo, neurolépticos, antieméticos); metabólica (Wilson, neuroacantocitose, doença hepática); infecciosa (HIV, sífilis, CJD); tóxico (por exemplo, monóxido de carbono); hidrocefalia de pressão normal, tremor essencial e outras formas de doenças neurodegenerativas (Erkkinen *et al.*, 2018).

O tratamento farmacológico tem por foco as alterações motoras da DP e age aumentando a sinalização da dopamina por mecanismos envolvendo a substituição direta (por exemplo, levodopa), agonismo do receptor de dopamina (por exemplo, pramipexol, lisurida, pergolida, rotigotina, ropinirol) e a redução do metabolismo de dopamina via inibição da monoamino-oxidase-B (MAO-B) (por exemplo, selegilina e rasagilina) ou inibição da catecol-o-metiltransferase (COMT) (por exemplo, entacapona). Os anticolinérgicos (por exemplo, trihexifenidil, benztropina e biperideno) são eficazes para pacientes com fenótipo de Parkinson com predomínio dos tremores. Esses medicamentos apresentam maior eficácia nas fases iniciais da DP, e efeitos adversos como flutuações motoras (fenômenos "liga-desliga") e discinesias muitas vezes se desenvolvem em estágios posteriores após o tratamento em longo prazo (Rizek *et al.*, 2016).

A estimulação cerebral profunda (ECP) pode aliviar as flutuações motoras e discinesias em pacientes com a doença avançada ou refratários ao tratamento farmacológico. A ECP fornece benefício adicional para os tremores, rigidez e bradicinesia, e em menor grau para a marcha e o equilíbrio, podendo inclusive piorar a cognição (particularmente fluência verbal) (Fasano *et al.*, 2012). Eletrodos colocados no globo pálido interno ou núcleo subtalâmico regulam impulsos neurais anormais, aliviando assim sintomas motores (Follett *et al.*, 2010; Odekerken *et al.*, 2016). A ECP pode reduzir a dose ou os efeitos adversos dos medicamentos para DP, mas complicações como hemorragia, infecção e migração de chumbo devem ser considerados durante a tomada de decisão sobre o tratamento pela ECP (Lyons *et al.*, 2004; Guridi *et al.*, 2012; Pouratian *et al.*, 2012). Tratamentos não farmacológicos como terapia ocupacional, física e da fala também devem ser considerados, dependendo dos sintomas do paciente.

2.2 MODELOS ANIMAIS DE DOENÇA DE ALZHEIMER (DA) E PARKINSON (DP)

2.2.1 Modelo animal de DA induzido pela estreptozotocina (ETZ)

A ETZ, uma glicosamina derivada de nitrosuréia, é seletivamente tóxica às células produtoras/secretoras de insulina, sendo utilizada para a indução do modelo animal de Diabetes mellitus (DM) quando administrada por via sistêmica em ratos (Szkudelski, 2001). No entanto, foi observado que a ETZ em baixas doses por via intracerebroventricular (ICV) não provoca alteração dos níveis basais de glicose na corrente sanguínea e nem induz a DM, mas altera o metabolismo de glicose encefálico. Evidências apoiam o conceito de que o estado cerebral resistente à insulina (ECRI) e o hipometabolismo de glicose cerebral podem representar o principal núcleo patológico da DA esporádica (Chen e Zhong, 2013; De Felice *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2014a). ECRI é uma condição molecularmente caracterizada pela resposta reduzida à sinalização de insulina via receptor de insulina - fosfatidilinositol-3 quinase (PI-3K) no cérebro. A insulina cerebral exerce papel neurotrófico, neuroprotetor e neuromodulador, enquanto o ECRI leva à neurodegeneração e comprometimento cognitivo em modelos animais de DA (Agrawal *et al.*, 2011; Barilar *et al.*, 2015; Knezovic *et al.*, 2015). A infusão de ETZ-ICV em ratos induz déficit progressivo da aprendizagem e memória (Saxena *et al.*, 2008; Knezovic *et al.*, 2015), alterações neuroquímicas e neuropatológicas análogas àquelas encontradas em pacientes com DA (Salkovic-Petrisic e Hoyer, 2007), diminuição da transmissão colinérgica (Agrawal *et al.*, 2009; Biasibetti *et al.*, 2017), estresse oxidativo (Sharma e Gupta, 2001; Prakash *et al.*, 2015), neuroinflamação (Kraska *et al.*, 2012; Biasibetti *et al.*, 2017), hiperfosforilação da Tau e alterações neurofibrilares iniciais (Barilar *et al.*, 2015; Knezovic *et al.*, 2015), acúmulo patológico do peptídeo A β 1-42 em capilares meníngeos e corticais (Salkovic-Petrisic *et al.*, 2006), bem como em neurônios e, eventualmente, em formações semelhantes a placas primitivas (Knezovic *et al.*, 2015). Considerando ainda a presença da insulina e seus receptores no SNC e que a deficiência nesta via de sinalização encefálica poderia estar relacionada à DA esporádica, o uso da ETZ vem sendo amplamente utilizada para a indução do modelo animal de DA (Hoyer, 2003; Salkovic – Petrisic *et al.*, 2006). A literatura mostra que diferentes doses de ETZ-ICV, bem como o tempo de administração, têm sido usadas para indução de comprometimento cognitivo em ratos. A utilização da ETZ em doses variadas (1-3mg/kg), após injeções únicas ou múltiplas, quando injetado uma vez (dia 1) ou duas vezes (dia 1 e 3) induz comprometimento cognitivo (Grunblatt *et al.*, 2007; Agrawal *et al.*, 2010; Saxena *et al.*, 2011). Segundo Mehla (2013), a injeção única de ETZ-ICV (3mg/kg) é a forma mais apropriada para indução de

comprometimento cognitivo em longo prazo. Altas doses de ETZ-ICV (3mg/kg) podem ser usadas para investigar o efeito de determinados compostos capazes de modular o estresse oxidativo e a inflamação que levam à perda neuronal, enquanto a utilização de baixas doses (1mg/kg) constituem métodos de lesão de menor gravidade, sendo mais relevantes para estudar os mecanismos associados à demência de evolução lenta e tratamentos neuroprotetores (Krasa *et al.*, 2012). Além da variação na faixa de dose utilizada de ETZ-ICV, alguns trabalhos mostram uma variação no tempo de estudo dos animais, entre 1 semana a 6 meses após a administração da neurotoxina (Lester-Coll *et al.*, 2006; Plaschke *et al.*, 2010; Shoham *et al.*, 2007). No estudo de Santos (2010), foi observado um rápido declínio cognitivo nos testes comportamentais de aprendizado e memória 3h após a injeção de ETZ, seguido de processos degenerativos no hipocampo 1 e 15 dias após as injeções de ETZ. As principais alterações neuroquímicas e estruturais foram observadas nas primeiras duas semanas após a administração de ETZ-ICV, que persistiram por 12 semanas, acompanhadas por déficit progressivo em longo prazo na aprendizagem e memória (Lannert e Hoyer, 1998; Grunblatt *et al.*, 2007). Outra variável importante é a injeção uni ou bilateral da ETZ que também pode fornecer resultados diferentes. Assim, é de fundamental importância estabelecer o critério de seleção da dose, do tempo de estudo e o tipo de administração da ETZ conforme o modelo animal de DA que se deseja estudar. Diferentemente de modelos utilizando animais transgênicos, o modelo animal de DA pode contribuir para a melhor compreensão e entendimento da doença humana por mimetizar várias características patológicas e alterações cognitivas progressivas da DA (Grunblatt *et al.*, 2004).

2.2.2 Modelo animal de parkinsonismo farmacológico induzido pelo haloperidol

A catalepsia ou catatonia é definida como um tipo de alteração motora caracterizada pela dificuldade de correção de uma postura imposta externamente. Algumas drogas são capazes de induzir catalepsia e seus efeitos são caracterizados pela alta rigidez muscular e acinesia (ausência de atividade motora espontânea) devido a sua influência modulatória sobre vias dopaminérgicas da região nigro-estriatal (Hornykiewicz *et al.*, 1973). O haloperidol é um antagonista de receptores dopaminérgicos utilizado na clínica para transtornos psiquiátricos, especialmente em casos de esquizofrenia. Quando administrado de forma sistêmica em roedores, o haloperidol induz catalepsia, um estado de imobilidade no qual podem ser observados diferentes graus de rigidez muscular e baixa flexibilidade, sintomas muito semelhantes aos observados na DP. Segundo Lorenc-Koci (1996), o padrão de rigidez muscular observado por meio do eletromiograma é muito semelhante na catalepsia induzida

por haloperidol e na DP. Na clínica, esta alteração motora é chamada de sintoma extrapiramidal e envolve circuitos complexos de neurotransmissores de estruturas que compõem os núcleos da base. Por isso, a catalepsia tornou-se um bom modelo para se estudar a rigidez parkinsoniana.

2.2.3 Modelo animal de DP induzido pela 6-hidroxdopamina (6-OHDA)

Os modelos experimentais de DP que reproduzem a desnervação dopaminérgica têm sido desenvolvidos para estudar a fisiopatologia da doença e para analisar a eficácia de novas possibilidades terapêuticas. A DP é uma doença humana, não se manifestando espontaneamente em animais, por isso, é somente observada nestes últimos após a administração de agentes neurotóxicos que interrompam ou destruam seletivamente o sistema catecolaminérgico. A maior parte dos estudos pré-clínicos vem utilizando modelos bem estabelecidos de indução de parkinsonismo, com uso de substâncias neurotóxicas capazes de danificar seletivamente neurônios dopaminérgicos em roedores ou primatas não-humanos. Tais modelos são extremamente úteis no estudo dos mecanismos moleculares implicados na neurodegeneração da DP e para a triagem de novos compostos bioativos com potencial atividade neuroprotetora. Os modelos por lesão neurotóxica são amplamente utilizados por serem facilmente reprodutíveis e de menor custo em relação aos modelos genéticos, por exemplo. Entre as neurotoxinas mais utilizadas estão a 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), paraquat, rotenona e 6-OHDA (Bové e Perier, 2012; Decressac *et al.*, 2012). A 6-OHDA é um metabólito tóxico da dopamina que é rapidamente oxidada não enzimaticamente pelo oxigênio molecular formando p-quinona e peróxido de hidrogênio (Soto-Otero *et al.*, 2000), e é proposto como um fator neurotóxico que contribui para a patogênese da DP. A 6-OHDA é absorvida especificamente pelos neurônios dopaminérgicos pelo transportador de dopamina e leva ao estresse oxidativo, essencial para sua toxicidade (Schober, 2004). A indução da formação de EROS é um dos principais mecanismos implicados na neurotoxicidade induzida pela 6-OHDA, resultando na perda de células dopaminérgicas seguida de depleção parcial ou total de dopamina estriatal.

O estresse oxidativo pode ser gerado de diversas maneiras. Ao ser internalizada na célula, a 6-OHDA sofre auto-oxidação (Soto-Otero *et al.*, 2000) gerando espécies citotóxicas que podem levar à peroxidação lipídica e danos ao DNA e proteínas (Blum *et al.*, 2001; Simola *et al.*, 2007; Glinka, *et al.*, 1997). Além da auto-oxidação, a deaminação da molécula pela enzima MAO-A, reação que leva à produção de peróxido de hidrogênio e contribui para a geração de EROS (Simola *et al.*, 2007). O aumento desses componentes pró-oxidantes leva

ao comprometimento agentes antioxidantes endógenos (ex: catalase, superóxido dismutase, glutationa e glutationa peroxidase) (Perumal *et al.*, 1989), promovendo a amplificação do dano celular causado pela 6-OHDA.

Outro mecanismo sugerido é a amplificação do estresse oxidativo através da formação de radicais hidroxila a partir de peróxido de hidrogênio e ferro através da reação de Fenton ($\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{OH}^- + \text{OH}^* + \text{Fe}^{3+}$) (Blum *et al.*, 2001). Essa hipótese, no entanto, ainda não foi confirmada. A 6-OHDA também é sugerida como capaz de inibir os complexos I e IV da cadeia respiratória mitocondrial (Glinka *et al.*, 1996). Desta maneira, gera aumento de cálcio intracelular, redução do consumo de O₂ e depleção de ATP, levando a célula à falência metabólica e morte (Blum *et al.*, 2001; Mazzio *et al.*, 2004). Além do estresse oxidativo, o tratamento com o 6-OHDA é capaz de interromper a motilidade das mitocôndrias e das vesículas sinápticas nos axônios DA no início do processo de degeneração axonal; além de induzir a perda axonal e, eventualmente, a morte celular (Lu *et al.*, 2014). Vários modelos foram desenvolvidos nos quais a toxina 6-OHDA foi injetada em diferentes partes da via nigroestriatal em ratos. Isto porque ela é incapaz de atravessar a barreira hematoencefálica, sendo necessária a administração diretamente na estrutura cerebral que se deseja lesar. Na literatura, observa-se que as regiões mais comumente usadas para a injeção de 6-OHDA são a substância negra parte compacta (SNpc), o feixe prosencefálico medial (FPM) e o corpo estriado (Bové e Perier, 2012; Dutty e Jenner, 2011; Simola *et al.*, 2007). Outro ponto relevante é o fato de que as lesões podem ser realizadas de maneira unilateral ou bilateral. Animais lesados bilateralmente com 6-OHDA, abordagem relativamente recente e pouco utilizada, demonstram os sintomas motores parkinsonianos, o que prejudica sua alimentação e por isso causa alta mortalidade dos animais, podendo prejudicar experimentos comportamentais e crônicos (Ferro *et al.*, 2005). Além disso, dependendo da dose e sítio de lesão, tende a causar maiores índices de adipsia, afagia e mortalidade se comparada à lesão unilateral (Bové e Perier, 2012; Dutty e Jenner, 2011; Simola *et al.*, 2007).

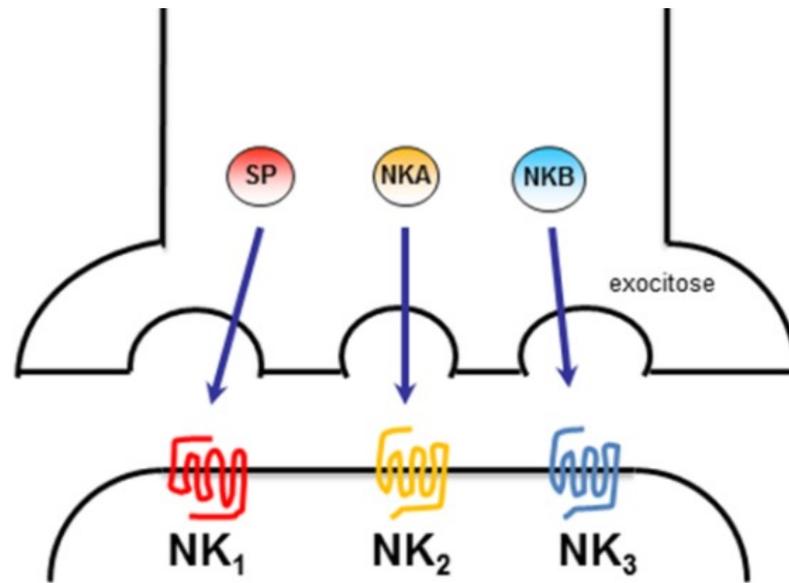
A 6-OHDA é usualmente injetada unilateralmente, enquanto o hemisfério intacto funciona como um controle interno, constituindo um modelo de hemiparkinsonismo, que é caracterizado por um comportamento motor assimétrico após a administração de drogas dopaminérgicas, devido a um desequilíbrio entre o lado lesado e não-lesado (Betarbet *et al.*, 2002). A injeção unilateral de 6-OHDA na SNpc ou no FPM provoca a morte de todos os neurônios dopaminérgicos no mesencéfalo do lado aplicado e a diminuição de dopamina no lado correspondente do estriado, gerando um modelo válido de uma fase adiantada da DP com pronunciadas alterações motoras e uma rápida morte celular (Metz e Whisaw, 2002). Outro

modelo envolve a injeção de 6-OHDA diretamente no estriado (Berger *et al.*, 1991; Przedborski *et al.*, 1995), causando degeneração retrógrada mais lenta de até 70% dos neurônios dopaminérgicos em 4 semanas (Shimohama *et al.*, 2003), permitindo assim o acompanhamento longitudinal da lesão de uma maneira mais progressiva. A injeção intraestriatal de diferentes doses de 6-OHDA pode ser usada para causar quantidades crescentes de desnervação de dopamina, o que poderia modelar a DP em vários graus de severidade. A injeção de 2,5µg/µl (3,5µL) de 6-OHDA parece ser particularmente útil como um modelo geral da DP inicial (Przedborski *et al.*, 1995).

2.3 SUBSTÂNCIA P E RECEPTORES NEUROCINÉRGICOS NK₁

As neurocininas são um grupo de neuropeptídeos amplamente distribuídos pelo sistema nervoso e imunológico e inclui a substância P (SP), a neurocinina A (NKA) e a neurocinina B (NKB) (Otsuka e Yoshioka, 1993). Seus efeitos biológicos são mediados por três receptores distintos denominados receptores neurocinérgicos NK₁ (para SP), NK₂ (para NKA) e NK₃ (para NKB). Os receptores neurocinérgicos pertencem à superfamília de receptores acoplados à proteína G (metabotrópicos) responsáveis pela ativação de segundos mensageiros que cooperam com a transdução dos sinais intracelulares (Regoli *et al.*, 1994). A NKA possui ação vasodilatadora e produz aumento da permeabilidade vascular, tendo papel na manutenção do processo inflamatório (Ferreira, 1995). O seu receptor NK₂ está presente principalmente em tecidos periféricos e de forma mais restrita no SNC (Pennefather *et al.*, 2004). A presença dos receptores NK₂ no SNC tem sido investigada utilizando diferentes radioligantes, mas devido a pobre seletividade dos ligantes utilizados, esses resultados não são convincentes (Maggi, 1995). Porém, a demonstração da presença de receptores NK₂ no SNC, especialmente em alguns núcleos talâmicos, hipocampo e camadas corticais, tem sido feita com outras técnicas e ferramentas, incluindo o uso de radioligantes mais seletivos (Hagan *et al.*, 1993; Saffroy *et al.*, 2001). A neurocinina B (NKB), por sua vez, tem sua ação e estrutura semelhante à SP, estando amplamente distribuída pelo SNC e periférico. Os receptores NK₃ estão expressos de forma moderada no SNC, mas é facilmente encontrado em neurônios Gabaérgicos no estriado e neurônios dopaminérgicos na substância negra (Shughure *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1998; Preston *et al.*, 2000; Furuta *et al.*, 2004). As três principais neurocininas SP, NKA e NKB, bem como seus respectivos receptores neurocinérgicos NK₁, NK₂ e NK₃, estão ilustrados na Figura 8.

Figura 8 – Neurocininas e receptores neurocinérgicos.

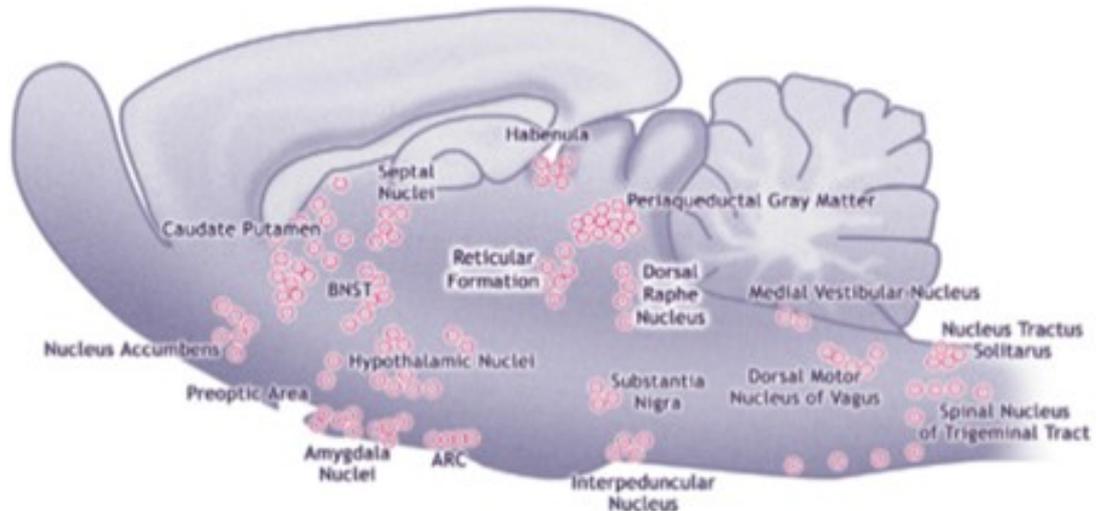


Fonte: Snijdelaar *et al.*, 2000.

A SP, uma das principais neurocininas endógenas, foi o primeiro neuropeptídeo a ser conhecido e a ser proposto como neurotransmissor (Von Euler e Pernow, 1977). Seus efeitos farmacológicos foram inicialmente demonstrados em 1930, quando observaram seus poderosos efeitos hipotensores que não eram bloqueados por antagonistas colinérgicos (Von Euler e Gaddum, 1931; Gaddum e Schild, 1934; Von Euler, 1936). A origem da denominação “substância P” vem das palavras “preparação” ou “pó”, pois Von Euler havia utilizado em seus estudos uma preparação padrão na forma de pó seco (“powder”), convenientemente abreviada por “P” (Otsuka e Yoshioka, 1993). Este neuropeptídeo é composto por uma sequência de onze aminoácidos (H-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-PhePhe-Gly-Leu-Met-NH₂), estando envolvido em diversas funções biológicas incluindo contração muscular, transmissão da informação sensorial, nociceptiva, inflamação, dor, entre outras (Thornton e Vink, 2012). A SP é a mais abundante taquicinina no cérebro (Marriott, 2004) e seus receptores NK₁ estão presentes tanto no SNC quanto periférico; regulando inúmeras respostas fisiológicas, em neurônios, em células microgliais, células endoteliais e do sistema imune periférico. No entanto, a SP é encontrada em muitas outras regiões do cérebro, incluindo o hipocampo, córtex, gânglios basais e hipotálamo (Ebner e Singewald, 2006), e pode produzir efeitos em todo o SNC. Além disso, essa taquicinina é também amplamente distribuída por todo o sistema nervoso periférico e sistema nervoso entérico, e pode ser expresso por células do sistema imunológico (Bost, 1995; Chernova *et al.*, 2009). No SNC de ratos, fibras nervosas e corpos celulares imunorreativos à SP foram encontrados em altas densidades no hipotálamo,

tálamo, globo pálido, estriado, amígdala, substância cinzenta periaquedutal, substância negra, locus coeruleus e núcleo do trato solitário (Cuello e Kanazawa, 1978; Shults *et al.*, 1984; Ribeiro-da-Silva e Hökfelt, 2000).

Figura 9 - Distribuição da substância P (SP) no cérebro de ratos.



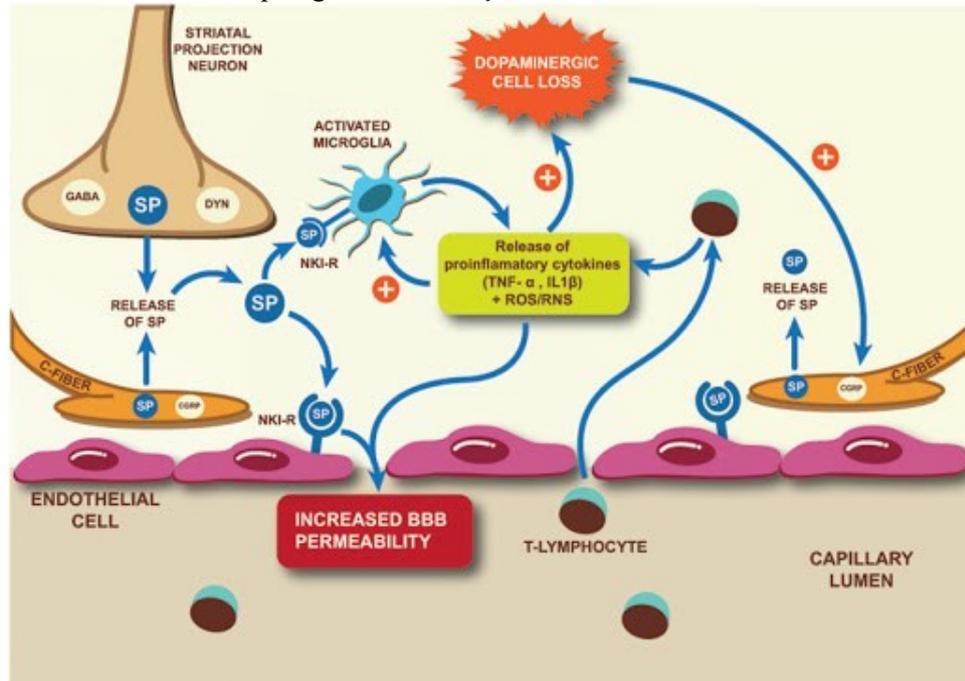
Fonte: Holmes *et al.*, 2003. Legenda: Os círculos em vermelhos destacam a densa distribuição da SP em diferentes regiões do cérebro de ratos, incluindo o hipotálamo, amígdala, estriado, substância cinzenta periaquedutal, substância negra, núcleo accumbens e núcleo dorsal da rafe.

Evidências mostram que a SP desempenha um papel crítico na inflamação periférica, como por exemplo no trato gastrointestinal e respiratório (Gross e Pothoulakis, 2007), bem como na inflamação do SNC (Rasley *et al.*, 2004; Chauhan *et al.*, 2008). A SP é capaz ainda de modular as respostas inflamatórias de células imunes mielóides via ativação dos receptores NK₁, e limita a produção de citocinas imunossupressoras, como a IL-10 (Marriott e Bost, 1998, 2001). A SP aumenta a produção de mediadores inflamatórios por astrócitos e microglias após a exposição a bactérias gram-negativas; além disso, as interações endógenas da SP com os RNK₁ são um componente essencial na iniciação e/ou progressão da inflamação do SNC após a exposição a esses patógenos (Rasley *et al.*, 2004; Chauhan *et al.*, 2008). Chauhan *et al.*, (2011) mostraram aumento *in vivo* nos níveis de citocinas inflamatórias e diminuição nos níveis de citocinas imunossupressoras. A SP tem habilidade para induzir vasodilatação no cérebro, promover o recrutamento de células do sistema imunológico e aumentar o processo inflamatório, contribuindo para o desenvolvimento de condições devastadoras, como a meningite e encefalite após infecção (Maggi, 1995; O'Connor *et al.*, 2004; Corrigan *et al.*, 2016). Assim, a SP exerce um papel central na iniciação e progressão da neuroinflamação após infecções virais (Douglas *et al.*, 2001, 2008a,b; Vinet-Oliphant *et*

al., 2010), bacterianas (Chauhan *et al.*, 2008, 2011) e parasitárias (Kennedy *et al.*, 1997; Robinson *et al.*, 2002).

A abundante distribuição das neurocininas, bem como de seus receptores em áreas específicas do cérebro, vem permitindo sugerir, nas últimas décadas, o envolvimento desses neuropeptídeos na etiologia de diversas patologias, entre elas nas doenças neurodegenerativas como DP, DA, Huntington e Esclerose Lateral Amiotrófica, nos transtornos psicóticos como a esquizofrenia, nos transtornos do sono como a narcolepsia (Strittmatter *et al.*, 1996), nos transtornos de ansiedade e depressão (Raffa, 1998), bem como na gênese da epilepsia (Liu *et al.*, 1999). As interações da SP com o RNK₁ foram associadas à inflamação subjacente à DA, DP, atrofia de sistemas múltiplos (ASM) e esclerose múltipla (EM). Na DA, níveis reduzidos de SP foram observados em tecido cortical *post mortem* e fluido cerebrospinal dos pacientes acometidos (Quigley e Kowall, 1991; Kowall *et al.*, 1993; Raffa, 1998). Já em modelos animais de parkinsonismo e em tecido *post mortem* de pacientes com DP, os níveis diminuídos de SP foram encontrados na substância nigra e estriado (Chen *et al.*, 2004). A SP produzida em neurônios com projeção nigroestriatal amplifica a resposta inflamatória no SNC (Marriott, 2004). Em adição, sabe-se que os RNK₁ estão abundantemente localizados em neurônios dopaminérgicos e colinérgicos dos gânglios da base, estruturas responsáveis por controlar e coordenar a atividade motora, portanto, esses receptores vêm sendo implicados na patogênese da DP devido a sua capacidade de estimular a liberação de dopamina e modular o comportamento motor (Graybiel, 1986; Reid *et al.*, 1990). Neurônios dopaminérgicos da SN são mais suscetíveis a insultos oxidativos e inflamatórios do que outros tipos de neurônios (Hastings *et al.*, 1996; Hastings e Zigmond, 1997; Mosley *et al.*, 2006; Reynolds *et al.*, 2007). Além disso, é sabido que a SP está mais concentrada na SN (Brownstein *et al.*, 1976), região que contém uma densidade desproporcionalmente alta de micróglia (4,5 vezes maior do que em outras regiões) e baixa de astrócitos (Kim *et al.*, 2000). Por isso, é sugerido que a SP seja capaz de aumentar a ativação microglial, tanto *in vitro* (Rasley *et al.*, 2004; Block *et al.*, 2006; Chauhan *et al.*, 2008), quanto *in vivo* (Wang *et al.*, 2014), produzindo superóxido e citocinas pró-inflamatórias, aumentando a permeabilidade da BHE e exarcebando a neurodegeneração dopaminérgica. A mudança na permeabilidade da barreira permite a infiltração de linfócitos T, o que promove uma maior ativação microglial e liberação de maior conteúdo de citocinas (Thornton e Vink, 2015).

Figura 10 - Inflamação neurogênica induzida pela substância P: mecanismos envolvidos na fisiopatogenia da Doença de Parkinson.



Fonte: Thornton e Vink, 2015. Legenda: A SP é liberada das fibras C que circundam a microvasculatura cerebral da substância negra e dos neurônios de projeção estriatal. A SP se liga aos RNK_1 das células endoteliais aumentando a permeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE), ou aos RNK_1 da micróglia causando a liberação de citocinas pró-inflamatórias e EROS/ERNs, aumentando ainda mais a permeabilidade da BHE, além de causar diretamente a degeneração dopaminérgica. O aumento da permeabilidade da BHE permite a infiltração de linfócitos T, o que promove maior ativação microglial e liberação de citocinas. SP: Substância P; CGRP: peptídeo relacionado ao gene da calcitonina; BBB: barreira hematoencefálica; NK1-R: receptor de taquicinina NK1; GABA: ácido gama-aminobutírico; DYN: dinorfina; TNF- α : fator de necrose tumoral- α ; IL1 β : interleucina-1 β ; ROS: espécies reativas de oxigênio; RNS: espécies reativas de nitrogênio.

Todos esses dados indicam que as interações entre SP e seu RNK_1 ditam a resposta inflamatória observada em diversas infecções ou distúrbios do SNC. Além disso, a quantidade de SP liberada pelos neurônios e células do sistema imunológico, juntamente com o número de receptores disponíveis, determina o nível de neuroinflamação (Johnson *et al.*, 2017). Com base nesses estudos, parece que as interações da SP/ RNK_1 podem ser uma estratégia promissora para melhorar o dano inflamatório ao SNC associados a agentes infecciosos e desordens neurológicas. O uso de antagonistas de RNK_1 vem sendo estudado no tratamento de condições neuroinflamatórias e neuroinfecciosas (Martinez e Philipp, 2016). Entretanto, o envolvimento da SP/ RNK_1 em modelos de neurodegeneração ainda permanece inconclusivo.

Os primeiros antagonistas de RNK_1 foram desenvolvidos no início de 1990, mas a maioria não era eficaz como analgésico e antidepressivo, uma vez que não conseguiam atravessar com eficiência a BHE. Posteriormente, estudos com o antagonista do RNK_1 , ezlopitant (Reed-Hagen *et al.*, 1999); aprepitant (Bergström *et al.*, 2004); casopitant

(Ruhlmann e Herrstedt, 2009), revelaram a presença destes compostos no cérebro após administração intravenosa ou oral, indicando sua capacidade de atravessar a BHE. Os antagonistas aprepitant e casopitant completaram a fase II e III em ensaios clínicos no tratamento de náuseas e vômitos; sendo o aprepitant já aprovado pela Administração de drogas e alimentos dos EUA, enquanto o casopitant ainda não foi aprovado (Quartara e Altamura, 2006; Quartara *et al.*, 2009; Ruhlmann e Herrstedt, 2009; Di Fabio *et al.*, 2013). Atualmente tem sido explorada a capacidade de tais antagonistas de RNK₁ para tratar condições gastrointestinal, respiratório e urogenital, e distúrbios sensoriais; mas o grande interesse é na utilização de antagonistas RNK₁ no tratamento de condições do SNC incluindo náusea, vício, dor e depressão, devido a sua capacidade de cruzar a BHE (Johnson *et al.*, 2017). A capacidade dos antagonistas RNK₁ de cruzar a BHE significa que esses agentes têm potencial para uso no tratamento de distúrbios do SNC, como a depressão. Os antagonistas de RNK₁, MK-869 e casopitant, demonstraram ser eficazes no comportamento depressivo (Kramer *et al.*, 1998; Ebner e Singewald, 2006; Di Fabio *et al.*, 2013). Também há esperanças de que esses receptores possam ser valiosos alvos farmacológicos para o tratamento de outros transtornos neuropsiquiátricos como esquizofrenia, ansiedade e pânico, DP, DA e EM. Essa esperança decorre dos efeitos promissores de antagonistas dos RNK₁ capazes de cruzar a BHE em modelos animais de tais doenças (Johnson *et al.*, 2017). Por exemplo, os antagonistas do RNK₁, SR140333 e CP96345, mostraram eficácia com uma coterapia com outros agentes anti-inflamatórios e isoladamente, respectivamente, na melhora da mielina em um modelo de camundongo de EM (Reinke *et al.*, 2006; Nessler *et al.*, 2006).

Há um interesse considerável no direcionamento deste receptor para limitar as respostas inflamatórias prejudiciais no SNC, como a neuroinflamação e sequelas neurológicas. Foi demonstrado que o antagonista do RNK₁, L-703.606, é capaz de prevenir o desenvolvimento de inflamação decorrente de infecção com estreptococo no SNC, mas também pode reverter a gliose associada à infecção e a desmielinização (Chauhan *et al.*, 2011). Robinson *et al.*, (2012), mostrou que a administração diretamente no hipocampo da SP provoca convulsões em camundongos e o uso do antagonista de RNK₁ preveniu esta atividade convulsiva, sendo possível que o bloqueio das ações deste neuropeptídeo possam ser úteis em pacientes com epilepsia ou outras condições neurológicas inflamatórias.

2.4 NEUROINFLAMAÇÃO E NEURODEGENERAÇÃO

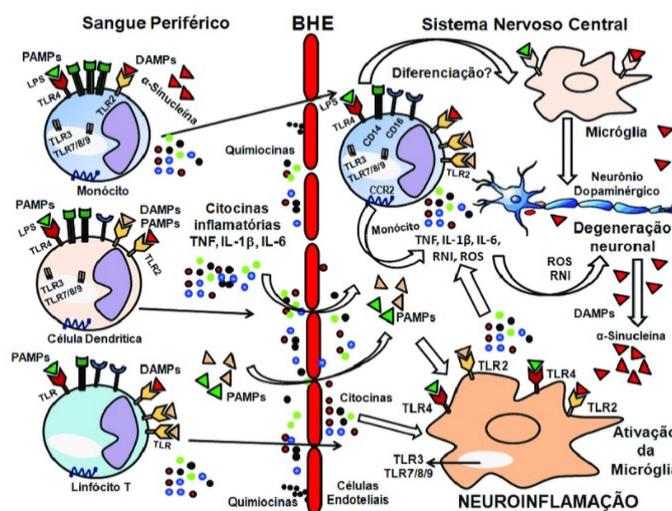
Estudos recentes têm indicado que o dano neuronal progressivo associado às doenças neurodegenerativas pode ser consequência de reações inflamatórias locais no SNC, com a

formação de inflamossomas. Estes são complexos de proteínas do sistema imune inato, ativadores de caspases pró-inflamatórias que induzem a liberação de citocinas, promovendo a neuroinflamação (Akiyama *et al.*, 2000a,b; Tuppo e Arias, 2005; Pennisi *et al.*, 2017).

Na DP, os astrócitos e as microglias são as principais células cerebrais envolvidas na neuroinflamação e morte de neurônios dopaminérgicos. Essas células são responsáveis pela defesa imune inata produzindo moléculas citotóxicas para eliminar potenciais patógenos que poderiam causar algum desequilíbrio no meio neural (Phani *et al.*, 2012; Episcopo *et al.*, 2013). Por outro lado, a ativação crônica dessas células como observado na DP produz um ciclo vicioso denominado como microglia reativa, agredindo o neurônio e ocasionando a morte celular (Carta e Pisanu, 2013).

As células gliais sob condições patológicas, desregulação ou ativação glial excessiva pode resultar na neurodegeneração (Liu *et al.*, 2003; Ziegler-Heitbrock *et al.*, 2010). A micróglia, quando ativada, expressa vários receptores e moléculas de adesão, podendo entrar em replicação, aumentando em número, e, posteriormente, na persistência do estímulo, pode adquirir a capacidade de célula apresentadora de antígenos, fagocítica e pró-inflamatória, por meio da secreção de citocinas e quimiocinas (Trudler *et al.*, 2010). O envolvimento da micróglia na degeneração neuronal foi descrito pela primeira vez por McGeer e colaboradores (1988), após observarem em pacientes parkinsonianos o aumento da imunorreatividade na SN do complexo de histocompatibilidade maior, sugerindo a associação da ativação da micróglia e de macrófagos com a neurodegeneração dopaminérgica na DP (Barcia *et al.*, 2004).

Figura 11 - Processo de ativação microglial envolvida na neuroinflamação.



Fonte: Sousa *et al.*, 2016. Legenda: Fatores ambientais como os padrões moleculares microbianos derivados de patógenos (PAMPs), bem como moléculas provenientes de danos teciduais (DAMPs) podem provocar ativação de células da circulação periférica como os monócitos e outras células apresentadoras de antígenos, principalmente por meio do reconhecimento dessas moléculas antigênicas via receptores do tipo Toll (Toll-like receptors-TLR). As células apresentadoras de

antígenos (APCs) também podem capturar, processar e apresentar antígenos para células T nos órgãos linfoides secundários, estimulando uma resposta imune específica para o antígeno. Especialmente as APCs podem ser ativadas na circulação sanguínea e consequentemente liberar diversos mediadores pró-inflamatórios (citocinas, quimiocinas e radicais de oxigênio ou nitrogênio) que provocam alteração da permeabilidade da Barreira Hematoencefálica (BHE) permitindo o acesso de moléculas (PAMPs e substâncias neurotóxicas) presentes no sangue periférico e a infiltração de leucócitos no cérebro em condições inflamatórias. A ativação da micróglia envolve o contato de receptores para citocinas, quimiocinas e, especialmente, de TLR presentes nessa célula com seus respectivos ligantes. O TLR2 reconhece a α -sinucleína liberada de neurônios degenerados, a qual, durante a neuroinflamação, pode passar para a circulação sanguínea, e o TLR4 reconhece LPS e pode colaborar para a fagocitose de outros PAMPs pela micróglia. A ativação da micróglia, seja por PAMPs ou DAMPs, induz a secreção de uma grande variedade de mediadores inflamatórios que participam dos mecanismos de lesão e morte dos neurônios dopaminérgicos no SNC por meio do processo de neuroinflamação.

De fato, o principal marcador neuroinflamatório na DP é a ativação das células gliais, principalmente da micróglia que ocorre em resposta ao dano neuronal ou a mudanças imunológicas, sendo observado aumento da ativação microglial com acúmulo de citocinas pró-inflamatórias e radicais livres (Gao *et al.*, 2002). Sob condições inflamatórias, citocinas e quimiocinas favorecem a entrada de leucócitos do sangue periférico no cérebro, especialmente linfócitos e monócitos (Kawanaka *et al.*, 2002; Wong *et al.*, 2012). O desequilíbrio entre sinais pró e anti-inflamatórios pode favorecer um processo inflamatório crônico, com continuada ativação da microglia, que nestas condições, além de produzir citocinas próinflamatórias, passa também a secretar EROS, óxido nítrico e prostaglandinas, todos com alto potencial tóxico para os neurônios dopaminérgicos da SN.

A neurodegeneração na DP pode, portanto, ser consequência da neuroinflamação mediada pela ativação das células microgлияis. O aumento da expressão e dos níveis de citocinas próinflamatórias, tais como interleucinas (IL-1, IL-6), fator de necrose tumoral (TNF- α), EROS, NO e aumento da ativação da ciclooxigenase (COX-2), desencadeiam uma cascata de eventos que conduzem ao aumento da neurodegeneração (Gao *et al.*, 2002; Ros-Bernal *et al.*, 2011; Phani *et al.*, 2012). Já foi encontrado no LCR, soro e em cérebros de pacientes com DP, bem como um aumento dos receptores solúveis para o TNF- α no soro dos pacientes (Choi *et al.*, 2007; Etemad *et al.*, 2012). Astrócitos e células gliais são consideradas, pelo menos no SNC, produtoras primárias de TNF- α . Durante processos patológicos no cérebro foram descritos tanto efeitos neuroprotetores quanto neurotóxicos exercidos pelo TNF- α (Medeiros, 2007). Na SN de pacientes parkinsonianos também foram observados infiltrados de linfócitos T (CD4+ e CD8+), que são células envolvidas na defesa imune adaptativa e normalmente circulam na periferia (Phani *et al.*, 2012). Os astrócitos são células responsáveis pela realização da manutenção da homeostase cerebral,

reestabelecimento da barreira hemato-encefálica e pela remoção de detritos do SNC (Phani *et al.*, 2012; 'Episcopo *et al.*, 2013). A sua principal função é proteger as células contra o estresse oxidativo, sendo de extrema importância para a sobrevivência neuronal principalmente dos neurônios dopaminérgicos, uma vez que a auto-oxidação de DA produz grandes quantidades de radicais livres altamente tóxicos ('Episcopo *et al.*, 2013). Em estudos post-mortem realizados em cérebros de pacientes parkinsonianos, assim como em modelos animais de DP são observados aumento de aproximadamente 30% na densidade de células GFAP positivas mostrando a existência de astrogliose na SN, sendo que a sua ativação prolongada é estimulada por mediadores inflamatórios produzidos pela micróglia e pelos neurônios lesados ('Episcopo *et al.*, 2013).

Esses mediadores pró-inflamatórios produzidos pela micróglia ativam ainda os astrócitos e promovem uma ativação da via de sinalização do NF- κ B (Gao *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2007; Hirsch *et al.*, 2012; Blandini, 2013; Hong *et al.*, 2016). O NF- κ B é um fator de transcrição que regula a expressão gênica de imunoglobulinas em linfócitos B e embora esteja principalmente relacionado à transcrição de genes envolvidos no processo inflamatório também participa da regulação de funções neurais como plasticidade, desenvolvimento neural, sinalização sináptica e sobrevivência celular (Blanco e Neto, 2003; Franco, 2010). Em situações neuropatológicas é ativado por citocinas, quimiocinas, lipopolissacarídeos, vírus (HIV), fatores de crescimento e fatores indutores de estresse (Blanco e Neto, 2003; Memet, 2006). A ativação do NF- κ B está relacionada à regulação da expressão de citocinas inflamatórias, sendo que baixos níveis de citocinas estimulam a produção e liberação de fatores neurotróficos para a manutenção do meio neural (Phani, *et al.*, 2012; Thakur e Nehru, 2013). A atividade da micróglia pode ser reduzida ou até inibida através do bloqueio da atividade do NF- κ B que também está associado à fisiopatologia da DP por estar envolvido na amplificação da resposta inflamatória e indução de apoptose (Ros-Bernal *et al.*, 2011). A translocação do NF- κ B para o núcleo é indicativo da sua ativação, sendo observado em pacientes parkinsonianos um aumento na proporção dos neurônios dopaminérgicos com marcação nuclear para NF- κ B (Hunot *et al.*, 1997). Níveis elevados de citocinas como os observados na DP ativam vias inflamatórias com produção de substâncias que podem ativar vias apoptóticas e induzir a morte celular (Thakur e Nehru, 2013). Com isso, as citocinas pró-inflamatórias liberadas pela micróglia na DP podem se ligar diretamente aos receptores de citocinas presentes na superfície dos neurônios dopaminérgicos e desencadear a ativação do NF- κ B induzindo a apoptose (Phani *et al.*, 2012). A expressão aumentada do NF- κ B em neurônios dopaminérgicos foi observada na SNpc de pacientes parkinsonianos (Phani *et al.*,

2012; Haim *et al.*, 2015). Aumento dos seus níveis nigroestriatais bem como a sua ativação persistente também foram encontrados em modelos animais de DP (Pranski *et al.*, 2013).

A inflamação também desempenha um papel crítico na patogênese da DA (Ferreira *et al.*, 2014). Na DA, tem sido proposto que uma ineficiente fagocitose da proteína A β por parte de células microgлияis, e consequente hiperativação celular e liberação de mediadores pró-inflamatórios e fatores neurotóxicos, contribuiria de maneira decisiva no processo neurodegenerativo verificado nesta doença (Akiyama *et al.*, 2000a,b). A proteína A β pode promover a neurodegeneração por mecanismos paralelos, incluindo a ativação de células microgлияis e de astrócitos. Uma vez ativada, a microglia libera uma série de mediadores pró-inflamatórios, incluindo citocinas, fatores complemento, várias espécies radicalares, produtos secretórios tóxicos e NO, todos capazes de contribuir para disfunção e morte neuronal. Vários peptídeos amiloides e a APP podem atuar como potenciais ativadores microgлияis (Heneka e O'Banion, 2007; Akiyama *et al.*, 2000). Aparentemente, as células microgлияis estão preferencialmente associadas a certos tipos de placas amiloides, indicando que o desenvolvimento da placa e o grau de reação da microglia estão interrelacionados. Fragmentos A β estimulam a via dependente do NF-kB, que é necessário para a transcrição do gene de citocinas, ativação da microglia e de astrócitos reativos. Além da A β , aminoácidos terminais presentes nas placas senis podem induzir astrocitose e morte neuronal, além da ativação da via de proteína-quinase ativada por mitógeno (MAPK) (Heneka e O'Banion, 2007). A ativação da microglia pode levar ao recrutamento de astrócitos, que aumentam a resposta inflamatória aos depósitos de A β extracelulares. Este componente neuroinflamatório da DA é adicionalmente caracterizado por uma fase de resposta aguda local mediada por citocinas, ativação da cascata complemento e indução de um sistema enzimático inflamatório, como óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e a geração de COX-2 (Akiyama *et al.*, 2000; Jann *et al.*, 2002). Os astrócitos, por sua vez, participam da degradação e remoção da A β , servindo de barreira protetora entre os depósitos de A β e os neurônios (Viegas *et al.*, 2011).

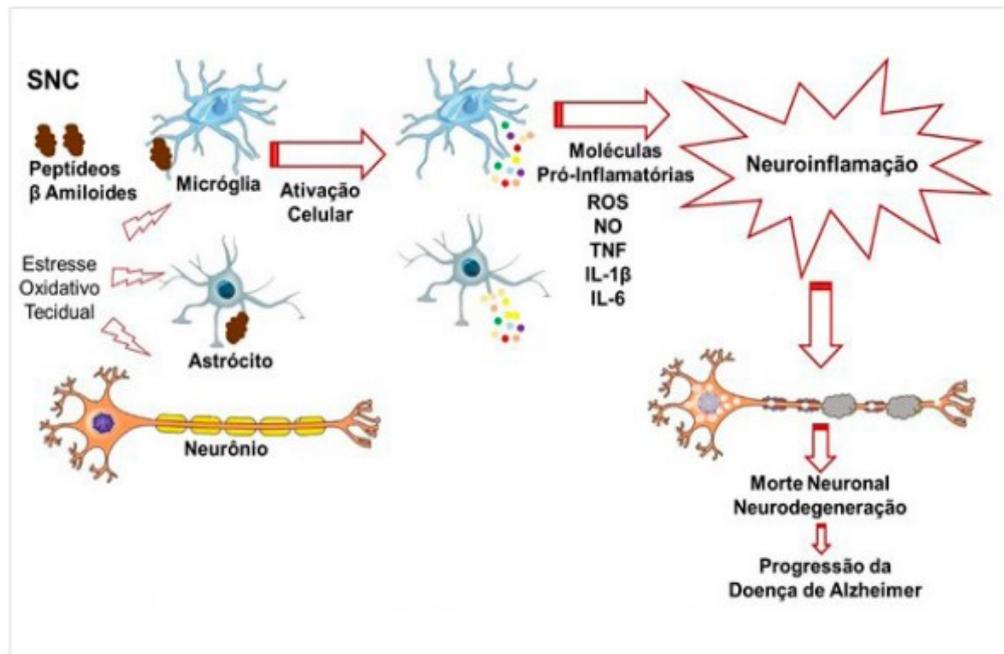
Têm sido demonstrado um aumento nos níveis de diversos mediadores pró-inflamatórios (interleucinas, COX-2, espécies reativas de oxigênio) no cérebro de pacientes com a DA (Galimberti *et al.*, 2003). Vários estudos estabeleceram a presença de marcadores inflamatórios no cérebro de pacientes com DA, incluindo níveis elevados de citocinas/quimiocinas e microgliose (Britschgi e Wyss-Coray, 2007; Swardfager *et al.*, 2010; Ferreira *et al.*, 2014). Resultados de Bermejo (2008) mostrou aumento dos níveis do TNF- α e COX-2 em pacientes com DA e com comprometimento cognitivo leve, evidenciando um aumento da inflamação nas fases iniciais de DA. Além do mais, no sangue de pacientes com

DA também foram encontrados níveis de vários mediadores inflamatórios aumentados, incluindo o TNF- α , IL-6 e IL-1 β (Swardfager *et al.*, 2010). Estudos vêm demonstrando a ativação da micróglia e produção de citocinas pró-inflamatórias tais como IL-1 β , IL-18, TNF- α e IL-6 na DA (Montine *et al.*, 2001; Heneka *et al.*, 2015a). A ativação da microglia também induz a liberação de EROS e ON (Heneka *et al.*, 2001; Heneka *et al.*, 2015b). Dentre os mediadores associados à doença de Alzheimer pode-se destacar a citocina TNF- α . Evidências experimentais revelaram que o TNF- α apresenta um importante papel como mediador e modulador da resposta inflamatória. Sua produção é realizada principalmente por células do sistema imunológico, incluindo macrófagos, monócitos e linfócitos. O TNF- α atua em resposta a agentes patogênicos ou durante condições de estresse no organismo, ativando diferentes cascatas intracelulares que regulam diversas funções celulares, incluindo respostas inflamatórias, diferenciação e apoptose (Palladino *et al.*, 2003). De maneira geral, a ativação dos receptores para o TNF- α resulta na ativação das MAPK e da proteína I κ B quinase (IKK), que por sua vez controlam a expressão de diferentes proteínas pela ativação de fatores de transcrição como a proteína ativada-1 (AP-1) e o NF- κ B (Wajant *et al.*, 2003). Ao nível celular, a principal função atribuída ao TNF- α é sinalizar para a ativação da transcrição de outras proteínas envolvidas na resposta inflamatória, incluindo a interleucina (IL)-1, -6 e -8, as quimiocinas e as moléculas de adesão. Além disso, o TNF- α é um fator fundamental na regulação do balanço entre a ativação de vias de sinalização pró- e anti-apoptóticas no controle da proliferação celular e na resposta inflamatória. De modo interessante, a supressão do processo de apoptose geralmente resulta em resposta inflamatória (Baud e Karin, 2001). Evidências indicam que na doença de Alzheimer há um aumento na expressão nos níveis de TNF- α e seu receptor no cérebro e plasma dos pacientes (Tarkowski, 2002; Li *et al.*, 2004). Recentemente, também foi demonstrado através de experimentos de eletrofisiologia em camundongos que o TNF- α apresenta um importante papel na redução da potenciação de longo prazo (LTP) induzida pela A β (Wang *et al.*, 2005). Entretanto, os mecanismos pelo qual o TNF- α exerce seus efeitos durante a DA são pouco compreendidos (Medeiros, 2007).

Vários resultados mostram a participação do inflamassoma na neuroinflamação na DA e em outras doenças neurodegenerativas (Volt *et al.*, 2016; Alegre *et al.*, 2017; Fenini *et al.*, 2017). O inflamassoma é um complexo multiproteico, mediado por ativação da inflamação através de caspases e assim induz a liberação de citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-18 (Man *et al.*, 2016; Favero *et al.*, 2017; Fenini, *et al.*, 2017). Modelos animais de DA, já evidenciaram a ativação do inflamassoma NLRP3, com produção de citocinas e quimiocinas (Shi *et al.*, 2013; Liu e Chan, 2014; Couturier *et al.*, 2016), ressaltando uma

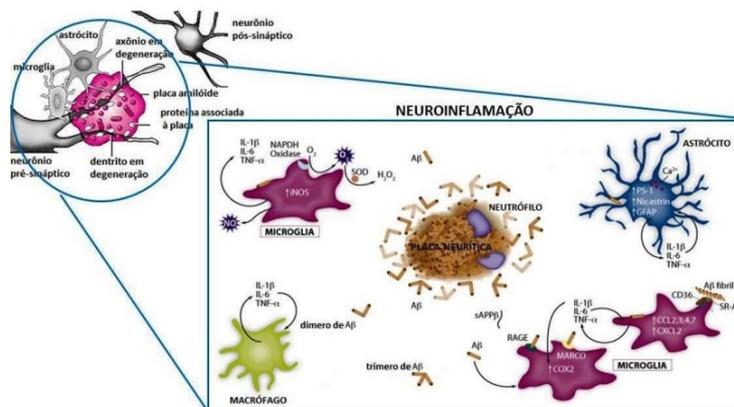
forte relação do inflamassoma com os processos inflamatórios que ocorrem na DA. Um estudo recente, postulou que a DA acontece muito antes das formações de placas A β , sem manifestações clínicas evidentes, começando por uma pequena inflamação, que progride com o avanço da doença, culminando em uma resposta inflamatória e imune (Cuello, 2017).

Figura 12 - Processo de ativação microglial na DA.



Fonte: Machado *et al.*, 2020. Legenda: A neuroinflamação no SNC acaba se resumindo em um ciclo vicioso, no qual os peptídeos A β -amilóides estimulam a micróglia a partir de diversas vias, como a via dependente do fator nuclear kappa B (NFkB) e a via MAPK (proteína cinase ativada por mitógenos), o que resulta na liberação das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6. O estado inflamatório estabelecido contribui para a disfunção e morte de células do SNC.

Figura 13 - Processo neuroinflamatório por ativação das células microgliais e astrócitos.

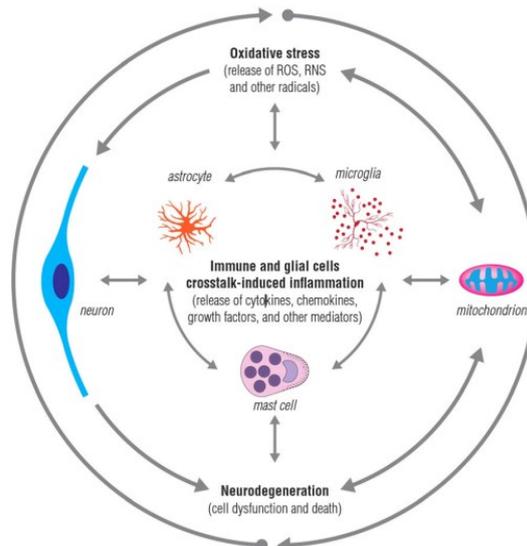


Fonte: Viegas *et al.*, 2011.

2.5 ESTRESSE OXIDATIVO

Embora o envelhecimento natural coincida com níveis elevados de estresse oxidativo, uma gama muito diversa de doenças demonstra um nível mais pronunciado de estresse oxidativo, incluindo transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) (Selek *et al.*, 2012), DP (Isobe *et al.*, 2010), aterosclerose (Lapenna *et al.*, 1998), síndrome de Down (Jovanovic *et al.*, 1998), depressão (Chung *et al.*, 2013), DA (Cioffi *et al.*, 2019) e DM (Greenman *et al.*, 2007). Evidências crescentes apoiam a ideia que o estresse oxidativo e a neuroinflamação levam ao desenvolvimento de doenças neurodegenerativas (Barnham *et al.*, 2004; Lin e Beal, 2006; Yadav *et al.*, 2013; Gonza'lez e Pacheco, 2014; Islam, 2017; Santos *et al.*, 2016). O estresse oxidativo e o dano mitocondrial têm sido implicados na patogênese de várias doenças neurodegenerativas, incluindo DA, DP e ELA. Ele está associado à inflamação induzida pelas células imunes e gliais, alimentando um ao outro, e juntos contribuem para o desenvolvimento de neurodegeneração. O estresse oxidativo induz a ativação da microglia e astrócitos com um conseqüente aumento da produção de mediadores pró-inflamatórios e, por sua vez, a ativação glial leva a liberação de radicais tóxicos, exacerbando o dano neuronal. Conseqüentemente, o dano celular resultante amplifica o processo inflamatório, com ativação glial e recrutamento de leucócitos, amplificando a inflamação (Rekatsina *et al.*, 2020). O estresse oxidativo severo ainda produz danos ao DNA, às proteínas e peroxidação lipídica, resultando em injúria e morte celular (Halliwell, 1996).

Figura 14 - Estresse oxidativo, neuroinflamação e neurodegeneração



Fonte: Rekatsina *et al.*, 2020.

O estresse oxidativo ocorre quando a produção de moléculas oxidantes não é contrabalanceada adequadamente pela produção de defesas antioxidantes naturais. Os radicais livres são subprodutos naturais fisiológicos do metabolismo aeróbio normal, mas sob condições patológicas, os radicais livres podem ser produzidos de forma anormal, em elevadas e prejudiciais quantidades (Maritim *et al.*, 2003). O estresse oxidativo pode ser definido como uma concentração elevada de radicais acima do limite reconhecido como sendo tóxico (Schulz *et al.*, 2000). Em outras palavras, o estresse oxidativo pode ocorrer por causa da produção excessiva de EROS ou defesas antioxidantes atenuadas ou uma combinação de ambos (Schulz *et al.*, 2000; Solleiro-Villavicencio e Rivas-Arancibia, 2018). Agentes oxidantes aumentam a produção de EROS e levam a exaustão de enzimas de defesa antioxidantes, como superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GPx) e catalase (CAT) (Özay *et al.*, 2017). Tanto a SOD quanto a GPx são enzimas antioxidantes responsáveis por catalisar a redução da glutathiona (Halima *et al.*, 2017). Por outro lado, a peroxidação lipídica que se refere à degradação oxidativa de lipídios, aumenta a permeabilidade da membrana, levando a danos celulares. O malondialdeído (MDA) tem sido utilizado como um índice de peroxidação lipídica (Li *et al.*, 2019).

O excesso de radicais livres pode causar mudanças do tipo patológicas neurodegenerativas por meio de reações de peroxidação lipídica. Evidências mostraram que radicais livres podem estar envolvidos nos mecanismos da DA e que níveis mais elevados de produtos de peroxidação lipídica podem estar no SNC em pacientes com DA (Pandurariu *et al.*, 2010). Em modelos animais de DA, foi mostrado um aumento na peroxidação lipídica e níveis elevados de EROS, além de diminuição na taxa de sobrevivência dos neurônios (Butterfield, 2002). Resultados de Casado (2008) mostraram uma diminuição da atividade da SOD, CAT, GPx, glutathiona redutase (GR) e aumento nos níveis de MDA em pacientes com DA (Casado *et al.*, 2008). Aumento dos níveis de MDA foi verificado no córtex temporal, hipocampo e córtex occipital de pacientes com DA (Palmer e Burns, 1994; Marcus *et al.*, 1998; DiCiero Miranda *et al.*, 2000). Um recente estudo demonstrou carbonilação de proteínas nas fases iniciais de pacientes com DA, mostrando a relação do estresse oxidativo com a progressão da doença (Di Domenico *et al.*, 2016). Além do mais, estudos já demonstraram aumento dos níveis de carbonilação de proteínas no hipocampo e giro denteado em pacientes com DA (Hensley *et al.*, 1995; Aksenov *et al.*, 2001).

A disfunção mitocondrial está envolvida com a DA. Em modelo animal transgênico para DA (APP), foi visto aumento dos níveis de EROS e disfunção mitocondrial nas fases iniciais da doença (Fang *et al.*, 2016). O acúmulo de espécies reativas de oxigênio está

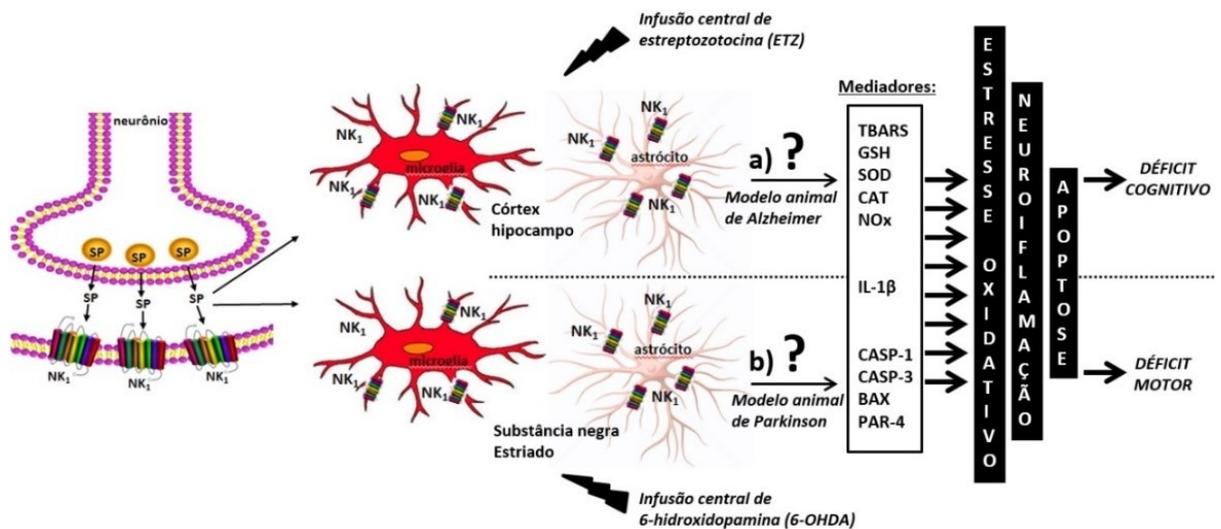
associado com disfunção mitocondrial e radicais livres podem ser produzidos por reações bioquímicas mitocondriais na DA. A importância das mitocôndrias pode ser fundamental na sobrevivência das células nervosas através do controle exercido tanto em metabolismo energético e em várias vias apoptóticas (Padurariu *et al.*, 2013). É uma vez que as mitocôndrias são o local mais importante produtor de EROS, elas são consideradas o peão central na DA. Estudos de análises morfológicas mostraram uma clara relação entre a redução no número e tamanho de mitocôndrias na DA (Padurariu *et al.*, 2013). Portanto, acredita-se que disfunções mitocondriais geram graves distúrbios metabólicos na célula, impedindo o funcionamento normal dos neurônios, podendo iniciar a apoptose celular e resultar em DA.

O acúmulo do peptídeo A β , disfunção mitocondrial e diminuição do aporte energético estão envolvidos com as fases iniciais de pacientes com DA (Radi *et al.*, 2014). Alguns estudos mostraram que o estresse oxidativo pode levar à indução intralisossomal de amiloide para desestabilizar membranas lisossomais e estar indiretamente envolvido na gênese da amilóide, resultando em morte celular (Zheng *et al.*, 2006). Outro estudo, também mostrou, em um modelo animal da DA induzido pela administração de ETZ, aumento dos níveis de MDA, diminuição da atividade das enzimas SOD e CAT (Hassanzadeh *et al.*, 2015). Mais uma vez mostrando o papel do estresse oxidativo na DA. O estresse oxidativo também é uma teoria fundamental nos mecanismos de DP. Quando uma célula está em estresse oxidativo e a quantidade de EROS excede o limite, a célula não funciona efetivamente o que leva à morte celular (Varcin *et al.*, 2012). Estudos mostram que alguns marcadores de estresse oxidativo foram observados no soro e no LCR de pacientes com DP. Isto é de suma importância, uma vez que, neurônios dopaminérgicos são particularmente suscetíveis a alto nível de EROS (Vinish *et al.*, 2011; Varcin *et al.*, 2012), pois antioxidantes cruciais, como a glutatona, são baixos em neurônios dopaminérgicos (Stefanoni *et al.*, 2011). O estresse oxidativo também está relacionado à disfunção mitocondrial na DP. Estudos demonstraram que o DNA mitocondrial foi alterado em alguns casos de DP e que esta alteração promove um maior risco para a doença, através do aumentando da formação de EROS (Autere *et al.*, 2004). Deficiências do complexo mitocondrial I foram observadas também no cérebro e em outros tecidos de estudos de DP pós-morte (Schapira e Jenner 2011). E ainda, modelos animais com DP induzidos com a toxina MPTP criam parkinsonismo através da interação com o complexo mitocondrial I (Schapira *et al.*, 1990). Portanto essas descobertas também mostram uma ligação entre o estresse oxidativo e disfunção mitocondrial na DP.

De modo geral o estresse oxidativo desempenha papel central nas doenças neurodegenerativas, amplificando a resposta inflamatória, levando a um potencial dano

tecidual, resultado do aumento da produção de EROS e ERNS (Halliwell e Gutteridge, 1995, 1997; Ricciarelli *et al.*, 2007). Uma revisão sistemática sobre os mecanismos envolvidos em doenças neurodegenerativas mostra que a geração de radicais livres ativa múltiplas vias nocivas associadas ao desenvolvimento de doenças neurodegenerativas (Yaribeygi *et al.*, 2018), no entanto, a forma como esses vários mecanismos interagem entre si ainda não é totalmente conhecida. Nesta ideia, a produção de radicais livres representa um potencial alvo a tentar identificar e compreender a natureza e o papel dos mediadores neuroinflamatórios envolvidos na patogênese destas doenças. Considerando as evidências do envolvimento da SP e dos receptores neurocinérgicos NK₁ (RNK₁) em condições neurodegenerativas, o presente trabalho partiu da hipótese de que o antagonismo dos RNK₁ exerce efeito protetor contra as alterações comportamentais (cognitivas e motoras), oxidativas e neuroinflamatórias em modelos experimentais de DA e DP, conforme ilustrado na Figura 15.

Figura 15 - Investigação da participação dos receptores neurocinérgicos NK₁ para substância P (SP) nas alterações comportamentais (cognitivas e motoras), oxidativas e neuroinflamatórias/neurodegenerativas em modelos experimentais de doença de Alzheimer (a) e Parkinson (b).



Fonte: Cedido pelo Prof. Dr. Filipe S. Duarte (2022).

3 ARTIGO 1 - NEUROKININAS NAS DOENÇAS DE ALZHEIMER E PARKINSON: VILÕES OU HERÓIS? UMA REVISÃO BASEADA NA PESQUISA PRÉ-CLÍNICA.

Resumo: A prevalência das doenças neurodegenerativas, como Alzheimer (DA) e Parkinson (DP), aumenta com o avanço da idade da população, com a expectativa de um aumento exponencial para o número de casos de pacientes afetados em todo o mundo nas próximas décadas. Infelizmente, pouco progresso ocorreu em termos de tratamento dessas condições neurológicas tão incapacitantes e ainda incuráveis. A compreensão precisa dos mecanismos etiopatogênicos envolvidos nessas doenças neurodegenerativas é um passo crucial para o desenvolvimento de drogas modificadoras da doença e capazes de impedir o surgimento ou pelo menos retardar a sua progressão. As neurokininas são um grupo de neuropeptídeos amplamente distribuídos por todo o sistema nervoso central que vem sendo apontadas estar envolvidas nas doenças neurodegenerativas. Seus principais representantes são a substância P (SP), a neurokinina A (NKA) e a neurokinina B (NKB), no entanto, a real contribuição do sistema neurokinérgico em condições neurodegenerativas ainda permanece inconclusiva, com parte das evidências sugerindo um papel neuroprotetor para as neurokininas, enquanto outras propondo efeitos neurotóxicos para os ligantes endógenos devido ao efeito neuroprotetor observado com o uso de antagonistas de receptores neurokinérgicos. O presente artigo de revisão foca sobre a associação das três principais neurokininas SP, NKA e NKB, bem como seus receptores neurokinérgicos NK₁, NK₂ e NK₃, respectivamente, sobre determinados aspectos relacionados à DA e DP.

Palavras-chaves: alzheimer; Parkinson; substância P; neurokinina A; neurocinina B.

1 Introdução

As doenças neurodegenerativas compreendem um espectro de patologias progressivas, crônicas e irreversíveis, estando associadas à perda da função neuronal que leva ao comprometimento físico e mental, diminuindo significativamente a qualidade de vida dos acometidos (Katsnelson *et al.*, 2016). Dentre elas as mais prevalentes mundialmente são a doença de Alzheimer (DA) e a doença de Parkinson (DP) (De Lau e Breteler, 2006; Prince *et al.*, 2016).

A DA é a causa mais comum de demência e afeta mais de 20 milhões de pessoas em todo o mundo (Mayeux e Stern, 2012). A principal característica da doença é o déficit gradual da memória, acompanhado do declínio em outros domínios cognitivos, além de alterações comportamentais e emocionais (González e Pacheco, 2014). O processo fisiopatológico da

DA é marcado pela acentuada perda neuronal, principalmente de neurônios colinérgicos, que conduz à depleção do conteúdo da acetilcolina (Li *et al.*, 2011) nas regiões do córtex cerebral, hipocampo, prosencéfalo basal, locus cerúleo e amígdala (Pakaski e Kalman, 2008). Já na DP ocorre perda de 50% a 70% de todos os neurônios dopaminérgicos na substância negra, que leva ao desenvolvimento dos sintomas motores de forma progressiva como marca registrada da doença (Lees, 2007). Os sinais cardinais da DP incluem bradicinesia, tremor de repouso, rigidez e instabilidade postural. Até o presente momento não existe um tratamento farmacológico capaz de curar tanto a DA quanto a DP, e as opções terapêuticas atuais visam apenas aliviar paliativamente os sintomas e retardar o avanço de ambas as doenças. Neste sentido, torna-se imperativo a identificação e desenvolvimento de abordagens terapêuticas mais racionais, com mecanismos de ação inovadores, maior eficácia e melhor perfil de reações adversas.

As neurocininas são um grupo de neuropeptídeos amplamente distribuídos por todo o sistema nervoso (Otsuka e Yoshioka, 1993), incluindo os três principais membros: substância P (SP), neurocinina A (NKA) e neurocinina B (NKB) (Pennefather *et al.*, 2004). Estudos sugerem que as neurocininas possam estar envolvidas com a atividade neuroprotetora e neurodegenerativa (Otsuka e Yoshioka, 1993; Severini *et al.*, 2002; Onaga, 2014; Muñoz e Coveñas, 2020), uma vez que esses neuropeptídeos participam da transmissão da informação sensorial e nociceptiva (Thornton e Vink, 2012), bem como de condições imunológicas (Chernova *et al.*, 2009; Johnson *et al.*, 2017), neuroinflamatórias (Rasley *et al.*, 2004; Chauhan *et al.*, 2008) e neuroinfecciosas (Martinez e Philipp, 2016). Neste sentido, as neurocininas e seus receptores alvos, vêm sendo estudados diante da necessidade de desmistificar a fisiopatogenia da DA e DP para, quiçá, identificar pontos estratégicos de intervenção farmacológica que permitam o desenvolvimento futuro de novos tratamentos para tais condições neurológicas tão incapacitantes e, ainda, incuráveis. Assim, o presente artigo de revisão tem por objetivo sumarizar e discutir os principais resultados de pesquisas pré-clínicas que inter-relacionam as neurocininas SP, NKA e NKB às principais alterações fisiopatológicas e comportamentais observadas em modelos *in vitro* e *in vivo* de DA e DP.

2 Neurocininas

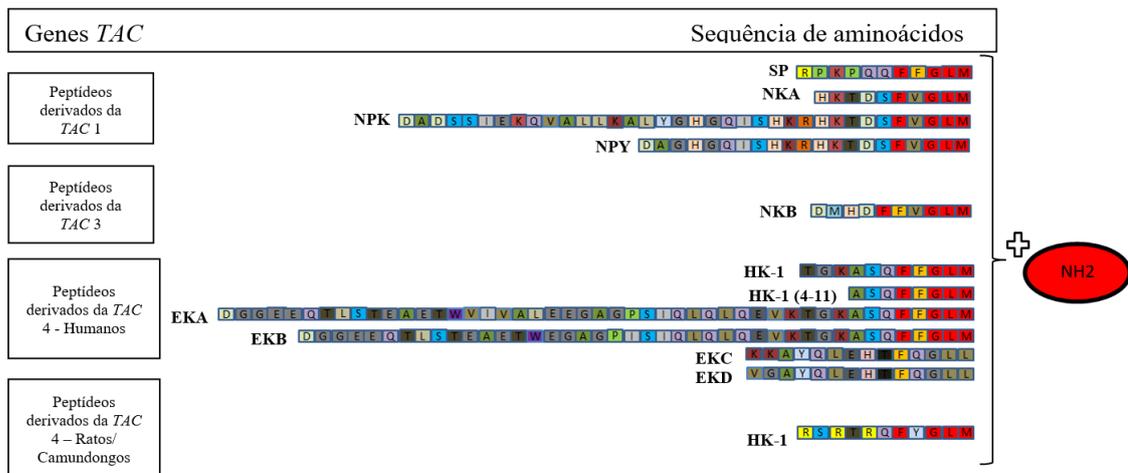
As neurocininas ou taquicinininas são assim chamadas devido a sua capacidade rápida de estimular a contração do músculo intestinal, em comparação à ação mais lenta da bradicinina. Elas possuem em comum a sequência peptídica carboxi-terminal (-Phe-X-Gly-Leu-Met-NH₂; com o X representando resíduos de aminoácidos hidrofóbicos ou aromáticos)

que é de fundamental importância para a interação com os seus receptores e ativação celular, enquanto a sequência amino-terminal confere especificidade ao subtipo de receptor (Gerard *et al.*, 1991). Em mamíferos, as taucinininas são designadas como neurocininas, destacando-se como principais membros dessa família a substância P (SP), neurocinina A (NKA), neurocinina B (NKB), neurocinina K (neuropeptídeo K, NPK), neurocinina γ (neuropeptídeo γ , NP γ) e hemocinina-1 (HK-1). Três genes são responsáveis por codificar as neurocininas: o gene *Tac1* codifica a SP, NKA, NPK e NP γ , o gene *Tac3* codifica apenas a NKB, enquanto o gene *Tac4* codifica a HK-1 e as endocininas A, B, C e D (EKA, EKB, EKC e EKD) (Page *et al.*, 2003; Steinhoff *et al.*, 2014).

A SP foi a primeira neurocinina identificada em mamíferos por Von Euler e Gaddum, em 1931, sendo caracterizada quimicamente 40 anos após (Von Euler e Gaddum, 1931; Chang *et al.*, 1971). A NKA e NKB foram identificadas por diferentes grupos de pesquisadores em 1983 e 1984 (Kimura *et al.*, 1983; Kangawa *et al.*, 1983; Nawa *et al.*, 1984). As estruturas primárias da SP, NKA e NKB são muito semelhantes em todas as espécies de mamíferos (Douglas e Leeman, 2011).

Em relação à distribuição anatômica das neurocininas, cada uma delas possui suas próprias peculiaridades. A SP está amplamente distribuída pelo sistema nervoso central (SNC) e periférico (SNP). Estudos de imunorreatividade da SP em ratos revelaram a presença em elevada quantidade na substância negra, hipotálamo, hipófise posterior, amígdala, substância cinzenta periaquedutal e no corno posterior da medula espinhal. Também foram identificados, em uma menor quantidade, nas regiões do tubérculo olfativo, núcleo caudado e globo pálido, locus cerúleo, núcleo subtalâmico e no corno ventral da medula espinhal. Já em humanos as áreas mais abundantes de SP são os núcleos da base (substância negra, globo pálido, caudado e putâmen), amígdala, hipotálamo e locus cerúleo (Severini *et al.*, 2002). A SP também está expressa em células não-neuronais como fibroblastos, mastócitos, células do músculo liso e células do sistema imunológico (macrófagos, eosinófilos, linfócitos, monócitos, células dendríticas), bem como em vários fluidos corporais (leite materno, líquido cefalorraquidiano, sangue) (Steinhoff *et al.*, 2014; Muñoz e Coveñas, 2019). Em certas áreas cerebrais, a concentração das neurocininas é aproximadamente na ordem de nanomolar e a quantidade de SP está mais abundante na substância cinzenta do que na substância branca (Ebner e Singewald, 2006). Em ratos, tanto a densidade quanto a distribuição de neurônios contendo SP mudam significativamente durante os períodos de vida, atingindo o nível máximo entre os dias 5 e 15 pós-natal e diminuindo a densidade depois (Inagaki *et al.*, 1982, Sakanaka *et al.*, 1982).

Figura 1 - Sequências de aminoácidos e peptídeos relacionados ao gene das neurocininas.



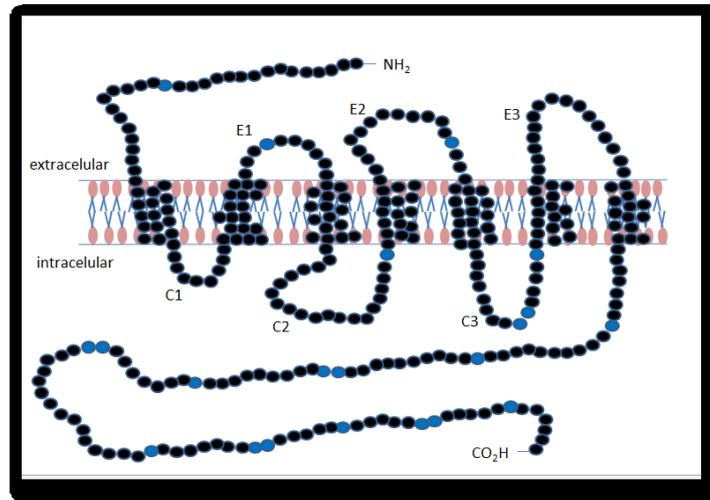
Legenda: Presença da sequência de aminoácidos: X-PheX-Gly-Leu-Met-NH₂ (vermelho) em todas as taucinininas, exceto no EKC e EKD, que não são taucinininas embora derivem do gene *Tac* 4. Os peptídeos HK-1 são únicos, pois diferem entre espécies de mamíferos, enquanto outras taucinininas são conservadas (Adaptado de Steinhoff *et al.*, 2014).

A NKA é encontrada no SNC bem como em neurônios sensoriais aferentes primários que suprem uma série de tecidos periféricos (Pennefather *et al.*, 2004). A NKA mostra uma ampla distribuição pelo SNC e SNP de mamíferos, se apresentando de forma ainda mais difusa em relação àquela observada para NKB (Coveñas *et al.*, 2003; Duque *et al.*, 2013). A NKB também está presente em áreas específicas do SNC (Pennefather *et al.*, 2004), incluindo o córtex (frontal, parietal e cingulado), vários núcleos da amígdala, hipocampo e estruturas mesencefálicas (Langlois *et al.*, 2001; Shughrue *et al.*, 1996; Stoessl, 1994)

2.1 Receptores neurocinérgicos

Os efeitos biológicos promovidos pelas neurocininas são mediados por três receptores neurocinérgicos distintos denominados NK₁R, NK₂R, NK₃R, os quais são codificados pelos genes *TACR1*, *TACR2* e *TACR3*, respectivamente (Steinhoff *et al.*, 2014). Os três tipos de receptores neurocinérgicos pertencem à superfamília de receptores acoplados à proteína G (GPCRs) (semelhantes à rodopsina), sendo constituídos por um domínio amino-terminal citoplasmático extracelular e um domínio carboxi-terminal intracelular, conectados entre si por sete hélices hidrofóbicas transmembranares compartilhando a mesma unidade estrutural: três alças extracelulares “EL1, EL2 e EL3” e três intracelulares “C1, C2 e C3”, com a possibilidade de ocorrência de uma quarta alça intracelular devido à palmitoilação de resíduos de cisteína (Cys), flanqueada por sete domínios intermembranares (TM 1-VII) (Maggi, 1995; Pennefather *et al.*, 2004).

Figura 2 - Modelo esquemático dos receptores neurocinérgicos



Legenda: Os receptores NK₁, NK₂ e NK₃ diferem quanto ao seu comprimento. O receptor NK₁ tem 407 aminoácidos e uma massa molecular relativa de 46 kDa (Hopkins *et al.*, 2001). O receptor NK₂ e NK₃ consistem em 398 e 465 aminoácidos, respectivamente, sendo NK₃R o mais longo dos três receptores (Fong *et al.*, 1992; Mantyh *et al.*, 1996; Caberlotto *et al.*, 2003) (Adaptado de Garcia-Recio e Gascón, 2015).

Apesar de agirem como agonistas totais para um dado receptor neurocinérgico, cada neurocinina possui uma seletividade moderada entre os 3 tipos de receptores neurocinérgicos, com a SP, NKA e NKB exibindo uma ligação preferencial pelos receptores NK₁, NK₂ e NK₃, respectivamente (Regoli *et al.*, 1994; Maggi, 2000; Pennefather *et al.*, 2004). Pelo critério de potência de seus agonistas endógenos para um determinado receptor neurocinérgico, a ordem de potência para os receptores NK₁ é SP > NKA > NKB, para os receptores NK₂ é NKA > NKB > SP, enquanto para os receptores NK₃ é NKB > NKA > SP (Regoli *et al.*, 1994; Maggi, 2000). Sabe-se que a afinidade da NKA e NKB pelos NK₁R é, respectivamente, 100 e 500 vezes menor do que aquela mostrada para a SP (Steinhoff *et al.*, 2014).

Quanto à distribuição dos receptores neurocinérgicos, os NK₁R estão amplamente localizados por todo o SNC e SNP, também sendo encontrados no músculo liso, baço, placenta, sistema imunológico (linfócitos, macrófagos, leucócitos, células dendríticas), células endoteliais, pele, glândula tireoide, timo, pulmão, nódulos linfáticos, glândulas salivares, trato genitourinários/gastrointestinais e células cancerosas (Steinhoff *et al.*, 2014; Muñoz e Coveñas, 2020). No SNC, os receptores NK₁ estão presentes em várias regiões do sistema límbico envolvidas na regulação e expressão das emoções e do comportamento aversivo, incluindo hipocampo, septo, amígdala, substância cinzenta periaquedutal, hipotálamo, córtex pré-frontal e estriado ventral (Nakaya *et al.*, 1994).

Os receptores NK₂R estão localizados principalmente em tecidos periféricos, sendo encontrados de forma muito restrita no SNC (Pennefather *et al.*, 2004). A presença desses

receptores no SNC tem sido investigada utilizando diferentes radioligantes, mas devido a pobre seletividade dos ligantes utilizados, esses resultados não são convincentes (Maggi, 1995). Por sua vez, os NK₃R possuem baixa expressão em tecidos periféricos, mas mostram uma ampla distribuição por todo o SNC de mamíferos, se apresentando de forma ainda mais difundida do que aquela observada para os NK₂R (Almeida *et al.*, 2004; Ebner *et al.*, 2009), sendo encontrados especialmente em neurônios gabaérgicos do estriado e neurônios dopaminérgicos na substância negra (Shughure *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1998; Preston *et al.*, 2000; Furuta *et al.*, 2004).

Devido à ampla distribuição das neurocininas e de seus receptores no SNC e SNP (Mantyh, 2002), bem como no sistema imunológico (Harrison e Geppetti, 2001; Satake e Kawada, 2006), esse grupo de neuropeptídeos vêm sendo explorado quanto à sua capacidade em mediar uma gama de processos fisiopatológicos, tornando-os alvos atraentes para intervenção terapêutica para determinados tipos de transtornos psiquiátricos e doenças neurológicas.

3 Ações fisiopatológicas das neurocininas

3.1 Substância P (SP)

Uma gama de evidências suporta o envolvimento das neurocininas em processos inflamatórios. A SP e os receptores NK₁, por exemplo, são conhecidos estarem envolvidos na nocicepção, na inflamação neurogênica (Lembeck e Holzer, 1979; Otsuka e Yoshioka, 1993; Mantyh *et al.*, 1997), na inflamação de pele, na síndrome do intestino irritável associada ao câncer de cólon (Onaga, 2004) e na progressão do câncer gástrico (Feng *et al.*, 2011). Devido à expressão da SP e dos receptores NK₁ em diferentes tipos de células imunes, um conjunto de estudos mostram que esse sistema neurocinérgico exerce um papel modulatório sobre o sistema imunológico (Bozic *et al.*, 1996; Kraneveld e Nijkamp, 2001), estando, portanto, associado à múltiplas condições imunopatológicas, entre elas na doença inflamatória intestinal, esclerose múltipla, artrite reumatoide, psoríase, inflamação das vias aéreas e tosse associados à asma, entre outras (Advenier *et al.*, 1997; 1999; Mishra e Lal, 2021). Além dessas atividades, a SP participa de um amplo espectro de processos biológicos: crescimento e desenvolvimento de tecido neuronal (Park *et al.*, 2007), estimulação do crescimento de células *in vitro* (Reid *et al.*, 1993), cicatrização de feridas (Brain, 1997), regulação dos mecanismos circulatórios e respiratórios a nível central e periférico (Bonham, 1995), restauração da função contrátil e do fluxo coronário (Picard *et al.*, 1994; Ustinova *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 2012), influência na secreção das glândulas salivares (Ekstrom, 1989, Suzuki *et al.*, 2013),

inflamação (Katsanos et al., 2008) e vazamento microvascular e extravasamento plasmático com a formação de edema subsequente (McDonald *et al.*, 1996; de Vries *et al.*, 2001).

3.2 Neurocinina A (NKA)

A NKA atua na regulação de diversos sistemas, como: sistema imunológico, hematopoese, motilidade intestinal, câncer e paladar (Julia *et al.*, 1994; Covenas *et al.*, 2007; Onaga, 2014; Muñoz e Coveñas, 2020). Esta neurocinina e o receptor NK₂ estão envolvidos na fisiopatologia da asma e em outros mecanismos respiratórios/cardiovasculares (vasodilatação), principalmente a hiperresponsividade das vias aéreas (Naline *et al.*, 1989; Maggi e Giachetti, 1995). A ação vasodilatadora é uma das principais funções da NKA, produzindo aumento da permeabilidade vascular, e contribuindo para a manutenção do processo inflamatório e dos mecanismos relacionados transmissão à dor (McCarson e Krause, 1994; Ferreira, 1995; Julia *et al.*, 1994). A NKA é a neurocinina mais ativa no duodeno e na bexiga urinária de ratos (Tousignant *et al.*, 1987), sua ligação com o receptor NK₂ é capaz de mediar o efeito de contração da musculatura lisa, especialmente da bexiga urinária (Zeng *et al.*, 1995). Estudos recentes mostram o envolvimento desta neurocinina no sistema endócrino, participando da modulação de secreções hormonais, como a prolactina (Czelejewska *et al.*, 2020), além de elevados níveis de NKA sugerir um péssimo prognóstico em tumores neuroendócrinos (Ardill *et al.*, 2016).

3.3 Neurocinina B (NKB)

Assim como a NKA, a NKB também participa da modulação hormonal da prolactina (Czelejewska *et al.*, 2020), e regulação da secreção do hormônio gonadotrofina (Pinto et al., 2001), desempenhando um papel na maturação puberal (Navarro et al., 2012). Seu principal papel está relacionado ao envolvimento nos processos do sistema reprodutor. Trabalhos mostram um aumento da expressão da Tac 3 e um aumento dos níveis de NKB em ratas com pré-eclâmpsia (Page *et al.*, 2000; Page *et al.*, 2006; Salmam *et al.*, 2018); além de um papel parácrino na regulação do tônus vascular placentário- fetal (Beownbill *et al.*, 2003). Além disso, a NKB atua em mecanismos cardiovascular e respiratórios (Coveñas *et al.*, 2007; Onaga, 2014), sendo encontrado níveis de NKB baixos em pacientes com infarto agudo do miocárdio, o que mostra seu envolvimento em eventos ateroscleróticos (Akkoyun *et al.*, 2015), bem como a participação na broncoconstrição mediada pelo receptor NK₃ (Corboz et al., 2010), na mediação da tosse e hiper-reatividade brônquica também foi sugerida (Daoui *et al.*, 1998; Hay *et al.*, 2002). A NKB pode atuar ainda na ativação da formação de osteoclastos e reabsorção óssea através de sua ligação ao NK₃ (Ichiki *et al.*, 2011)

4 Neurocininas e sistema nervoso central

Por décadas as neurocininas vêm sendo apontadas estarem envolvidas na fisiopatologia de diferentes tipos de transtornos psiquiátricos, especialmente na ansiedade, depressão e esquizofrenia (Black, 2002; Dawson e Porter, 2013; Eapen *et al.*, 2019). Mais recentemente, o campo de pesquisa sobre o papel funcional das neurocininas vêm sendo estendido também a condições neurológicas, especialmente aquelas associadas à neuroinflamação, como a DA, DP, atrofia sistêmica múltipla (ASM) e esclerose múltipla (EM) (Johnson *et al.*, 2017).

No SNC, a SP regula diversas funções, como comportamento emocional, estresse, ansiedade e depressão (Kormos e Gaszner, 2013). A SP está envolvida na integração das respostas emocionais ao estresse, sugerindo que a patogênese da depressão e da ansiedade também pode ser devido a uma alteração da via de sinalização do SP (Hutson *et al.*, 2004; Ebner e Singewald, 2006). Dados experimentais sugerem que os antagonistas de receptores NK₁ ou NK₂ possuem efeitos do tipo antidepressivos e ansiolíticos (Griebel, 1999; Mantyh, 2002). Antagonistas de receptores NK₁ também mostraram serem eficazes contra o processo de traumatismo craniano, uma vez que apresentaram atenuação de diversos desfechos neurológicos, como: déficit de memória espacial e motor, ruptura da barreira hematoencefálica, perda de potencial da membrana mitocondrial, estresse oxidativo, neuroinflamação e morte celular em um modelo animal de traumatismo craniano (Li *et al.*, 2019). Por outro lado, a SP pode induzir a mitogênese por mecanismos autócrinos, parácrinos, endócrinos e/ou neuroendócrinos (Munoz e Covenas, 2013b).

A NKA apresenta uma atividade no sistema nervoso, exercendo um efeito excitatório, além de também estar envolvida em outras patologias como: depressão, esquizofrenia, epilepsia e ansiedade (Covenas *et al.*, 2007; Onaga, 2014; Muñoz e Coveñas, 2020). A NKB está implicada na modulação do medo e nos transtornos de humor (Griebel e Beeské, 2012). Esta neurocinina também está envolvida na patologia da esquizofrenia (Onaga, 2014; Ebner *et al.*, 2009). Já o papel do receptor NK₃ no que tange a ansiedade e depressão parece ser inconclusivo, uma vez que, estudos mostram o agonista e antagonista do receptor NK₃ como responsáveis por induzir tanto efeitos ansiogênicos quanto ansiolíticos (Picard *et al.*, 1994; Massi *et al.*, 2000). O receptor NK₃ participa também no controle dos neurônios dopaminérgicos da área tegmental ventral e na ligação aos íons cobre (Hether *et al.*, 2013).

Apesar da abundante distribuição das neurocininas e receptores neurocinérgicos, bem como uma quantidade elevada de estudos mostrando que as neurocininas estão relacionadas à diversas funções nos principais sistemas de órgãos (gastrointestinal, respiratório, urogenital,

dérmico, imunológico) e nos processos patológicos (inflamação, dor, câncer) (Steinhoff *et al.*, 2014); até o momento, em humanos, nenhum tratamento com agonista ou antagonista do receptor NK₂ ou NK₃ foi aprovado para ser administrado. Antagonistas de receptores NK₂ (por exemplo, saredutante, nepadutante, ibodutante) foram testados para o tratamento de transtorno depressivo maior, asma, distúrbios gastrointestinais e diarreia, enquanto os antagonistas de receptores NK₃ (por exemplo, osanetante, talnetante) foram usados para tratar depressão, transtorno do pânico e esquizofrenia. Apesar de considerados seguros, esses estudos foram abandonados devido à falta de eficácia (Ebner *et al.*, 2009; Griebel e Holsboer, 2012). Em relação aos antagonistas do receptor NK₁, apenas cinco deles foram aprovados em humanos (aprepitante, fosaprepitante, rolapitante, netupitante, fosnetupitante) para tratar o mesmo sintoma: náusea induzida por quimioterapia e vômito (Saito *et al.*, 2013; Muñoz e Coveñas, 2013).

Neste sentido, há muito o que ser discutido e desmitificado no que tange ao papel funcional das neurocininas e seus receptores no sistema nervoso e nas doenças neurogênicas. Tomando como norte o envolvimento das neurocininas nas patologias do SNC (Johnson *et al.*, 2017), destacamos então o papel destes neuropeptídios nas doenças neurodegenerativas: doença de Alzheimer (DA) e Parkinson (DP).

4.1 Envolvimento das neurocininas nas doenças de Alzheimer e Parkinson

4.1.1 Doença de Alzheimer

A DA é a doença neurodegenerativa mais prevalente, representando 60-80% de todos os casos de demência e afetando 24 milhões de pessoas em todo mundo (Reitz *et al.*, 2011; Mayeux e Stern, 2012). A DA esporádica ou de início tardio representa a forma mais comum da doença e seus sintomas se desenvolvem a partir dos 65 anos de idade. Já a DA de “início precoce” (genética) está relacionada a um padrão de herança autossômica dominante e representa 5 a 10% dos casos de DA, cujos sintomas antecedem os 65 anos (Knopman *et al.*, 2021). Ambas as formas da doença compartilham entre si muitas semelhanças entre as características clínicas e patológicas (Knopman *et al.*, 2021). A perda da memória ocorre de forma insidiosa, gradual, progressiva e irreversível, com a memória de trabalho e a declarativa de longo prazo sendo afetadas precocemente durante o curso da doença (Jahn, 2013). Normalmente os sintomas estão associados a outros prejuízos cognitivos, especialmente da função visuoespacial e executiva (agilidade mental), podendo vir acompanhados por alterações comportamentais e do humor (González e Pacheco, 2014).

O processo fisiopatológico da DA se caracteriza, ao menos em parte, pela perda progressiva de neurônios colinérgicos e depleção do conteúdo de acetilcolina (ACh),

principalmente em áreas corticais e formação hipocampal (Bartus *et al.*, 1982; Gallagher e Colombo, 1995). No cérebro de pacientes com DA também foi encontrada a presença de placas senis associadas ao acúmulo extracelular da proteína A β -amiloide e o depósito intracelular dos emaranhados neurofibrilares associados à hiperfosforilação da proteína *tau* do citoesqueleto microtubular (Querfurth e Laferia, 2010). Tem sido proposto que o acúmulo da proteína A β seria o evento responsável pela ativação da hiperfosforilação da proteína *tau*, e ambos contribuiriam para a perda progressiva de sinapses e morte neuronal, culminando no prejuízo cognitivo observados na doença (Selkoe, 1996; Selkoe *et al.*, 2012; Zheng *et al.*, 2002).

O tratamento farmacológico atual da DA é representado fundamentalmente pelos inibidores da enzima acetilcolinesterase (IACHÉ), como a donepezila, rivastigmina e galantamina (Olin e Schneider, 2001; Birks e Harvey 2003; Birks *et al.*, 2015). Entretanto, esta categoria de fármacos representa uma alternativa meramente paliativa por proporcionar benefícios apenas sintomáticos e de forma discreta sobre a cognição e o comportamento dos pacientes acometidos. Após décadas de experiências clínicas, a sustentação para o uso dos IACHÉ encontra-se ameaçada pelas evidências de sua limitada relação custo-eficácia em longo prazo, já que esses fármacos são incapazes de interferir diretamente sobre os mecanismos neurodegenerativos subjacentes à DA, e pelo fato do sistema colinérgico continuar a se deteriorar, a resposta ao uso dos IACHÉ diminui ao longo do tempo (Grutzendler e Morris, 2001). Outra opção de fármaco utilizado na clínica é a memantina, um antagonista dos receptores N-metil-Daspartato (NMDA), que atua suprimindo a excitotoxicidade mediada pelo glutamato (Reisberg *et al.*, 2003; Howard *et al.*, 2012). Infelizmente, até o presente momento, não há tratamentos farmacológicos comprovadamente capazes de curar a DA. Diante do crescimento da população idosa em escala mundial e do aumento exponencial de casos de DA com o avanço da idade, torna-se essencial o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas capazes de interromper ou reverter os eventos patogênicos responsáveis pela neurodegeneração subjacente à DA. Neste sentido, discutimos na sequência os principais achados relacionados as neurocininas em modelos animais de doença de DA, a fim de melhor compreender os principais mecanismos envolvidos na sua fisiopatogenia, na perspectiva de identificação e desenvolvimento de terapias farmacológicas com maior eficácia.

4.1.1.1 Substância P (SP) e receptores NK₁ na Doença de Alzheimer

A fisiopatologia da DA está relacionada ao processo neurodegenerativo induzido pelo acúmulo da proteína A β -amiloide, razão pela qual diversos trabalhos vêm utilizando, desde os

anos 90 até os dias atuais, a infusão central dessa neurotoxina na tentativa de construção de modelos animais que mimetizem as principais alterações comportamentais e fisiopatológicas da DA (Kowall *et al.*, 1991; Rush *et al.*, 1992; Pieri *et al.*, 2010; Campolongo *et al.*, 2013; Xiao *et al.*, 2021). Em 1991, Kowall *et al.*, utilizando uma única dose (3nmol) da A β -amiloide 1-40 no hipocampo, mostraram que essa neurotoxina induziu a 73% de perda neuronal em ratos. Baseado em estudos anteriores que mostraram que a SP foi capaz de inibir a retração dendrítica e axonal, além de morte neuronal induzida pela A β -amiloide em culturas de neurônios hipocampais (Yankner *et al.*, 1990), Kowal *et al.*, em 1991, decidiram investigar o possível efeito neuroprotetor da SP *in vivo*. Esses autores mostraram que a SP tanto co-injetada (2-200 pmol) com A β -1-40 no hipocampo de ratos quanto administrada sistemicamente (2-200 nmol/Kg) 30min antes da injeção intracerebral da A β -1-40 impede de maneira dose-dependente a perda neuronal induzida pela neurotoxina, sugerindo que a SP é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica e atuar localmente no cérebro bloqueando os efeitos neurodegenerativos induzidos pela A β -1-40 (Kowall *et al.*, 1991). Entretanto, Rush *et al.*, em 1992, utilizando um outro fragmento da proteína A β -amiloide, mostraram que a coadministração intra-hipocampal da SP (200nmol) com o peptídeo A β 25-35 (20nmol) não reduziu a perda neuronal induzida pela neurotoxina. Esses resultados divergentes serviram de estímulo para a condução de estudos subsequentes objetivando compreender melhor o possível envolvimento da SP e dos receptores NK₁ na DA.

Kart-Teke *et al.* (2004) investigaram o efeito da administração sistêmica do antagonista dos receptores NK₁ (SR140333) em ratos, mostrando uma facilitação da memória de longo prazo e um aumento de maneira dose-dependente dos níveis extracelulares de acetilcolina quantificada *in vivo* pela técnica de microdiálise no hipocampo. Em 2007, esse mesmo grupo de pesquisadores mostrou que o tratamento sistêmico com SR140333 na dose de 1mg/kg restabeleceu o prejuízo de memória do tipo episódica induzido por estresse em ratos, sugerindo um efeito promnésico para o antagonista NK₁, enquanto doses maiores (3 ou 9mg/kg) do SR140333 promoveram alterações motoras. Considerando que o hipocampo expressa uma alta densidade de receptores NK₁ (Maeno *et al.*, 1993) e representa uma estrutura chave envolvida nos mecanismos de codificação, consolidação e recuperação de memórias episódicas (Aggleton & Brown, 1999; Vargha-Khadem *et al.*, 1997), Kart-Teke *et al.* (2007) propuseram que o efeito promnésico promovido pelo antagonista NK₁ SR140333 resulta do aumento da neurotransmissão colinérgica hipocampal, o que torna os receptores NK₁ um interessante alvo molecular de intervenção farmacológica contra o déficit cognitivo presente nos estágios iniciais da DA.

A DA é marcada por processos de neuroinflamação, estresse oxidativo, diminuição de sinapses e pela acentuada perda neuronal, com consequentemente morte celular (Li *et al.*, 2011). Tem sido sugerido que o efluxo de íons potássio pelos canais de K^+ regula a excitabilidade neuronal (Birnbaum *et al.*, 2004), desempenhando um papel crítico no controle da morte neuronal (Yu, 2003). O aumento da atividade dos canais de K^+ dependentes de voltagem (Kv) na membrana plasmática induz a morte celular (Yu *et al.*, 1997, 1999; Lauritzen *et al.*, 2003), sugerindo seu envolvimento nos mecanismos de apoptose neuronal induzida pela proteína A β -amiloide (Yu *et al.*, 1998; Pannaccione *et al.*, 2007; Choi e Abbott, 2007). Neste sentido, Pierri *et al.* (2010) utilizando culturas de células granulares cerebelares (CGC) de ratos mostraram que a SP é capaz de proteger a apoptose induzida pelos peptídeos A β -25-35 e A β -1-42. Experimentos de *patch-clamp* mostraram que o aumento da amplitude de corrente IKA induzido pela A β -amiloide foi revertido pelo tratamento com SP (200nM). Além disso, a análise por western blot e os estudos de imunofluorescência revelaram que SP evitou a regulação positiva da expressão das subunidades dos canais Kv4.2 e Kv4.3, enquanto o tratamento com SR140333 (25nM), um antagonista dos receptores NK $_1$, reverteu parcialmente a atividade modulatória da SP.

Campolongo *et al.* (2013), em um estudo *in vivo* também mostraram pela técnica de western blot que a infusão intracerebroventricular da A β -25-35 (20 μ g) promove superexpressão das subunidades dos canais Kv1.4, Kv2.1 e Kv4.2 nas regiões de hipocampo e córtex cerebral, efeito que é reduzido pelo tratamento sistêmico (i.p.) por 7 dias com a SP (50 μ g/Kg). Além disso, a infusão do peptídeo A β -25-35 prejudicou o desempenho cognitivo no teste do labirinto aquático de Morris em ratos avaliados após 4 semanas da infusão da neurotoxina, efeito que foi bloqueado pelo tratamento com SP (Campolongo *et al.*, 2013). Esse estudo sugere que o aumento da expressão de canais Kv1.4, Kv2.1 e Kv4.2 em ratos tratados com o peptídeo A β -25-35 poderia ser, pelo menos em parte, responsável pelo déficit de memória observado nos animais. Além disso a SP desempenha um papel importante na regulação dos canais de K^+ envolvidos na regulação dos processos cognitivos e na morte neuronal mediada pelo peptídeo A β -25-35, o que faz da SP e os receptores NK $_1$ um importante alvo molecular que merece ser explorado para melhor compreender a fisiopatogenia e expandir as possibilidades terapêuticas para a DA (Pierri *et al.*, 2010; Campolongo *et al.*, 2013). Em contrapartida, Fernandes *et al.* (2017), utilizando um modelo animal de demência induzido pela exposição crônica ao cloreto de alumínio (AlCl $_3$, 10mg/Kg, i.p, 42 dias), revelaram que o tratamento sistêmico com N-acetil-L-triptofano (NAT, 50mg/kg, i.p, 28 dias), um antagonista dos receptores NK $_1$, foi capaz de melhorar

significativamente o prejuízo de memória espacial induzido pelo AlCl₃ em ratos avaliados no teste do labirinto aquático de Morris. Além disso, o tratamento com NAT (30 e 50 mg/kg) preveniu a redução na atividade da enzima acetilcolinesterase e nos níveis de glutatona no hipocampo induzidos pelo AlCl₃. Esses autores sugerem que o efeito neuroprotetor do antagonista NK₁ NAT pode estar relacionado à sua capacidade de combater a neuroinflamação, a geração de radicais livres, bem como pelo bloqueio de vias pró-apoptóticas (Fernandes *et al.*, 2017). *In vitro*, a SP é conhecida aumentar a permeabilidade da barreira hematoencefálica induzida pelo TNF- α e IFN- γ , efeito que é bloqueado pelo antagonista de receptores NK₁ Spantide, sugerindo um papel patogênico para a SP em condições neuroinflamatórias (Annunziata *et al.*, 2002). Por outro lado, a SP também vem sendo apontada desempenhar um papel neuroprotetor. Os níveis dessa neurocinina se apresentam reduzidos em regiões corticais de tecidos cerebrais *post-mortem* de pacientes com DA, embora resultados conflitantes tenham sido descritos, com níveis elevados ou reduzidos de SP sendo encontrados dependendo do estudo (Cramer *et al.*, 1985, Quigley e Kowall, 1991; Rösler *et al.*, 2001, Johansson *et al.*, 2015). Esses resultados contraditórios parecem estar relacionados, em parte, a diferentes sítios de ligação localizados no mesmo receptor NK₁ com estados conformacionais e vias de sinalização distintos, denominados sítios de alta afinidade (NK₁-M) e baixa afinidade (NK₁-m). A SP íntegra (não fragmentada) se liga ao sítio de alta afinidade NK₁-M estimulando a via da adenilil ciclase-cAMP, enquanto os fragmentos hexa- e heptapeptídicos C-terminais da SP se ligam ao sítio NK₁-m estimulando a via da fosfolipase C (Alves *et al.*, 2006). É possível que os antagonistas de receptores NK₁ difiram em sua afinidade em relação aos sítios de ligação NK₁-M e NK₁-m, ou que estimulam ambos os sítios dos receptores, enquanto a SP íntegra se liga apenas ao sítio de maior afinidade NK₁-M. Tais diferenças ajudam a explicar a razão pela qual a estimulação dos receptores NK₁ pela SP, bem como o bloqueio dos receptores NK₁ pelos antagonistas, podem resultar em efeitos comportamentais semelhantes como aqueles vistos em estudos de aprendizagem e memória, ou resultados opostos obtidos em análises de LTP hipocampal (Kart-Teke *et al.*, 2007).

4.1.1.2 Neurocinina A (NKA)/receptores NK₂ e neurocinina B (NKB)/receptores NK₃ na Doença de Alzheimer

Apesar da SP atuar como um ligante endógeno preferencial dos receptores NK₁, sabe-se que sua ação como um agonista desses receptores não é exclusiva para a SP, podendo a NKA e NKB também ligar-se a esses receptores e produzirem efeitos similares (Calvo *et al.*, 1996). Calvo *et al.* (1996) mostraram em cultura de células estriatais que os agonistas dos receptores NK₁ [Sar⁹, Met(O₂)¹¹]-Substância P], NK₂ [Nle¹⁰]-Neurocinina A] e NK₃ [Me-

Phe⁷]-Neurocinina B] foram capazes de bloquear a redução da atividade da enzima acetilcolinesterase promovida pelo ácido quinolínico, um agonista dos receptores NMDA. Enquanto o ácido quinolínico reduziu a atividade da enzima, os tratamentos foram capazes de proteger os neurônios colinérgicos, e manteve o nível de atividade da enzima acetilcolinesterase elevado mesmo na presença de ácido quinolínico. Além disso, o tratamento por si só com o agonista dos receptores NK₂ e NK₃ aumentou a atividade da enzima em comparação ao grupo controle, o que não foi observado para o tratamento com agonista dos receptores NK₁. Esses resultados mostram que os agonistas do receptor NK₂ e NK₃ estão envolvidos na indução de liberação de acetilcolina em fatias estriatais, assim como a SP. Calvo *et al.*, 1996, sugere que o efeito neuroprotetor das neurocininas podem estar relacionados ao aumento da atividade neuronal, e a regulação da síntese de fatores neutróficos pelas células gliais.

Tanto a NKA quanto a NKB injetadas por via intraseptal aumentaram os níveis de acetilcolina no hipocampo e na amígdala, mas não no prosencéfalo basal, enquanto a administração do antagonista do receptor NK₂ bloqueou o aumento da acetilcolina hipocampal e amigdalóide, sugerindo que a neurotransmissão colinérgica no hipocampo regula a função da amígdala através dos receptores NK₂ no septo medial (Schable *et al.*, 2012).

Neste sentido, Wenk *et al.* (1997), utilizando ratos Sprague-Daley, mostraram um efeito neuroprotetor para a NKB, uma vez que o tratamento central com a NKB (0,5µl/8,26mM) preveniu o declínio da atividade da acetilcolinesterase cortical promovida pela injeção de NMDA (0,5µl/0,03M) no núcleo basal magnocelular. Aplicação local de senktide, um agonista do receptor NK₃, na substância negra, áreas tegmental ventral e septal aumentam significativamente os níveis extracelulares de dopamina e acetilcolina. Este efeito foi bloqueado de maneira dose-dependente dose pelo antagonista seletivo do receptor NK₃ SR142801 (0,1-1mg/kg, i.p.), sugerindo que o receptor NK₃ desempenha um papel importante na modulação dos sistemas dopaminérgico e colinérgico (Marco *et al.*, 1998). A utilização sistemicamente do mesmo agonista de receptor NK₃, senktide, promoveu de maneira dose-dependente a memória episódica em roedores, e aumentaram os níveis de acetilcolina no córtex frontal, amígdala e hipocampo, fornecendo evidências para um papel dos receptores NK₃ na modulação colinérgica em conjunto com um papel no processamento da memória (Schäble *et al.*, 2011). Este papel dos receptores NK₃ na memória foi confirmado em outros trabalhos (Kameyama *et al.*, 1998; Zlomuzica *et al.*, 2008; Schäble *et al.*, 2012b). Inclusive, camundongos knockout apresentaram pior desempenho em testes comportamentais (esquiva

inibitória e labirinto aquático de Morris) em comparação a animais selvagens, de modo que ocorre um atraso significativo na aquisição de memória na ausência de receptores NK₃ (Siuciak *et al.*, 2007).

4.1.2 Doença de Parkinson

A doença de Parkinson (DP) é a segunda doença neurodegenerativa mais comum após a DA, com uma prevalência de 0,3% na população em geral, 1% nas pessoas com mais de 60 anos e 3% nas pessoas com idade superior a 80 anos (Miller e O’Callaghan, 2015). A DP é uma doença irreversível, progressiva e ainda incurável, (Gonza’lez e Pacheco 2014) com o paciente perdendo 50% a 70% de todos os neurônios dopaminérgicos na substância nigra com a progressão da doença, levando aos sintomas motores que são a marca registrada da DP (Lees, 2007). Os sintomas motores cardinais da DP incluem bradicinesia, tremor de repouso, rigidez e instabilidade postural; outras características incluem hiposmia, hipofonia, disfagia, mudanças na visão, micrografia, postura curvada e congelamento da marcha, entre outros (Ehringer e Homykiewi, 1960). A principal característica patológica microscópica da DP é a presença dos corpos de Lewy que são inclusões neuronais lameladas, eosinofílicas, intracitoplasmáticas de agregados fibrilados insolúveis de α -sinucleína e ubiquitina (Kalia e Lang, 2016).

A forma esporádica da DP é a mais comum, constituindo a maioria dos casos, enquanto a forma familiar decorrente de defeitos genéticos específicos corresponde a 5-10% dos casos cujos sintomas motores ocorrem de forma mais precoce (antes dos 45 anos) (Marder *et al.* 1996; Singleton *et al.*, 2013). O diagnóstico é feito exclusivamente através da avaliação dos sintomas clínicos do paciente, com os exames de neuroimagem e testes laboratoriais sendo reservados apenas a título de diagnóstico diferencial para exclusão de outras condições (Rizek *et al.*, 2016).

O tratamento farmacológico tem por foco as alterações motoras da DP e age aumentando a sinalização da dopamina por mecanismos envolvendo a substituição direta (por exemplo, levodopa), agonismo do receptor de dopamina (por exemplo, pramipexol, lisurida, pergolida, rotigotina, ropinirol) e a redução do metabolismo de dopamina via inibição da monoamino-oxidase-B (MAO-B) (por exemplo, selegilina e rasagilina) ou inibição da catecol-o-metiltransferase (COMT) (por exemplo, entacapona) (Rizek *et al.*, 2016). A levodopa atinge um controle um pouco melhor dos sintomas motores da doença de Parkinson do que os agonistas da dopamina e os inibidores do metabolismo da dopamina, mas as discinesias e as flutuações motoras (fenômeno “liga-desliga”) se desenvolvem após uso prolongado ou tratamento com altas doses (Gray *et al.*, 2014). Pacientes com DP de início

precoce são mais propensos a desenvolver movimentos anormais (discinesia) induzidos pela levodopa, sendo frequentemente introduzidos os agonistas da dopamina como tratamento inicial; entretanto, esta vantagem inicial dos agonistas da dopamina sobre levodopa diminui ao longo do tempo (cerca de 10 anos) (Connolly *et al.*, 2014). Os anticolinérgicos (por exemplo, trihexifenidil, benztropina e biperideno) são especialmente destinados a pacientes com DP de início precoce e tremor grave, mas não é a classe farmacológica de primeira escolha devido à eficácia limitada e propensão a efeitos adversos neuropsiquiátricos (Grimes *et al.*, 2012). De modo geral, apesar do rol de medicamentos disponíveis para o tratamento da DP, eles são bastante limitados e apresentam diversos efeitos indesejáveis, sendo utilizados apenas como tratamento paliativo dos sintomas. Neste sentido, entendemos a busca incansável por novas opções de intervenção farmacológica como uma alternativa de tratamento futuro mais eficaz para esta patologia.

4.1.2.1 Substância P (SP) e receptores NK₁ na Doença de Parkinson

Evidências mostram que a infusão de SP ou do seu análogo DiMe-C7 nas regiões da substância nigra ou área tegmental ventral de ratos estimula a taxa de disparo neuronal aumentando a liberação de dopamina no estriado e no núcleo accumbens (Barnes *et al.*, 1990; Reid *et al.*, 1990-A). Essa hipótese é sustentada por um estudo *in vivo* realizado pela técnica de microdiálise que mostra um efeito indireto da SP sobre a liberação de glutamato no estriado (Marti *et al.*, 2005), e o glutamato por sua vez aumenta tanto a liberação quanto a síntese da enzima tirosina hidroxilase via estimulação de receptores NMDA, encontrados em terminais estriados dopaminérgicos (Reid *et al.*, 1990-B; Johnson e Jeng, 1991; Arias-Montano *et al.*, 1992).

Os estudos que relacionam o envolvimento do sistema neurocinérgico mediado pela SP e receptores NK₁ na DP são divididos em dois grandes grupos. O primeiro deles reúne um conjunto de evidências para o papel neuroprotetor da SP diante de insultos ocasionados sobre o sistema dopaminérgico, enquanto o segundo grupo de pesquisadores propõem que os efeitos neuroprotetores são resultantes do bloqueio dos receptores da SP pelos antagonistas NK₁, atribuindo assim, um efeito neurotóxico para a SP. De qualquer maneira, é notório o envolvimento da SP e de seus receptores NK₁ na DP, e possivelmente em outras doenças de caráter neurodegenerativo. Utilizando um modelo animal de DP induzido pela administração sistêmica de MPTP ou reserpina, Kryzhanovskii *et al.* mostraram que o tratamento intranasal com a SP (25µg/Kg) ou intracaudado (5µg) (Kryzhanovskii *et al.*, 1989; Kryzhanovskii *et al.*, 1992) aumenta a atividade motora e abole a rigidez e tremores em ratos. Esses estudos associaram a redução dos sintomas extrapiramidais promovidos pela SP à inibição do gerador

de excitação patologicamente aumentada, um grupo de neurônios hiperativos que produzem fluxos de impulsos intensos e descontrolados. A redução do prejuízo motor foi justificada pela transferência da SP da cavidade nasal para o cérebro, interferindo no equilíbrio do conteúdo de SP no sistema nigro-estriatal, suportando a ideia do envolvimento da SP na síndrome parkinsoniana (Kryzhanovskii *et al.*, 1989; Kryzhanovskii *et al.*, 1992).

Krasnova e cols., em 2000, utilizando um modelo animal de DP induzido pela 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA) (1,5mg/Kg; i.c.v), mostraram que a neurotoxina reduziu o conteúdo de dopamina e seus metabólitos DOPAC (ácido 3,4-diidroxifenilacético) e HVA (ácido homovanílico) no estriado, núcleo accumbens e no córtex frontal. Embora o tratamento i.c.v com baixas doses de SP (0,35nmol/kg) não tenha promovido efeito, a maior dose utilizada de SP (3,5nmol/kg) reverteu totalmente os efeitos da 6-OHDA sobre o conteúdo de dopamina e metabólitos nessas regiões cerebrais analisadas, com o efeito mais pronunciado sendo observado nos terminais de projeções nigroestriatais em comparação ao sistema mesocorticolímbico (Krasnova *et al.*, 2000).

Estudos eletrofisiológicos também mostram o envolvimento do sistema neurocinérgico mediado pela SP e NK_1 na modulação da atividade elétrica de neurônios palidais em um modelo animal de DP. Em ratos lesionados com o 6-OHDA (14,5 μ g/4 μ L), o agonista do receptor NK_1 , substância P [Sar9, Met (O2) 11] (SMSP; 0,1mM), aumentou a taxa de disparo espontâneo de neurônios palidais, enquanto que o antagonista NK_1 , SR140333B (0,5mM), evitou os efeitos excitatórios induzidos pela SMSP, sugerindo que a atividade dos receptores NK_1 no globo pálido possa estar reduzida no estado de parkinsonismo, que poderia ser consequência da desnervação ocasionada pela perda de neurônios estriatais intrínsecos ou pela atrofia dos dendritos estriatais induzida pela 6-OHDA (Cui *et al.*, 2008). A administração intraestriatal do agonista de receptores NK_1 septide [(Pyr6, Pro9)-SP(6-11)] (0,04 μ g) protegeu os neurônios e terminais tirosina hidroxilase imunorreativos na SN e estriado de ratos submetidos à lesão induzida com 6-OHDA. O tratamento com o septide em ratos previamente lesionados com 6-OHDA também induziu aumento da fosforilação da Akt no estriado e SN, bem como da BAD na SN, sugerindo o envolvimento da via de Akt na ação neuroprotetora do agonista NK_1 (Chu *et al.*, 2011). Sabe-se que a ativação da via da Akt está envolvida na inibição dos mecanismos pró-apoptóticos atenuando a degeneração neuronal em modelos animais de DP (Shimoke e Chiba, 2001; Nakaso *et al.*, 2008; Quesada *et al.*, 2008). Chu *et al.*, 2011 mostraram também que ratos lesionados com 6-OHDA apresentaram aumento dos níveis da caspase-3 clivada, um mediador que representa a marca registrada de apoptose, porém este efeito não foi revertido pelo tratamento intraestriatal com septide (0,04 μ g; dose

única) sugerindo que o mecanismo neuroprotetor do agonista NK₁ pode ser independente da caspase-3.

Zhao *et al.* (2016) utilizando um modelo de hemiparkinsonismo induzido pela 6-OHDA em ratos, mostraram que a administração intranasal de nanopartículas de gelatina constituídas de SP aumentou os níveis de tirosina-hidroxilase na SN e reduziu a proteína c-Jun fosforilada (p-c-Jun) e caspase-3. Esses resultados indicam que a SP pode bloquear a via da JNK, inibindo a expressão da p-c-Jun e caspase-3, e assim, promover a recuperação neuronal através da inibição de mecanismos pró-apoptóticos. Esses resultados são fortalecidos por um outro estudo que também utilizou nanopartículas de SP administrada por via intranasal por 2 semanas (50, 75 e 100µg/dia) em ratos lesionados com 6-OHDA, e que mostraram uma redução da expressão da caspase-3 na SN de maneira dose-dependente, indicando que quanto maior a concentração de SP, melhor o efeito neuroprotetor contra a apoptose neuronal induzida por 6-OHDA (Lu *et al.*, 2015). Ainda não se sabe ao certo se a redução dos níveis de caspase-3 é causada pela desativação da via JNK ou pela inibição da expressão da caspase-3. Entretanto, alguns trabalhos mostram que a disfunção na via JNK pode levar à superexpressão da caspase-3 e consequente apoptose e degeneração celular. A JNK é um dos importantes membros da família MAPK envolvida na regulação do crescimento, diferenciação, sobrevivência e apoptose neuronal (Pan *et al.*, 2005). Considerando que a ativação da via JNK é um dos mecanismos envolvidos em apoptose de neurônios dopaminérgicos na SN, é possível que a SP ao inibir a ativação anômala da via JNK possa produzir efeitos neuroprotetores contra a perda de neurônios dopaminérgicos nigrais, uma das principais características da DP.

Estudos histopatológicos analisando a SN de ratos com hemiparkinsonismo induzido com 6-OHDA mostraram que o tratamento por duas semanas com a SP reduz a perda neuronal, a proliferação de células gliais, infiltração de células inflamatórias e hiperplasia do tecido conjuntivo. O melhor efeito foi observado em ratos tratados por via intranasal com nanopartículas gelatinizadas de SP quando comparado ao tratamento realizado com solução de SP por via intranasal ou com nanopartículas gelatinizadas de SP por via intravenosa (Zhao *et al.*, 2016). Esses resultados foram justificados pela menor depuração mucociliar das nanopartículas gelatinosas de SP quando administradas por via intranasal, o que prolonga o tempo de permanência local do neuropeptídeo aumentando a sua capacidade de acesso direto ao SNC pela via olfativa e trigeminal (Pardeshi *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2016). Modelos animais de comportamento mostram que tanto o tratamento agudo com septide por via intraestriatal (0,04µg) quanto o tratamento crônico com nanopartículas de gelatina

constituídas de SP por via intranasal ou intravenosa reduz o número de rotações contralaterais induzida por apomorfina e melhora o déficit motor em ratos com lesão unilateral induzida com 6-OHDA, sugerindo que a SP exerce um efeito neuroprotetor recuperando a perda de neurônios dopaminérgicos (Chu *et al.*, 2011; Lu *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2016).

Esse perfil neuroprotetor da SP também foi observado em estudos *in vitro* utilizando cultura de diferentes tipos celulares. Por exemplo, em células SH-SY5Y expostas à neurotoxina 6-OHDA, a citotoxicidade foi reduzida pelo pré-tratamento com septide, e esse efeito foi bloqueado pelo antagonista de receptores NK₁. O pré-tratamento com o septide aumentou significativamente a fosforilação da Akt e BAD em culturas de células SH-SY5Y após 6h de incubação em comparação às células expostas à neurotoxina, sugerindo que o efeito do septide pode envolver o recrutamento da via de sinalização pró-sobrevivência da Akt/PKB, exercendo proteção dos neurônios dopaminérgicos contra a toxicidade da 6-OHDA em modelos *in vitro*. Não foi identificada redução significativa dos níveis da caspase-3 clivada ao longo da incubação com o septide, indicando que o efeito do agonista NK₁ sobre células SH-SY5Y expostas à 6-OHDA é independente da caspase-3 (Chu *et al.*, 2011). Culturas de células PC-12 (linhagem monoaminérgica derivada do feocromocitoma amplamente utilizada como modelo *in vitro* de DP) expostas à 6-OHDA (100uM) apresentaram menores níveis de apoptose e maior crescimento celular quando tratadas com solução de SP ou com nanopartículas de gelatina constituídas de SP. A viabilidade celular aumentou de forma proporcional ao aumento da concentração de SP (1, 10 e 100nM), sugerindo que o grau de inibição de apoptose é dependente das concentrações do neuropeptídeo. A maior proteção ocorreu com as células PC-12 expostas às nanopartículas gelatinosas de SP, devido a maior capacidade de penetração celular do neuropeptídeo a partir dessas preparações em relação às soluções de SP (Lu *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2016). Em um outro modelo *in vitro* de DP utilizando cultura de células MES23.5, os efeitos apoptóticos e de citotoxicidade desencadeados pela exposição à neurotoxina MPP⁺ (200μmol/L) foi prevenido pelo tratamento com a SP, efeito que foi bloqueado pelo antagonista NK₁ (SR140333B), sugerindo o envolvimento dos receptores NK₁ na proteção celular promovida pela SP. A SP aumentou a viabilidade das células MES23.5 e inibiu o aumento do potencial de membrana mitocondrial e do influxo de Ca²⁺ intracelular, além da ativação/fosforilação da caspase-3 e da produção de espécies reativas de oxigênio induzidos pelo MPP⁺. Além disso, o tratamento com SP inibiu a ativação/fosforilação das proteínas p38 MAPK, JNK e Akt em células MES23.5 expostas ao MPP⁺, indicando que as proteínas JNK, p38 e Akt possam estar envolvidas nas ações neuroprotetoras da SP (Wang *et al.*, 2015). O Ca²⁺ é uma das moléculas

de sinalização mais críticas envolvida na sobrevivência celular (Ma *et al.*, 2014). O aumento dos níveis de Ca^{2+} intracelular desencadeia morte neuronal, e a redução dos seus níveis intracelulares é uma das formas de proteção contra a apoptose (Kim *et al.*, 1996; Scorrano *et al.*, 2003). Além disso, estudos ilustraram que as ROS também podem levar à morte celular por meio da ativação da via de sinalização de apoptose celular (Wang *et al.*, 2009).

Em uma outra vertente, um segundo grupo de pesquisadores propõe que o bloqueio dos receptores NK_1 através do uso dos antagonistas exerce efeito neuroprotetor frente a insultos contra o sistema dopaminérgico. Thornton *et al.* (2010), utilizando cultura de células organotípicas mesoestriatal, mostraram que a 6-OHDA (200 μM) promove um discreto aumento no conteúdo de SP e da lactato desidrogenase (LDH; um marcador de morte celular) no meio, efeitos que foram revertidos pelo antagonista NK_1 N-acetil-triptofano (NAT, 10 μM). A adição de 6-OHDA (200 μM) mais SP (10 μM) no meio de cultura potencializou os níveis de SP e de LDH em relação aos tratamentos realizados isoladamente. Uma correlação positiva entre os conteúdos de SP e LDH também foi encontrada, sugerindo que a produção elevada de SP possa contribuir para a morte de células expostas à 6-OHDA.

Estudos *in vivo* mostram um aumento do conteúdo de SP na SN de ratos Sprague–Dawley em um modelo de DP inicial induzido pela 6-OHDA (Thornton e Vink, 2012; Yang *et al.*, 2015). A administração intracerebroventricular (i.c.v.) de SP (10 $\mu\text{g}/2\mu\text{L}$) acelera a progressão do parkinsonismo induzido pela 6-OHDA intraestriatal (10 $\mu\text{g}/2\mu\text{L}$) e aumenta a perda de neurônios positivos para TH, enquanto o tratamento i.c.v. com os antagonistas dos receptores NK_1 , NAT (50nM/2 μL) ou L-733,060 (100nM/2 μL), protege os neurônios dopaminérgicos contra a neurotoxicidade induzida pela 6-OHDA. Além disso, a SP e a 6-OHDA aumentaram a imunorreatividade para albumina, enquanto o efeito da 6-OHDA foi revertido pelos antagonistas de receptores NK_1 (NAT ou L-733,060), sugerindo que o bloqueio dos NK_1 é capaz de aumentar a integridade da barreira hematoencefálica contra as ações deletérias promovidas pela 6-OHDA. O aumento de marcadores inflamatórios (Iba-1, ED-1 e GFAP) induzido pela 6-OHDA foi parcialmente reduzido pelo tratamento com os antagonistas dos receptores NK_1 , revelando um papel desses receptores na modulação da neuroinflamação, além de melhorarem a função motora em ratos avaliados no teste da roda giratória (Thornton e Vink, 2012).

Atualmente, o padrão ouro para o tratamento farmacológico da DP continua sendo a levodopa (L-dopa), entretanto seu uso em longo prazo resulta em movimentos involuntários anormais altamente incapacitantes conhecidos como discinesias, que parecem resultar tanto da severidade da perda de neurônios dopaminérgicos nigroestriatais quanto dos ciclos de

flutuações pulsáteis durante a administração da droga (Marin *et al.*, 2013; González-Aparicio e Moratalla, 2014; Muñoz *et al.*, 2014). No entanto, a fisiopatogenia das discinesias ainda não foi completamente elucidada. Thorton *et al.* (2014) e Yang *et al.* (2015), investigaram o efeito do tratamento com antagonistas dos receptores NK₁ contra as discinesias induzidas pela L-dopa em ratos com hemiparkinsonismo, e mostraram que o tratamento com os antagonistas de receptores NK₁ (NAT ou LY303870), durante 21 e 23 dias respectivamente, diminui as discinesias, sugerindo que o bloqueio dos receptores NK₁ contribui para a preservação da função motora. Yang *et al.* (2015) também mostraram uma redução dos níveis de fosforilação da DARPP-32 e ERK1/2, bem como da Arc e Penk, após o tratamento com o LY303870. A ativação da DARPP-32 e ERK1/2 ocorre após a ativação da PKA (Santini *et al.*, 2012), e sua fosforilação está relacionada ao aparecimento das discinesias (Marti *et al.*, 2012). Além disso, a expressão gênica da c-fos e Arc também está envolvida no surgimento das discinesias induzidas pela L-dopa em ratos (Ostock *et al.*, 2011; Muñoz *et al.*, 2014). Em modelos *in vivo* de DP induzidos por LPS ou MPTP, camundongos nocautes para o gene TAC-1 (que não expressam a SP endógena) apresentaram níveis reduzidos de marcadores neuroinflamatórios dependentes da ativação microglial (TNF- α , INOS, MCP-1, Iba-1, CD11-b) e menor neurodegeneração dopaminérgica na SN e estriado, entretanto os mesmos resultados não ocorreram em camundongos nocautes para os receptores NK₁. Esses achados, portanto, sugerem que a SP possa facilitar a neuroinflamação e o dano em neurônios dopaminérgicos induzidos por neurotoxinas, mas estas ações parecem envolver uma via de sinalização independente dos receptores NK₁ (Wang *et al.*, 2014). Para testar esta hipótese, experimentos *in vitro* utilizando culturas de células gliais primárias mostraram que os efeitos na perda de neurônios dopaminérgicos e ativação da micróglia NOX2 induzido por toxinas (LPS ou MPTP) foi potencializado pela SP nas concentrações submicromolares (entre 10⁻⁸ e 10⁻⁷M) e subpicomolares (entre 10⁻¹⁴ e 10⁻¹³M), mas não em concentrações intermediárias (10⁻¹¹ e 10⁻¹⁰M). Enquanto em concentração submicromolar o efeito neurotóxico da SP é dependente dos receptores NK₁, em concentração subpicomolar o efeito ocorre de forma independente desses receptores, mostrando uma correlação com os resultados *in vivo*. É possível que a SP liberada a partir dos terminais nervosos possa atingir concentrações submicromolares nas junções sinápticas e transmitir sinais entre neurônios via ativação dos receptores NK₁ (Jalkanen *et al.*, 2011), enquanto o conteúdo de SP extrasináptico que atua na micróglia modulando a função imune provavelmente está abaixo da faixa de concentração submicromolar, com os efeitos regulatórios ocorrendo de maneira independente dos receptores NK₁ (Wang *et al.*, 2014).

4.1.2.2 Neurocinina A (NKA)/receptores NK₂ e neurocinina B (NKB)/receptores NK₃ na Doença de Parkinson

Enquanto os receptores NK₁ e NK₃ são encontrados principalmente no SNC, os receptores NK₂ são expressos principalmente em tecidos periféricos (Bannon *et al.*, 1995). Conseqüentemente, a falta de evidências envolvendo o sistema neurocinérgico mediado pela NKA e RNK₂ em modelos animais de doenças neurodegenerativas pode ser justificado por esta razão. Estudos prévios afirmam que a NKA e a SP administradas intranigral, mas não a NKB, regulam a liberação de dopamina por diferentes mecanismos (Baruch *et al.*, 1988; Reid *et al.*, 1990-C). A inibição da transmissão dopaminérgica pelo tratamento subcrônico com haloperidol em ratos diminuiu a síntese estriatal de NKA e SP, bem como o conteúdo nigral de NKA e SP (Bannon *et al.* 1986; Lindfors *et al.* 1986). Posteriormente, Lindfors *et al.* (1989) mostraram uma redução dos níveis da NKA na SN, e da SP na SN e no estriado, bem como um aumento dos níveis de GABA no estriado, após a lesão da via dopaminérgica nigroestriatal induzida pela administração unilateral com o 6-OHDA. Na avaliação dos níveis extracelulares da NKA, SP e GABA, após estimulação com potássio localmente (SN e estriado) através de probe de microdiálise, detectaram uma redução dos níveis da SP e NKA após estimulação na SN e um aumento de GABA após estimulação no estriado. Sugerindo que a diminuição da transmissão dopaminérgica no estriado desinibe a transmissão GABAérgica que, por sua vez, causa uma inibição na síntese de neurônios nigroestriatais contendo SP e NKA levando a diminuição dos níveis teciduais e de liberação da SP e NKA na SN (Lindfors *et al.* (1989).

Estudos analisando o envolvimento da NKB e dos receptores neurocinérgicos NK₃ em modelos animais de DP ainda são bem limitados e controversos. Bannon e colaboradores, em 1995, foram os primeiros pesquisadores a examinarem os efeitos do tratamento crônico com o senktide, um agonista dos receptores NK₃, sobre neurônios dopaminérgicos nigroestriatais de ratos com hemiparkinsonismo induzido por 6-OHDA. Esses autores mostraram que a infusão aguda (1µl) ou crônica (1µM; 0,5µl/h) intranigral de senktide por 1-3 dias aumentou significativamente as concentrações estriatais de DOPAC ipsilateralmente, indicando que os neurônios dopaminérgicos nigroestriatais são ativados via estimulação dos receptores NK₃ nigrais. Entretanto, 7 a 14 dias após a infusão crônica de senktide, os níveis de DOPAC no estriado não foram tão evidentes, sugerindo o desenvolvimento de tolerância aos efeitos do senktide (Bannon *et al.*, 1995). Sabe-se que a expressão cerebral tanto da NKB quanto dos receptores NK₃ diferem conforme diferentes áreas cerebrais. Estudos autoradiográficos mostraram níveis relativamente baixos, moderados e intensos da ligação do senktide [3H]-

RNK₃ no estriado, SNpc e córtex cerebral, respectivamente, em ratos lesionados unilateralmente com 6-OHDA (Zhang *et al.*, 2008). Além disso, o tratamento repetido com L-dopa em ratos com hemiparkinsonismo induzido com 6-OHDA foi capaz de aumentar a expressão do gene da NKB estriatal, sugerindo o envolvimento dessa neurocinina nas alterações em longo prazo promovidas pela L-dopa. A atividade da TH pode ser regulada positivamente pela CaMKII e MEK/MAPK via fosforilação de resíduos de Ser19 e Ser31, respectivamente (Yamauchi *et al.*, 1981; Haycock *et al.*, 1992). Neste sentido, o senktide, aumentou a fosforilação da TH em Ser19-TH, um sítio da CaMKII, e em Thr286-CaMKII em fatias estriatais; não teve efeito sobre P-Ser31-TH, um sítio da MAPK, mas reduziu P-Ser217/221-MEK; e aumentou a liberação de dopamina evocada. Por outro lado, o antagonista dos receptores NK₃, SB222200, bloqueou os efeitos do senktide, sugerindo a existência de uma cascata de sinalização envolvendo NKB/receptores NK₃/Ca²⁺/CaMKII/P-Ser19-TH responsável por controlar a síntese de dopamina em neurônios dopaminérgicos (Zhang *et al.*, 2008). No entanto, resultados opostos foram encontrados por Bannon e colaboradores, em 1995, que mostraram que a perda dos níveis de dopamina nigroestriatais (próxima a 65%) induzida pela injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA (8ug/2ul) não foi modificada pelo tratamento com o senktide. Assim como, outros trabalhos mostram uma redução da expressão da imunorreatividade para TH em ratos com lesão induzida com 6-OHDA (Chu *et al.*, 2012) ou ácido quinóico (Chen *et al.*, 2008) e tratados com o senktide, e este efeito foi bloqueado pelo SB218795 (antagonista dos receptores NK₃). Uma regulação positiva também foi detectada na fosforilação da subunidade 1 do receptor NMDA, na região SN em ratos lesionados com 6-OHDA e tratados com o senktide, indicando que a NKB pode desencadear a ativação da subunidade 1 do receptor NMDA em neurônios dopaminérgicos (Chu *et al.*, 2012). Chen *et al.*, (2008) também demonstraram que enquanto o septide (agonista de receptores NK₁) reduziu a fosforilação da subunidade 1 do receptor NMDA, tanto o senktide sozinho aumentou quanto o co-tratamento de senktide e septide também aumentou a fosforilação do receptor NMDA. Sugerindo que os receptores NK₁ e NK₃ modulam diferencialmente a fosforilação de receptor NMDA nos neurônios nigrais, possivelmente através de interações de sinalização intracelular ainda desconhecidas, ou ainda, os pesquisadores hipotetizam que podem agir em células gliais na liberação e/ou bloqueio de fatores inflamatórios. A ativação de receptores NMDA aumenta o influxo de cálcio intraneuronal culminando na excitotoxicidade como fenômeno final de morte celular comum entre diferentes doenças neurodegenerativas, como na DP (Doble 1999; Arundine e Tymianski 2003). Chu *et al.*, 2012, demonstraram ainda uma regulação positiva da JNK e c-

Jun fosforiladas na região SN de ratos lesionados com 6-OHDA e tratados com o senktide, sugerindo que o senktide pode desempenhar um papel crucial na degeneração neuronal através do influxo de cálcio desencadeado pela fosforilação da subunidade 1 do receptor NMDA e catalisando processos de morte celular pela regulação positiva de atividade da JNK e c-Jun de quinases dependentes de cálcio.

O tratamento com o senktide, em um modelo de DP induzido pelo ácido quinólico em camundongos, aumentou a expressão de astrócitos positivos-GFAP na SN e aumentou a marcação positivas para Fluoro-Jade C na SN (aumento da degeneração neuronal e do volume de área lesionada), todos esses efeitos foram revertidos pelo antagonista do receptor NK₃, SB218795. Em experimentos utilizando cultura de células de neurônios nigrais ou de neurônios dopaminérgicos foi confirmado um efeito excitotóxico do ácido quinólico de maneira dose dependente, e a exposição ao senktide reduziu a viabilidade celular, confirmando que a exposição ao senktide *in vitro* exacerba de forma sinérgica o efeito excitotóxico do ácido quinólico (Chen *et al.*, 2008). Na análise comportamental há estudos que mostram que o aumento das rotações espontâneas induzidas pelo 6-OHDA intraestriatal (8 µg / 2 µL), foram reduzidas pela infusão do senktide (Bannon *et al.*, 1995). Ou ainda, que o co-tratamento do antagonista do receptor NK₃ SB222200 (5mg/Kg; i.p) com a L-DOPA aumentou as rotações contralaterais em comparação com L-DOPA sozinho em ratos (Zhang *et al.*, 2008), sugerindo que a estimulação dos receptores NK₃ poderia ter potencial terapêutico no tratamento da DP (Bannon *et al.*, 1995). Por outro lado, outros pesquisadores mostraram resultados opostos, com um aumento do número de rotações contralaterais induzidas por 6-OHDA no estriado (2 doses de - 6 µL; 0,2 µg / µL) sendo observado após o tratamento com o senktide, sugerindo (0,04 µg – 7 µL) que o peptídeo NKB poderia acelerar a perda de dopamina *in vivo* modulando o insulto com a neurotoxina ou estresse celular (Chu *et al.*, 2012).

Pacientes com DP, além do déficit motor também apresentam declínio das tarefas cognitivas envolvendo o processamento de informações temporais, fortalecendo a ideia do envolvimento direto ou indireto da dopamina sobre os mecanismos relacionados ao aprendizado e memória (Sagar *et al.*, 1988; Harrington *et al.*, 2011). Em um modelo de DP induzida pela injeção unilateral no feixe prosencefálico medial de 6-OHDA (10,5 µg/3µL), o tratamento com o senktide (0,2mg/Kg, subcutânea) melhorou o prejuízo sobre a discriminação da memória temporal dos animais avaliados no teste de reconhecimento de objetos (Chao *et al.*, 2014). Esse efeito promnésico também foi descrito por outros estudos que utilizaram agonistas dos receptores NK₃ em camundongos (Zlomuzica *et al.*, 2008) e ratos idosos

(Schable *et al.*, 2011), e também suportado pelo déficit cognitivo exibido por camundongos nocautes para os receptores NK₃ (Siuciak *et al.*, 2007). O benefício do senktide sobre o aprendizado e memória pode ser justificado pelo seu efeito sobre a liberação da acetilcolina no córtex pré-frontal e hipocampo (Schable *et al.*, 2011; De Souza Silva *et al.*, 2013), regiões cerebrais envolvidas em um circuito neural responsável pela memória de ordem temporal (Barker e Warburton, 2011).

Por fim, os estudos aqui discutidos envolvendo a neurocininas em modelos animais de DP são bastante reduzidos e contraditórios, requerendo uma investigação mais aprofundada sobre o papel deste sistema neurocinérgico na recuperação de déficits motores.

5 Conclusão e direções futuras

Os resultados obtidos a partir de estudos pré-clínicos mostraram ser bastante divergentes, especialmente em relação a SP e os efeitos do uso de agonistas e antagonistas do RNK₁ em modelos de DA e DP. Quando um receptor é bloqueado, os outros dois receptores (por exemplo, RNK₂ e RNK₃) podem compensar esse efeito, o que poderia estar acontecendo nesses trabalhos (Martinez e Philipp, 2016). Portanto, o uso de antagonistas capazes de bloquear mais de um receptor NK pode ser interessante.

Entretanto, é evidente a relevância e o envolvimento das neurocininas nos processos fisiopatológico de modelos animais de DA e DP, bem como do seu potencial como um novo alvo no tratamento das doenças neurodegenerativas. Apesar disso, a extrapolação de estudos em animais para humanos é complicada, devido às diferenças na potência com que certos agonistas e antagonistas de receptores neurocinérgicos interagem com seus respectivos receptores em diferentes espécies animais (Steinhoff *et al.*, 2014). Por isso, a interpretação dos efeitos em ensaios pré-clínicos requer muita cautela. Neste sentido, é interessante o desenvolvimento de novos trabalhos pré-clínicos e clínicos, com o objetivo de desmitificar os efeitos controversos das neurocininas em modelos animais de DA e DP, bem como analisar as congruências nas doenças neurodegenerativas em humanos.

Referências

ADVENIER, C.; JOOS, G.; MOLIMARD, M.; et al. Role of tachykinins as contractile agonists of human airways in asthma. **Clin Exp Allergy**, v. 29, p. 579-84, 1999.

ADVENIER, C.; LAGENTE, V.; BOICHOT, E. The role of tachykinin receptor antagonists in the prevention of bronchial hyperresponsiveness, airway inflammation and cough. **Eur Respir J.**, v. 10, p. 1892-906, 1997.

- AGGLETON, J.P.; BROWN, M.W. Episodic memory, amnesia, and the hippocampal-anterior thalamic axis. **Behavioral Brain Science**, v. 22, p. 425–444, 1999.
- AKKOYUN, D.Ç.; AKYUZ, A.; ALPSOY, Ş.; et al. Plasma urotensin II and neurokinin B levels in acute myocardial infarction and stable coronary artery disease. **Anatol J Cardiol.**, v. 15, p. 628-33, 2015.
- ALMEIDA, T.A.; ROJO, J.; NIETO, P.M.; et al. Tachykinins and tachykinin receptors: structure and activity relationships. **Curr Med Chem**, v. 21, p. 2045-81, 2004.
- ALVES, I.D.; DELAROCHE, D.; MOUILLAC, B.; et al. The two NK-1 binding sites correspond to distinct, independent, and non-interconvertible receptor conformational states as confirmed by plasmon-waveguide resonance spectroscopy. **Biochemistry**, v. 45, p. 5309–5318, 2006.
- ANNUNZIATA, P.; CIONI, C.; SANTONINI, R.; et al. Substance P antagonist blocks leakage and reduces activation of cytokine-stimulated rat brain endothelium. **Journal of neuroimmunology**, v. 131, p. 41-49, 2002.
- ARDILL, J.E.; MCCANCE, D.R.; STRONGE, W.V.; et al. Raised circulating Neurokinin A predicts prognosis in metastatic small bowel neuroendocrine tumours. Lowering Neurokinin A indicates improved prognosis. **Ann Clin Biochem.**, v. 53(Pt 2), p. 259-64, 2016.
- ARIAS-MONTANO, J.A.; MARTINEZ-FONG, D.; ACEVES, J. Glutamate stimulation of tyrosine hydroxylase is mediated by NMDA receptors in the rat striatum. **Brain Res.**, v. 569, p. 317–322, 1992.
- ARUNDINE, M.; TYMIANSKI, M. Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. **Cell Calcium**, v. 34, p. 325–337, 2003.
- BARNES, J.M.; BARNES, N.M.; COSTALL, B.; et al. Neurochemical consequences following injection of the substance P analogue, DiMe-C7, into the rat ventral tegmental area. **Pharmac. Biochem. Behav.**, v. 37, p. 839–841, 1990.
- BARUCH, P.; ARTAUD, F.; GODEBEU, G.; et al. Substance P and neurokinin A regulate by different mechanisms dopamine release from dendrites and nerve terminals of the nigrostriatal dopaminergic neurons. **Neuroscience**. v. 25, p. 889-98, 1988.
- BANNON, M.J.; BROWNSCHIDLE, L.A.; TIAN, Y.; et al. Neurokinin-3 receptors modulate dopamine cell function and alter the effects of 6-hydroxydopamine. **Brain Res.**, v. 695, p. 19-24, 1995.
- BANNON, M.J.; LEE, J.-M.; GIRAUD, P.; YOUNG, A.; et al. Dopamine antagonist haloperidol decreases substance P, substance K and preprotachykinin mRNAs in rat striatonigral neurons. **J Biol Chem**, v. 261, p. 6640-6642, 1986.
- BARKER, G.R.I.; WARBURTON, E.C. When is the hippocampus involved in recognition memory. **J Neurosci**, v. 31, p. 10721–31, 2011.

- BLACK, P.H. Stress and the inflammatory response: a review of neurogenic inflammation. **Brain Behav Immun.**, v. 16, p. 622-53, 2002.
- BIRKS, J.S.; CHONG, L.Y.; GRIMLEY, E. J. Rivastigmine for Alzheimer's disease. **Cochrane Database Syst Rev**, CD001191, 2015.
- BIRKS, J.S.; HARVEY, R. Donepezil for dementia due to Alzheimer's disease. **Cochrane Database Syst Rev**, CD001190, 2003.
- BIRNBAUM, S.G.; VARGA, A.W.; YUAN, L.L.; et al. Structure and function of Kv4-family transient potassium channels. **Physiol. Rev.**, v. 84, p. 803–833, 2004.
- BONHAM, A.C. Neurotransmitters in the CNS control of breathing. **Respir. Physiol.**, v. 101, p. 219–230, 1995.
- BOZIC, C.R.; LU, B.; HOPKEN, U.E.; et al. Neurogenic amplification of immune complex inflammation. **Science**, v. 273, p. 1722-5, 1996.
- BRAIN, S.D. Sensory neuropeptides: their role in inflammation and wound healing. **Immunopharmacology**, v. 37, p. 133–152, 1997.
- BROWNBILL, P.; BELL, N.J.; WOODS, R.J.; et al. Neurokinin B is a paracrine vasodilator in the human fetal placental circulation. **J Clin Endocrinol Metab.**, v. 88, p. 2164-70, 2003.
- CABERLOTTO, Y.L.; HURD, P.; MURDOCK, P.; et al. "Neurokinin 1 receptor and relative abundance of the short and long isoforms in the human brain,". **European Journal of Neuroscience**, v. 17, p. 1736–1746, 2003.
- CALVO, N.; REIRIZ, J.; PÉREZ-NAVARRO, E.; et al. Tachykinins protect cholinergic neurons from quinolinic acid excitotoxicity in striatal cultures. **Brain Res.**, v. 740, p. 323-8, 1996.
- CAMPOLONGO, P.; RATANO, P.; CIOTTI, M.T.; et al. Systemic administration of substance P recovers beta amyloid-induced cognitive deficits in rat: involvement of Kv potassium channels. **PLoS One.**, v. 8, e78036, 2013.
- CHANG, M.M.; LEEMAN, S.E.; NIALL, H.D. Amino-acid sequence of substance P. **Nature**, v. 232, p. 86-7, 1971.
- CHAO, O.Y.; WANG, A.L.; NIKOLAUS, S.; et al. NK₃ receptor agonism reinstates temporal order memory in the hemiparkinsonian rat. **Behav Brain Res.**, v. 285, p. 208-12, 2015.
- CHEN, L.W.; GUAN, Z.L.; DING, Y.Q. Mesencephalic dopaminergic neurons expressing neuromedin K receptor (NK3): a double immunocytochemical study in rat brain. **Brain Res.**, v. 780, p. 150-154, 1998.
- CHEN, L.W.; WANG, Y.Q.; BIAN, G.L.; et al. Neurokinin-3 peptide instead of neurokinin-1 synergistically exacerbates kainic acid-inducing degeneration of neurons in the substantia nigra of mice. **J Neurochem.**, v. 105, p. 203-16, 2008.

CHU, J.M.; CHEN, L.W.; CHAN, Y.S.; et al. Neuroprotective effects of neurokinin receptor one in dopaminergic neurons are mediated through Akt/PKB cell signaling pathway. **Neuropharmacology**, v. 61, p. 1389-98, 2011.

CHU, J.M.; CHAN, Y.S.; CHEN, L.W.; et al. Neurokinin receptor 3 peptide exacerbates 6-hydroxydopamine-induced dopaminergic degeneration in rats through JNK pathway. **J Neurochem**, v. 123, p. 417-27, 2012.

CHOI, E.; ABBOTT, G.W. The MiRP2-Kv3.4 potassium channel: muscling in on Alzheimer's disease. **Mol. Pharmacol.**, v. 72, p. 499–501, 2007.

COVEÑAS, R.; MANGAS, A.; NARVÁEZ, J.A. Introduction to neuropeptides. In: Focus on Neuropeptide Research. **Trivandrum: Transworld Research Network**, p. 1-26, 2007.

CRAMER, H.; SCHAUDT, D.; RISSLER, K.; et al. Somatostatin-like immunoreactivity and substance-P-like immunoreactivity in the CSF of patients with senile dementia of Alzheimer type, multi-infarct syndrome and communicating hydrocephalus. **Journal of neurology**, v. 232, p. 346-351, 1985.

CONNOLLY, B.S.; LANG, A.E. Pharmacological treatment of Parkinson disease: a review. **JAMA**, v. 311, p. 1670-83, 2014.

CORBOZ, M.R.; RIVELLI, M.A.; ECKEL, S.P. Bronchoconstrictor effect of the tachykinin NK₃-receptor agonists [MePhe⁷]-neurokinin B and senktide in the isolated guinea pig lung. **Exp Lung Res.**, v. 36, p. 509-21, 2010.

COVEÑAS, R.; MARTIN, F.; BELDA, M.; et al. Mapping of neurokinin-like immunoreactivity in the human brainstem. **BMC Neurosci**, v. 4, p. 3, 2003.

CUI, Q.L.; YUNG, W.H.; CHEN, L. Effects of substance P on neuronal firing of pallidal neurons in parkinsonian rats. **Neurosci Res.**, v. 60, p.162-9, 2008.

CZELEJEWSKA, W.; ZMIJEWSKA, A.; DZIEKONSKI, M.; et al. The role of neurokinin A and its receptor in the regulation of prolactin secretion by the anterior pituitary of cyclic pigs. **Reprod Domest Anim.**, v. 55, p. 604-612, 2020.

DAOUI, S.; COGNON, C.; NALINE, E.; et al. Involvement of tachykinin NK3 receptors in citric acid-induced cough and bronchial responses in guinea pigs. **Am J Respir Crit Care Med.**, v. 158, p. 42-8, 1998.

DAWSON, L.A.; PORTER, R.A. Progress in the development of neurokinin 3 modulators for the treatment of schizophrenia: molecule development and clinical progress. **Future Med Chem.**, v. 5, p. 1525-46, 2013.

DE SOUZA SILVA, M.A.; LENZ, B.; ROTTER, A.; et al. Neurokinin3 receptor as a target to predict and improve learning and memory in the aged organism. **Proc Natl Acad Sci**, v. 110, p. 15097–102, 2013.

- DE VRIES, A.; VAN RIJNSOEVER, C.; ENGELS, F.; et al. The role of sensory nerve endings in nerve growth factor-induced airway hyperresponsiveness to histamine in guinea-pigs. **Br J Pharmacol.**, v. 134, p.771-6, 2001.
- D'HOOGE, R.; DE DEVN, P.P. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. **Brain Res Brain Res Ver**, v. 36, p. 60–90, 2001.
- DOBBLE, A. The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease: implications for therapy. **Pharmacol. Ther.**, v. 81, p. 163–221, 1999.
- DOUGLAS, S.D.; LEEMAN, S.E. Neurokinin-1 receptor: functional significance in the immune system in reference to selected infections and inflammation. **Ann N Y Acad Sci.**, v. 1217, p. 83–95, 2011.
- DUQUE, E.; MANGAS, A.; SALINAS, P.; et al. Mapping of alpha-neo-endorphin- and neurokinin B-immunoreactivity in the human brainstem. **Brain Struct Funct**, v. 218, p.131-49, 2013.
- EAPEN, P.M.; RAO, C.M.; NAMPOOTHIRI, M. Crosstalk between neurokinin receptor signaling and neuroinflammation in neurological disorders. **Rev Neurosci.**, v. 30, p. 233-243, 2019.
- EBNER, K.; SARTORI, S.B.; SINGEWALD, N. Tachykinin receptors as therapeutic targets in stress- related disorders. **Curr Pharm Des**, v. 15, p. 1647-74, 2009.
- EBNER, K.; SINGEWALD, N. The role of substance P in stress and anxiety responses. **Amino Acids**, v. 31, p. 251–272, 2006.
- EHRINGER, H.; HORNYKIEWICZ, O. Verteilung von Noradrenalin und Dopamin (3-Hydroxytyramin) im Gehirn des Menschen und ihr Verhalten bei Erkrankungen des extrapyramidalen Systems. **Klin Wochenschr**, v. 38, p. 1236–1239, 1960.
- EKSTROM, J. Autonomic control of salivary secretion. **Proc. Finn. Dent. Soc.**, v. 85, p. 323– 31; (discussion) 361-363, 1989.
- EVANS, D.A.; FUNKENSTEIN, H.H.; ALBERT, M.S.; et al. Prevalence of Alzheimer's disease in a community population of older persons. Higher than previously reported. **JAMA**, v. 262, p. 2551–2556. 1989.
- FERREIRA, SH. Hiperalgesia inflamatórial, óxido nítrico y control periférico del dolor. **Rev Latino Americana de Dolor**, v. 12, p. 6-17, 1995.
- FERNANDES, J.; MUDGAL, J.; RAO, C.M.; et al. N-acetyl-L-tryptophan, a substance-P receptor antagonist attenuates aluminum-induced spatial memory deficit in rats. **Toxicol Mech Methods.**, v. 28, p. 328-334, 2017.
- FENG, F.; YANG, J.; TONG, L.; et al.. Substance P immunoreactive nerve fibres are related to gastric cancer differentiation status and could promote proliferation and migration of gastric cancer cells. **Cell Biol Int**, v. 35, p. 623–9, 2011.

FONG, T.M.; ANDERSON, S.A.; YU, H.; et al. Differential activation of intracellular effector by two isoforms of human neurokinin-1 receptor. **Molecular Pharmacology**, v. 41, p. 24–30, 1992.

FURUTA, T.; KOYANO, K.; TOMIAKO, R.; et al. GABAergic basal forebrain neurons that express receptor for neurokinin B and send axons to the cerebral cortex. **J.Comp. Neurol.**, v. 473, p. 43-58, 2004.

GARCIA-RECIO, S.; GASCÓN, P. Biological and Pharmacological Aspects of the NK1-Receptor. **Biomed Res Int.**, 2015:495704, 2015.

GERARD, N.P.; GARRAWAY, L.A.; EDDY, R.L.Jr.; et al. Human substance P receptor (NK-1): organization of the gene, chromosome localization and functional expression of cDNA clones. **Biochemistry**, v. 30, p. 10640–10646, 1991.

GRAY, R.; IVES, N.; RICK, C.; et al. Long-term effectiveness of dopamine agonists and monoamine oxidase B inhibitors compared with levodopa as initial treatment for Parkinson's disease (PD MED): a large, open-label, pragmatic randomised trial. **Lancet**, v. 384, p. 1196-205, 2014.

GRIEBEL, G.; BEESKÉ, S. Is there still a future for neurokinin 3 receptor antagonists as potential drugs for the treatment of psychiatric diseases? **Pharmacol Ther.**, v. 133, p. 116-23, 2012.

GRIEBEL, G.; HOLSBOER, F. Neuropeptide receptor ligands as drugs for psychiatric diseases: the end of the beginning? **Nat Rev Drug Discov**, v. 11, p. 462-78, 2012.

GRIEBEL, G. Is there a future for neuropeptide receptor ligands in the treatment of anxiety disorders? **Pharmacol Ther.**, v. 82, p. 1-61, 1999.

GRIMES, D.; GORDON, J.; SNELGROVE, B.; et al. Canadian guidelines on Parkinson's Disease. **Can J Neurol Sci**, 39(Suppl 4): S1-30. 58, 2012.

GRUTZENDLER, J.; MORRIS, J.C. Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. **Drugs**, 61: 41-52, 2001.

GONZÁLEZ, H.; PACHECO, R. T-cell-mediated regulation of neuroinflammation involved in neurodegenerative diseases. **J Neuroinflammation.**, v. 11, p. 201, 2014.

GONZÁLEZ-APARICIO, R.; MORATALLA, R. Oleoylethanolamide reduces L-DOPA-induced dyskinesia via TRPV1 receptor in a mouse model of Parkinson's disease. **Neurobiol. Dis.**, v. 62, p. 416–425, 2014.

HARRINGTON, D.L.; CASTILLO, G.N.; GREENBERG, P.A.; et al. Neurobehavioral mechanisms of temporal processing deficits in Parkinson's disease. **PLoS One**, v. 6, p. e17461, 2011.

HARRISON, S.; GEPPETTI, P. Substance p. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 33, p. 555–576, 2001.

HAY, D.W.; GIARDINA, G.A.; GRISWOLD, D.E.; et al. Nonpeptide tachykinin receptor antagonists. II. Pharmacological and pharmacokinetic profile of SB-222200, a central nervous system penetrant, potent and selective NK-3 receptor antagonist. **Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 300, p. 314, 2002.

HAYCOCK, J.W.; AHN, N.G.; COBB, M.H.; KREBS, E.G. ERK1 and ERK2, two microtubule-associated protein 2 kinases, mediate the phosphorylation of tyrosine hydroxylase at serine-31 in situ. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 89, p. 2365–2369, 1992.

HETHER, S.; MISONO, K.; LESSARD, A. The neurokinin-3 receptor (NK3R) antagonist SB222200 prevents the apomorphine-evoked surface but not nuclear NK3R redistribution in dopaminergic neurons of the rat ventral tegmental area. **Neuroscience**, v. 247, p. 12–24, 2013.

HOPKINS, B.; POWELL, S.J.; DANKS, P.; et al. Isolation and characterisation of the human lung NK-1 receptor Cdna. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 180, p. 1110–1117, 1991.

HOWARD, R.; MCSHANE, R.; LINDESAY, J.; et al. Donepezil and memantine for moderate-to-severe Alzheimer's disease. **N Engl J Med**, v. 366, p. 893–903, 2012.

HUTSON, P.H.; PATEL, S.; JAY, M.T.; et al. Stress-induced increase of cortical dopamine metabolism: attenuation by a tachykinin NK1 receptor antagonist. **Eur J Pharmacol**, v. 484, p. 57–64, 2004.

ICHIKI T.; KUROISHI, K.N.; GUNJIGAKE, K.K.; et al. Neurokinin B activates the formation and bone resorption activity of rat osteoclasts. **Neuropeptides.**, v. 45, p. 239–44, 2011.

INAGAKI, S.; SAKANAKA, M.; SHIOSAKA, S.; et al. Ontogeny of substance P-containing neuron system of the rat: immunohistochemical analysis—I Forebrain and upper brain stem. **Neuroscience**, v. 7, p. 251–277, 1982.

JAHN H. Memory loss in Alzheimer's disease. **Dialogues Clin Neurosci.**, v. 15, p. 445–54, 2013.

JALKANEN, A.J.; SAVOLAINEN, K.; FORSBERG, M.M. Inhibition of prolyl oligopeptidase by KYP-2047 fails to increase the extracellular neurotensin and substance P levels in rat striatum. **Neurosci Lett**, v. 502, p. 107–111, 2011.

JOHANSSON, P.; ALQVIST, E.G.; WALLIN, A.; et al. Cerebrospinal fluid substance P concentrations are elevated in patients with Alzheimer's disease. **Neuroscience Letters**, v. 609, p. 58–62, 2015.

JOHNSON, M.B.; YOUNG, A.D.; MARRIOTT, I. The Therapeutic Potential of Targeting Substance P/NK-1R Interactions in Inflammatory CNS Disorders. **Front. Cell. Neurosci.**, v. 10, p. 296, 2017.

- JOHNSON, K.M.; JENG, Y.J. Pharmacological evidence for N-methyl-d-aspartate receptors on nigrostriatal dopaminergic nerve terminals. **Can. J. physiol. Pharmac.**, v. 69, p. 1416–1421, 1991.
- JULIA, V.; MORTEAU, O.; BUENO, L. Involvement of neurokinin 1 and 2 receptors in viscerosensitive response to rectal distension in rats. **Gastroenterology**, v. 107, p. 94-102, 1994.
- KALIA, L.V.; LANG, A.E. Parkinson disease in 2015: Evolving basic, pathological and clinical concepts in PD. **Nat Rev Neurol**, v. 12, p.65–66, 2016.
- KAMEYAMA, T.; UKAI, M.; SHINKAI, N. Ameliorative effects of tachykinins on scopolamine-induced impairment of spontaneous alternation performance in mice. **Methods Find Exp Clin Pharmacol**, v. 20, p. 555, 1998.
- KANGAWA, K.; MINAMINO, N.; FUKUDA, A.; et al. Neuromedin K: a novel mammalian tachykinin identified in porcine spinal cord. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 114, p. 533-540, 1983.
- KART-TEKE, E.; JOCHAM, G.; MULLER, C.P.; et al. Neurokinin-1 receptor antagonism by SR140333: enhanced in vivo ACh in the hippocampus and promnestic post-trial eVects. **Peptides**, v. 25, p. 1959–1969, 2004.
- KART-TEKE, E.; DERE, E.; BRANDÃO, M.L.; et al. Reinstatement of episodic-like memory in rats by neurokinin-1 receptor antagonism. **Neurobiol Learn Mem.**, v. 87, p. 324-31, 2007.
- KIM, H.Y.; LAVAUTE, T.; IWAI, K.; et al. Identification of a conserved and functional iron-responsive element in the 5'-untranslated region of mammalian mitochondrial aconitase. **J Biol Chem**, v. 271, p. 24226-24230, 1996.
- KIMURA, S.; OKADA, M.; SUGITA, Y.; et al. Novel neuropeptides, neurokinin a and b, isolated from porcine spinal cord. **Proc. Jpn. Acad.**, v. 59, p. 101-104, 1983.
- KNOPMAN, D.S.; AMIEVA, H.; PETERSEN, R.C. et al. Alzheimer disease. **Nat Rev Dis Primers**, v. 7, p. 33, 2021.
- KORMOS, V.; GASZNER, B. Role of neuropeptides in anxiety, stress, and depression: from animals to humans. **Neuropeptides**, v. 47, p. 401–419, 2013.
- KRANEVELD, A.D.; NIJKAMP, F.P. Tachykinins and neuro-immune interactions in asthma. **Int Immunopharmacol.**, v. 1, p. 1629-50, 2001.
- KRASNOVA, I.N.; BYCHKOV, E.R.; LIUDYNO, V.I.; et al. Intracerebroventricular administration of substance P increases dopamine content in the brain of 6-hydroxydopamine-lesioned rats. **Neuroscience.**, v. 95, p. 113-7, 2000.
- KRYZHANOVSKII, G.N.; ATADZHANOV, M.A.; KUCHERIANU, V.G. Effects of substance P on experimental parkinsonian syndrome. **Biull Eksp Biol Med.**, v. 108, p. 404-7, 1989.

- KRYZHANOVSKII, G.N.; KUCHERIANU, V.G.; GODLEVSKII, L.S.; et al. Effects of intranasally administered substance P in parkinsonian syndrome. **Biull Eksp Biol Med.**, v. 113, p. 16-9, 1992.
- LANGLOIS, X.; WINTMOLDERS, C.; TE RIELE, P.; et al. Detailed distribution of neurokinin 3 receptors in the rat, guinea pig and gerbil brain: a comparative autoradiographic study. **Neuropharmacology**, v. 40, p. 242-53, 2001.
- LAURITZEN, I.; ZANZOURI, M.; HONORE, E.; et al. K⁺-dependent cerebellar granule neuron apoptosis. Role of task leak K⁺ channels. **J. Biol. Chem.**, v. 278, p. 32068–32076, 2003.
- LEES, A.J. Unresolved issues relating to the shaking palsy on the celebration of James Parkinson's 250th birthday. **Mov Disord.**, v. 22, p. 327–34, 2007.
- LEMBECK, F.; HOLZER, P. Substance P as neurogenic mediator of antidromic vasodilation and neurogenic plasma extravasation. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.**, v. 310, p. 175-83, 1979.
- LINDEFORS, N.; BRODIN, E.; UNGERSTEDT, U. Neuroleptic treatment induces region-specific changes in levels of neurokinin A and substance P in rat brain. **Neuropeptides**, v. 7, p. 265-280, 1986.
- LINDEFORS, N.; BRODIN, E.; TOSSMAN, U.; et al. Tissue levels and in vivo release of tachykinins and GABA in striatum and substantia nigra of rat brain after unilateral striatal dopamine denervation. **Exp Brain Res.**, v. 74, p. 527-34, 1989.
- LI, S.; JIN, M.; KOEGLSPERGER, T.; et al. Soluble Abeta oligomers inhibit long-term potentiation through a mechanism involving excessive activation of extrasynaptic NR2B-containing NMDA receptors. **J Neurosci.**, v. 31, p. 6627-38, 2011.
- LI, Q.; WU, X.; YANG, Y.; et al. Tachykinin NK1 receptor antagonist L-733,060 and substance P deletion exert neuroprotection through inhibiting oxidative stress and cell death after traumatic brain injury in mice. **International journal of biochemistry and cell biology**, v. 107, p. 154-165, 2019.
- LU, C.T.; JIN, R.R.; JIANG, Y.N.; et al. Gelatin nanoparticle-mediated intranasal delivery of substance P protects against 6-hydroxydopamine-induced apoptosis: an in vitro and in vivo study. **Drug Des Devel Ther.**, v. 9, p. 1955-1962, 2015.
- MAENO, H.; KIYAMA, H.; TOHYAMA, M. Distribution of the substance P receptor (NK-1 receptor) in the central nervous system. **Molecular Brain Research**, v. 18, p. 43–58, 1993.
- MAGGI, C.A.; GIACHETTI, A.; DEV, R.D.; et al. Neuropeptides as regulators of airway function: vasoactive intestinal peptide and the tachykinins. **Physiol Rev.**, v. 75, p. 277-322, 1995.
- MAGGI, C.A. Principles of tachykininergic co-transmission in the peripheral and enteric nervous system. **Regulatory Peptides**, v. 93, p. 53 – 64, 2000.

- MAGGI, C.A. The mammalian tachykinin receptor. **Gen. Pharmacol.**, v. 26, p. 911-944, 1995.
- MANTYH, P.W. Neurobiology of substance P and the NK1 receptor. **J Clin Psychiatry**, v. 11, p. 6–10, 2002.
- MANTYH, P.W.; ROGERS, S.D.; GHILARDI, J.R.; et al. Differential expression of two isoforms of the neurokinin-1 (substance P) receptor in vivo. **Brain Research**, v. 719, p. 8–13, 1996.
- MANTYH, P.W.; ROGERS, S.D.; HONORE, P.; et al. Inhibition of hyperalgesia by ablation of lamina I spinal neurons expressing the substance P receptor. **Science**, v. 10, p. 275-9, 1997.
- MASSI, M.; PANOCCA, I.; DE CARO, G. The psychopharmacology of tachykinin NK-3 receptors in laboratory animals. **Peptides**, v. 21, p. 1597-609, 2000.
- MARCO, N.; THIRION, A.; MONS, G.; et al. Activation of dopaminergic and cholinergic neurotransmission by tachykinin NK3 receptor stimulation: an in vivo microdialysis approach in guinea pig. **Neuropeptides**, v. 32, p. 481-8, 1998.
- MARDER, K.; TANG, M.X.; MEJIA, H.; et al. Risk of Parkinson's disease among first-degree relatives: A community-based study. **Neurology**, v. 47, p. 155–160, 1996.
- MARIN, C.; BONASTRE, M.; MENGOD, G.; et al. Subthalamic 6-OHDA-induced lesion attenuates levodopa-induced dyskinesias in the rat model of Parkinson's disease. **Exp. Neurol.**, v. 250, p. 304–312, 2013.
- MARTI, M.; RODI, D.; LI, Q.; GUERRINI, R.; et al. Nociceptin/orphanin FQ receptor agonists attenuate L-DOPA-induced dyskinesias. **J. Neurosci.**, v. 32, p. 16106–16119, 2012.
- MARTI, M.; MANZALINI, M.; FANTIN, M.; et al. Striatal glutamate release evoked in vivo by NMDA is dependent upon ongoing neuronal activity in the substantia nigra, endogenous striatal substance P and dopamine. **J Neurochem.**, v. 93, p. 195-205, 2005.
- MAYEUX, R.; STERN, Y. Epidemiology of Alzheimer disease. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 2, a006239, 2012.
- MCCARSON, K.E.; KRAUSE, J.E. NK-1 and NK-3 type tachykinin receptor mRNA expression in the rat spinal cord dorsal horn is increased during adjuvant or formalin-induced nociception. **J Neurosci.**, v. 14, p. 712-20, 1994.
- MCDONALD, D.M.; BOWDEN, J.J.; BALUK, P.; et al. Neurogenic inflammation. A model for studying efferent actions of sensory nerves. **Adv Exp Med Biol.**, v. 410, p. 453-62, 1996.
- MENEZES, M.S.; TEIVE, H.A.G. Doença de Parkinson. Rio de Janeiro: ed. Guanabara Koogan, 2003.
- MILLER, D.B.; O'CALLAGHAN, J.P. Biomarkers of Parkinson's disease: present and future. **Metabolism**, v. 64, S40–6, 2015.

MISHRA, A.; LAL, G. Neurokinin receptors and their implications in various autoimmune diseases. **Current Research in Immunology**, v. 2, p. 66–78, 2021.

MUNÓZ, A.; GARRIDO-GIL, P.; DOMINGUEZ-MEIJIDE, A.; et al. Angiotensin type 1 receptor blockage reduces L-dopa-induced dyskinesia in the 6-OHDA model of Parkinson's disease. Involvement of vascular endothelial growth factor and interleukin-1 β . **Exp. Neurol.**, v. 261, p. 720–732, 2014.

MUÑOZ, M.; COVEÑAS, R. Neurokinin receptor antagonism: a patent review (2014-present). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 30, p. 527-539, 2020.

MUÑOZ, M.; COVEÑAS, R. Safety of neurokinin-1 receptor antagonists. **Expert Opin Drug Saf**, v. 12, p. 673-85, 2013.

MUÑOZ, M.; COVEÑAS, R. Involvement of substance P and the NK-1 receptor in cancer progression. **Peptides**, v. 48, p. 1–9, 2013b.

MUÑOZ, M.; COVEÑAS, R. Substance P. In: Encyclopedia of Endocrine Diseases. Oxford: Academic Press, 2^a edition, v. 1, p. 571-8, 2019.

NAKAYA, Y.; KANEKO, T.; SHIGEMOTO, R.; et al. Immunohistochemical localization of substance P receptor in the central nervous system of the adult rat. **J Comp Neurol**, v. 347, p. 249-274, 1994.

NAKASO, K.; ITO, S.; NAKASHIMA, K. Caffeine activates the PI3K/Akt pathway and prevents apoptotic cell death in a Parkinson's disease model of SH-SY5Y cells. **Neurosci. Lett.**, v. 432, p. 146e150, 2008.

NALINE, E.; DEVILLIER, P.; DRAPEAU, G.; et al. Characterization of neurokinin effects and receptor selectivity in human isolated bronchi. **Am Rev Respir Dis.**, v. 140, p. 679-86, 1989.

NAVARRO, V.M.; RUIZ-PINO, F.; SÁNCHEZ-GARRIDO, M.A.; et al. Role of neurokinin B in the control of female puberty and its modulation by metabolic status. **J Neurosci.**, v. 32, p. 2388-97, 2012.

NAWA, H.; DOTEUCHI, M.; IGANO, K.; et al. Substance K: a novel mammalian tachykinin that differs from substance P in its pharmacological profile. **Life Sci.**, v. 34, p. 1153-60, 1984.

OLIN, J.; SCHNEIDER, L. Galantamine for Alzheimer's disease. **Cochrane Database Syst Rev**, CD001747, 2001.

ONAGA, T. Tachykinin: recent developments and novel roles in health and disease. **BioMol Concepts**, v. 5, p. 225-43, 2014.

OSTOCK, C.Y.; DUPRE, K.B.; JAUNARAJ, K.L.; et al. Role of the primary motor cortex in L-Dopa-induced dyskinesia and its modulation by 5-HT_{1A} receptor stimulation. **Neuropharmacology**, v. 61, p. 753–760, 2011.

- OTSUKA, M.; YOSHIOKA, K. Neurotransmitter functions of mammalian tachykinins. **Physiol. Rev.**, v. 73, p. 230, 1993.
- OVSEPIAN, S.V.; ANWYL, R.; ROWAN, M.J. Endogenous acetylcholine lowers the threshold for long-term potentiation induction in the CA1 area through muscarinic receptor activation: in vivo study. **European Journal of Neuroscience**, v. 20, p. 1267–1275, 2004.
- PAGE, N.M.; WOODS, R.J.; GARDINER, S.M.; et al. Excessive placental secretion of neurokinin B during the third trimester causes pre-eclampsia. **Nature**, v. 405, p. 797-800, 2000.
- PAGE, N. M.; BELL, N.J.; GARDINER, S.M.; et al. Characterization of the endokinins: human tachykinins with cardiovascular activity. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**; v. 100, p. 62456250, 2003.
- PAGE, N.M.; DAKOUR, J.; MORRISH, D.W. Gene regulation of neurokinin B and its receptor NK3 in late pregnancy and pre-eclampsia. **Mol Hum Reprod.**, v. 12, p. 427-33, 2006.
- PAKASKI, M.; KALMAN, J. Interactions between the amyloid and cholinergic mechanisms in Alzheimer's disease. **Neurochem Int**, v. 53, p. 103-11, 2008.
- PAN, J.; ZHANG, Q.G.; ZHANG, G.Y. The neuroprotective effects of K252a through inhibiting MLK3/MKK7/ JNK3 signaling pathway on ischemic brain injury in rat hippocampal CA1 region. **Neuroscience.**, v. 131, p. 147–59, 2005.
- PANNACCIONE, A.; BOSCIA, F.; SCORZIELLO, A.; et al. Up-regulation and increased activity of KV3.4 channels and their accessory subunit MinK-related peptide 2 induced by amyloid peptide are involved in apoptotic neuronal death. **Mol. Pharmacol.** v. 72, p. 665–673, 2007.
- PARK, S.W.; YAN, Y.P.; SATRIOTOMO, I.; et al. Substance P is a promoter of adult neural progenitor cell proliferation under normal and ischemic conditions. **J. Neurosurg.**, v. 107, p. 593–599, 2007.
- PARDESHI, C.V.; BELGAMWAR, V.S.; TEKADE, A.R.; et al. Novel surface modified polymer-lipid hybrid nanoparticles as intranasal carriers for ropinirole hydrochloride: in vitro, ex vivo and in vivo pharmacodynamic evaluation. **J Mater Sci Mater Med.**, v. 24, p. 2101–15, 2013.
- PENNEFATHER, J.N.; LECCI, A.; CANDENAS, M.L.; et al. Tachykinins and tachykinin receptors: a growing family. **Life Sci**, v. 74, p. 1445-63, 2004.
- PICARD, P.; REGOLI, D.; COUTURE, R. Cardiovascular and behavioural effects of centrally administered tachykinins in the rat: characterization of receptors with selective antagonists. **Br J Pharmacol.**, v. 112, p. 240-9, 1994.
- PIERI, M.; AMADORO, G.; CARUNCHIO, I.; et al. SP protects cerebellar granule cells against beta-amyloid-induced apoptosis by down-regulation and reduced activity of Kv4 potassium channels. **Neuropharmacology.**, v. 58, p. 268-76, 2010.

- PINTO, F.M.; CINTADO, C.G.; DEVILLIER, P.; et al. Expression of preprotachykinin-B, the gene that encodes neurokinin B, in the rat uterus. **Eur J Pharmacol.**, v. 425, (2):R1-2, 2001.
- PRESTON, Z.; RICHARDSON, P.J.; PINNOCK, R.D.; et al. NK-3 receptors are expressed on mouse striatal gamma-aminobutyric acid-ergic interneurons and evoke [(3)H] gamma-aminobutyric acid release. **Neurosci. Lett.**, v. 284, p. 89-92, 2000.
- QUESADA, A.; LEE, B.Y.; MICEVYCH, P.E. PI3 kinase/Akt activation mediates estrogen and IGF-1 nigral DA neuronal neuroprotection against a unilateral rat model of Parkinson's disease. **Dev. Neurobiol.**, v. 68, p. 632e644, 2008.
- QUERFURTH, H.W.; LAFERLA, F.M. Alzheimer's disease. **N Engl J Med.**, v. 362, p. 329–344, 2010.
- QUIGLEY, B.; KOWALL, N. Substance P-like immunoreactive neurons are depleted in Alzheimer's disease cerebral cortex. **Neuroscience**, v. 41, p. 41-60, 1991.
- REGOLI, D.; BOUDON, A.; FAUCHERE, J.L. Receptors and antagonists for substance P and related peptides. **Pharmacological Reviews**, v. 46, p. 551 – 599, 1994.
- REID, M.S.; HERRERA-MARSCHTZ, M.; HOKFELT, T.; et al. Effects of intranigral substance P and neurokinin A on striatal dopamine release. Interactions with substance P antagonists. **Neuroscience**, v. 36, p. 643–658, 1990A.
- REID, M.S.; HERRERA-MARSCHTZ, M.; HOKFELT, T.; et al. Striatonigral GABA, dynorphin, substance P and neurokinin A modulation of nigrostriatal dopamine release: evidence for direct regulatory mechanisms. **Exp Brain Res.**, v. 82, p. 293-303, 1990-C.
- REID, M.S.; HERRERA-MARSCHTZ, M.; KEHR, J.; et al. Striatal dopamine and glutamate release: effects of intranigral injections of substance P. **Acta physiol. scand.**, v. 140, p. 527–537, 1990-B.
- REID, T.W.; MURPHY, C.J.; IWAHASHI, C.K.; et al. Stimulation of epithelial cell growth by the neuropeptide substance P. **J. Cell. Biochem.**, v. 52, p. 476–485, 1993.
- REISBERG, B.; DOODY, R.; STOFFLER, A.; et al. Memantine Study Group. Memantine in moderate-to-severe Alzheimer's disease. **N Engl J Med**, v. 348, p. 1333–1341, 2003.
- REITZ, C.; BRAYNE, C.; MAYEUX, R. Epidemiology of Alzheimer disease. **Nat Rev Neurol**, v. 7, p. 137 –152, 2011.
- RYMAN, D.C.; ACOSTA-BAENA, N.; AISEN, P.S.; et al. Symptom onset in autosomal dominant Alzheimer disease: A systematic review and meta-analysis. **Neurology**, v. 83, p. 253 –260, 2014.
- RIZEK, P.; KUMAR, N.; JOG, M.S. An update on the diagnosis and treatment of Parkinson disease. **CMAJ.**, v. 188, p. 1157-1165, 2016.

ROSLER, N.; WICHART, I.; JELLINGER, K. Clinical significance of neurobiochemical profiles in the lumbar cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients. **Journal of neural transmission**, v. 108, p. 231, 2001.

RUSH, D.K.; ASCHMIES, S.; MERRIMAN, M.C. Intracerebral β -amyloid(25–35) produces tissue damage: Is it neurotoxic? **Neurobiology of Aging**, v. 13, p. 591–594, 1992.

SAGAR, H.J.; SULLIVAN, E.V.; GABRIELI, J.D.; et al. Temporal ordering and short-term memory deficits in Parkinson's disease. **Brain**, v. 111, p. 525–39, 1988.

SAITO, H.; YOSHIZAWA, H.; YOSHIMORI, K.; et al. Efficacy and safety of single-dose fosaprepitant in the prevention of chemotherapy-induced nausea and vomiting in patients receiving high-dose cisplatin: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. **Ann Oncol**, v. 24, p. 1067–73, 2013.

SAKANAKA, M.; INAGAKI, S.; SHIOSAKA, S.; et al. Ontogeny of substance P-containing neuron system of the rat: immunohistochemical analysis—II Lower brain stem. **Neuroscience**, v. 7, p. 1097–1126, 1982.

SALMAN, H.; SHAH, M.; ALI, A.; et al. Assessment of Relationship of Serum Neurokinin-B Level in the Pathophysiology of Pre-eclampsia: A Case-Control Study. **Adv Ther.**, v. 35, p. 1114–1121, 2018.

SANCHEZ-IGLESIAS, S.; SOTO-OTERO, R.; IGLESIAS-GONZALEZ, J.; et al. Analysis of brain regional distribution of aluminium in rats via oral and intraperitoneal administration. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 21, p. 31–34, 2007.

SANTINI, E.; VALJENT, E.; FISONE, G. Parkinson's disease: levodopa-induced dyskinesia and signal transduction. **FEBS J.**, v. 275, p. 1392–1399, 2008.

SATAKE, H.; KAWADA, T. Overview of the primary structure, tissue distribution and functions of tachykinins and their receptors. **Curr. Drug Targets**, v. 7, p. 963–974, 2006.

SCHABLE, S.; HUSTON, J.P.; BARROS, M.; et al. The NK3 receptor agonist senktide ameliorates scopolamine-induced deficits in memory for object, place and temporal order. **Neurobiol. Learn. Mem.**, v. 97, p. 235–240, 2012a.

SCHABLE, S.; HUSTON, J.P.; DE SOUZA SILVA, M.A. Neurokinin2-R in medial septum regulate hippocampal and amygdalar ACh release induced by intraseptal application of neurokinins A and B. **Hippocampus**, v. 22, p. 1058–1067, 2012b.

SCHABLE, S.; TOPIC, B.; BUDDENBERG, T.; et al. Neurokinin(3)-R agonism in aged rats has anxiolytic-, antidepressant-, and promnesic-like effects and stimulates ACh release in frontal cortex, amygdala and hippocampus. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 21, p. 484–94, 2011.

SCORRANO, L.; OAKES, S.A.; OPFERMAN, J.T.; et al. BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca²⁺: A control point for apoptosis. **Science**, v. 300, p. 135–139, 2003.

SELKOE, D.J. Amyloid beta-protein and the genetics of Alzheimer's disease. **J Biol Chem.**, v. 271, p. 18295-8, 1996.

SELKOE, D.; MANDELKOW, E.; HOLTZMAN, D. Deciphering Alzheimer Disease. **Cold Spring Harbor Perspect. Med.**, v. 2, a011460, 2012.

SEVERINI, C.; IMPROTA, G.; FALCONIERI-ERSPAMER, G.; et al. The tachykinin peptide family. **Pharmacol Rev** 2002; 54:285-322.

SHIMOKE, K.; CHIBA, H.; Nerve growth factor prevents 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced cell death via the Akt pathway by suppressing caspase-3-like activity using PC12 cells: relevance to therapeutic application for Parkinson's disease. **J. Neurosci. Res.**, v. 63, p. 402e409, 2001.

SHUGHURE, P.J.; LANE, M.V.; MERCHENTHALER, I. In situ hybridization analysis of the distribution of neurokinin-3 mRNA in the rat central nervous system. **J.Comp. Neurol.**, v. 372, p. 395-414, 1996.

SINGLETON, A.B.; FARRER, M.J.; BONIFATI, V. The genetics of Parkinson's disease: Progress and therapeutic implications. **Mov Disord**, v. 28, p. 14–23, 2013.

SIUCIAK, J.A.; MCCARTHY, S.A.; MARTIN, A.N.; et al. Disruption of the neurokinin-3 receptor (NK3) in mice leads to cognitive deficits. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 194, p. 185–95, 2007.

STEINHOFF, M.S.; VON MENTZER, B.; GEPPETTI, P.; et al. Tachykinins and their receptors: contributions to physiological control and the mechanisms of disease. **Physiol Rev.**, v. 94, p. 265–301, 2014.

STOESSL, A.J. Localization of striatal and nigral tachykinin receptors in the rat. **Brain Res**, v. 646, p. 13-18, 1994.

SUZUKI, Y.; ITOH, H.; AMADA, K.; et al. Significant increase in salivary substance p level after a single oral dose of cevimeline in humans. **Int. J. Pept.**, 2013, 284765, 2013.

THORNTON, E.; TRAN, T.T.; VINK, R. A substance P mediated pathway contributes to 6-hydroxydopamine induced cell death. **Neurosci Lett.** v.; 481, p. 64-7, 2010.

THORNTON, E.; VINK, R. Treatment with a substance P receptor antagonist is neuroprotective in the intrastriatal 6-hydroxydopamine model of early Parkinson's disease. **PLoS One.** v. 7, e34138, 2012.

THORNTON, E.; HASSALL, M.M.; CORRIGAN, F.; VINK, R. The NK1 receptor antagonist N-acetyl-L-tryptophan reduces dyskinesia in a hemi-parkinsonian rodent model. **Parkinsonism Relat Disord.**, v. 20, p. 508-13, 2014.

TOUSIGNANT, C.; DION, S.; DRAPEAU, G.; et al. Characterisation of pre- and postjunctional receptors for kinins and neurokinins in the rat vas deferens. **Neuropeptides**, v. 9, p. 333-43, 1987.

VARGHA-KHADEM, F.; GADIAN, D.G.; WATKINS, K.E.; et al. Differential effects of early hippocampal pathology on episodic and semantic memory. **Science**, v. 277, p. 376–380, 1997.

VON EULER, U.S.; GADDUM, J.H. **J. Physiol.**, v. 72, 74-87, 1931.

WANG, J.; DU, X.X.; JIANG, H.; et al. Curcumin attenuates 6-hydroxydopamine-induced cytotoxicity by anti-oxidation and nuclear factor-kappa B modulation in MES23.5 cells. **Biochem Pharmacol**, v. 78, p. 178-183, 2009.

WANG, S.Y.; CHEN, L.; XUE, Y.; et al. Substance P prevents 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced cytotoxicity through inhibition of apoptosis via neurokinin-1 receptors in MES23.5 cells. **Mol Med Rep.**, v. 12, p. 8085-92, 2015.

WANG, Q.; CHU, C.H.; QIAN, L.; et al. Substance P exacerbates dopaminergic neurodegeneration through neurokinin-1 receptor-independent activation of microglial NADPH oxidase. **J Neurosci.**, v. 34, p. 12490-503, 2014.

WENK, B.G.L.; ZAJACZKOWSKI, W.; DANYSZ, W. Neuroprotection of acetylcholinergic basal forebrain neurons by memantine and neurokinin. **Behav Brain Res.**, v. 83, p. 129-33, 1997.

YAMAUCHI, T.; NAKATA, H.; FUJISAWA, H. A new activator protein that activates tryptophan 5-monooxygenase and tyrosine 3-monooxygenase in the presence of Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase. Purification and characterization. **J. Biol. Chem.**, v. 256, p. 5404–5409, 1981.

YANKNER, B.A.; DUFFY, L.K.; KIRSCHNER, D.A. **Science**, v. 250, p. 279-282, 1990.

YANG, X.; ZHAO, H.; SHI, H.; et al. Intranigral administration of substance P receptor antagonist attenuated levodopa-induced dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease. **Exp Neurol.**, v. 271, p. 168-74, 2015.

YU, S.P. Regulation and critical role of potassium homeostasis in apoptosis. **Prog. Neurobiol.**, v. 70, p. 363–386, 2003.

YU, S.P.; YEH, C.H.; SENSI, S.L.; et al. Mediation of neuronal apoptosis by enhancement of outward potassium current. **Science**, v. 278, p. 114–117, 1997.

YU, S.P.; FARHANGRAZI, Z.S.; YING, H.S.; et al. Enhancement of outward potassium current may participate in beta-amyloid peptide-induced cortical neuronal death. **Neurobiol. Dis.**, v. 5, p. 81–88, 1998.

YU, S.P.; YEH, C.H.; GOTTRON, F.; et al. Role of the outward delayed rectifier K⁺ current in ceramide-induced caspase activation and apoptosis in cultured cortical neurons. **J. Neurochem.**, v. 73, p. 933–941, 1999.

XIAO, Y.; WANG, X.; WANG, S.; et al. Celastrol Attenuates Learning and Memory Deficits in an Alzheimer's Disease Rat Model. **Biomed Res Int.**, 2021:5574207, 2021.

ZENG, X.P.; MOORE, K.H.; BURCHER, E. Characterization of Tachykinin NK sub 2 Receptors in Human Urinary Bladder. **E. J. Urol.**, v. 153, p. 1688-92, 1995.

ZHAO, Y.Z.; JIN, R.R.; YANG, W.; et al. Using Gelatin Nanoparticle Mediated Intranasal Delivery of Neuropeptide Substance P to Enhance Neuro-Recovery in Hemiparkinsonian Rats. **PLoS One**. v. 11, p. e0148848, 2016.

ZHANG, X.; ANDREN, P.E.; CHERGUI, K.; et al. Neurokinin B/NK3 receptors exert feedback inhibition on L-DOPA actions in the 6-OHDA lesion rat model of Parkinson's disease. **Neuropharmacology**, v. 54, p. 1143-52, 2008.

ZLOMUZICA, A.; DERE, E.; HUSTON.; J.P.; et al. NK(3) receptor agonism promotes episodic-like memory in mice. **Neurobiol Learn Mem.**, v. 90, p. 420–5, 2008.

ZHENG, W.H.; BASTIANETTO, S.; MENNICKEN, F.; et al. Amyloid beta peptide induces tau phosphorylation and loss of cholinergic neurons in rat primary septal cultures. **Neuroscience.**, v. 115, p. 201-11, 2002.

4 ARTIGO 2 - ANTAGONISTA DOS RECEPTORES NEUROKINÉRGICOS NK₁, L-733,060, EXERCE EFEITO PROTETOR CONTRA O DÉFICIT COGNITIVO, ESTRESSE OXIDATIVO E APOPTOSE INDUZIDOS PELA ADMINISTRAÇÃO CENTRAL DE ESTREPTOZOTOCINA EM RATOS WISTAR.

Resumo: A Doença de Alzheimer (DA) é a primeira doença neurodegenerativa mais prevalente e incapacitante no mundo, e caracteriza-se pela perda progressiva e irreversível das funções cognitivas. Fenômenos de estresse oxidativo, neuroinflamação e apoptose neuronal participam da progressão da doença. Células microgliais ativadas recrutam um conjunto de moléculas bioativas que contribuem para a neuroinflamação, entre elas a substância P (SP), uma das principais neurocininas endógenas. No entanto, a real participação da SP e de seus receptores neurokinérgicos (RNK₁) na fisiopatogenia da DA ainda não está completamente esclarecida. O presente estudo teve por objetivo investigar a possível participação dos RNK₁ nas alterações cognitivas e em marcadores de estresse oxidativo, neuroinflamação e apoptose neuronal em um modelo animal de DA induzido pela estreptozotocina (ETZ). Ratos Wistar adultos machos com cânulas previamente implantadas por estereotaxia no ventrículo lateral (i.c.v.) receberam a ETZ (0,1mg ou 0,2mg) e, posteriormente, foram investigados os efeitos do tratamento agudo ou repetido (5 dias) com o antagonista de RNK₁ L-733,060 (0,1nmol) contra as alterações cognitivas induzidas pela ETZ em ratos avaliados nos testes da esQUIVA INIBITÓRIA (TEI) e de reconhecimento de objetos novos (TRO). Os principais indicadores de estresse oxidativo (GSH, SOD, CAT, TBARS, NOx), neuroinflamação (IL-1 β) e apoptose neuronal (CASP-1 e -3, BAX e PAR-4) foram analisados no hipocampo, assim a neurodegeneração pela técnica de Fluoro Jade C (FJC). Nossos resultados mostraram que o tratamento i.c.v. com L-733,060 aboliu o prejuízo cognitivo induzido pela ETZ, recuperando a memória de trabalho (MT), de curta (MC) e/ou de longa duração (ML) no TEI e TRO. Nenhum dos tratamentos alterou as atividades exploratória e motora no CA e RR, respectivamente. A ETZ reduziu a atividade da CAT e aumentou os níveis de TBARS no córtex e hipocampo, assim como reduziu a SOD e aumentou o conteúdo de NOx no córtex. Essas alterações foram abolidas pelo tratamento repetido com L-733,060. Embora a ETZ *per se* não tenha modificado os indicadores de apoptose e neuroinflamação/neurodegeneração, o tratamento com L-733,060 aumentou o imunocontéudo da CASP-3 concomitantemente com uma redução da BAX no grupo que recebeu a neurotoxina. Nossos resultados sugerem que os RNK₁ para SP estão envolvidos nas alterações cognitivas induzidas pela ETZ em um modelo experimental de DA esporádica, e que o antagonista dos RNK₁ exerce efeitos neuroprotetores envolvendo atividade antioxidante e antiapoptótica.

Palavras-chaves: L-733,060; antagonista NK₁; antioxidante; antiapoptótico; alzheimer.

1 INTRODUÇÃO

A Doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa, progressiva e irreversível, caracterizada por alterações cognitivas (perda progressiva da memória e demais habilidades cognitivas) (Selkoe, 2001; Duyckaerts *et al.*, 2009). Entre as doenças neurodegenerativas é a mais frequente, representando entre 60-80% de todos os casos de demência e afetando cerca de 35,6 milhões de pessoas em todo mundo (Reitz *et al.* 2011; Mayeux e Stern 2012).

Esta patologia tem sido associada a fios emaranhados de tau intracelular conhecidos como emaranhados neurofibrilares e depósitos extracelulares de placas amilóide- β (A β) no cérebro, sendo os principais achados histopatológicos (Querfurth e Laferia, 2010). Além disso, a DA é marcada por uma acentuada perda neuronal, resultando na diminuição das sinapses, consequentemente levando a morte celular, estresse oxidativo e uma forte resposta inflamatória. Ainda, apresenta uma redução significativa de neurônios colinérgicos que conduzem a uma perda de acetilcolina (Li *et al.*, 2011). Estas alterações estão presentes principalmente em regiões cerebrais relacionadas a habilidades cognitivas (aprendizado e memória), como córtex entorrinal, hipocampo e amígdala (Mattson, 2004). Atualmente o tratamento da DA limita-se apenas a aliviar sintomas e retardar a evolução da doença. Demonstrando a necessidade de desenvolvimento de novas opções de intervenção farmacológica no tratamento desta patologia.

As neurocininas são um grupo de neuropeptídeos amplamente distribuídos pelo sistema nervoso e imunológico. Dentre elas, a Substância P (SP) é a mais abundante no cérebro (Marriott, 2004) e seus receptores NK₁ (RNK₁) estão presentes tanto no SNC quanto periférico (Otsuka e Yoshioka, 1993). A SP participa da regulação de diversas respostas fisiológicas, em neurônios, em células microgliais, células endoteliais e do sistema imune periférico (Ebner e Singewald, 2006); entretanto até o presente momento seu principal papel é no envolvimento da resposta inflamatória (Rasley *et al.*, 2004; Chauhan *et al.*, 2008). Evidências mostram que a SP desempenha um papel crítico no aumento dos níveis de citocinas inflamatórias e diminuições nos níveis imunossupressores (Chauhan *et al.*, 2011).

A interação da SP endógena com o RNK₁ é um componente essencial na iniciação e/ou progressão da inflamação após infecções virais, bacterianas e parasitárias do SNC (Robinson *et al.*, 2002; Rasley *et al.*, 2004; Vinet-Oliphant *et al.*, 2010; Chauhan *et al.*, 2011). Além disso, já foram observados níveis reduzidos de SP nas regiões corticais dos tecidos

cerebrais *post mortem* e no fluido cerebrospinal de paciente com DA (Raffa, 1998). Neste sentido, o objetivo do presente estudo foi investigar a possível participação dos RNK₁ para SP nas alterações cognitivas e em marcadores de estresse oxidativo, neuroinflamação e apoptose neuronal em um modelo animal de DA esporádica induzido pela infusão central de estreptozotocina (ETZ).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Animais e considerações éticas

Foram utilizados ratos Wistar adultos, machos, provenientes do Biotério Setorial do DFF da UFPE. Os animais foram mantidos em uma sala com condições controladas de temperatura (22 ± 2 °C) e iluminação (ciclo claro/escuro de 12 horas, com luz ligada às 7:00 h). Água e comida disponíveis à vontade. Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com os padrões internacionais de bem-estar dos animais recomendados pela Sociedade Brasileira de Neurociência e Comportamento (SBNeC) e pela Society for Neuroscience (SFN). Os protocolos experimentais foram submetidos e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA/UFPE - Processo nº 0014/2018).

2.2 Drogas e soluções

Foram utilizadas as seguintes drogas: antagonista seletivo dos receptores NK₁L-733,060 (Tocris Bioscience, Avonmouth, Bristol United Kingdom), Hemitartarato de rivastigmina (Aché Laboratórios Farmacêuticos S.A. Guarulhos – SP, Brasil); quetamina (Dopalen, Sespo Ind. E Com. Ltda, SP, Brasil); xilazina (SESPO Ind. e Com. Ltda, SP, BRASIL); lidocaína (Bravet®, Bravet Ltda, RJ, Brasil); heparina (Blau Farmacêutica S.A.); hidrato de cloral (Sigma-Aldrich, Brasil); paraformaldeído e estreptozotocina (ETZ; Cayman Chem., Michigan, USA). L-733,060 foi dissolvido em etanol absoluto como solução estoque na concentração de 1mM e armazenado à -20°C. No momento do uso, L-733,060 foi diluído em solução tampão fosfato PBS (pH=7.4; VWR Life Science Products, Solon, Ohio, USA).

2.3 Cirurgias estereotáxicas

O procedimento de estereotaxia foi realizado para a implantação de uma cânula-guia unilateral diretamente no ventrículo lateral (i.c.v) para posterior administração das drogas. Ratos foram anestesiados com quetamina (100mg/kg) e xilazina (20mg/kg) (i.p.) e

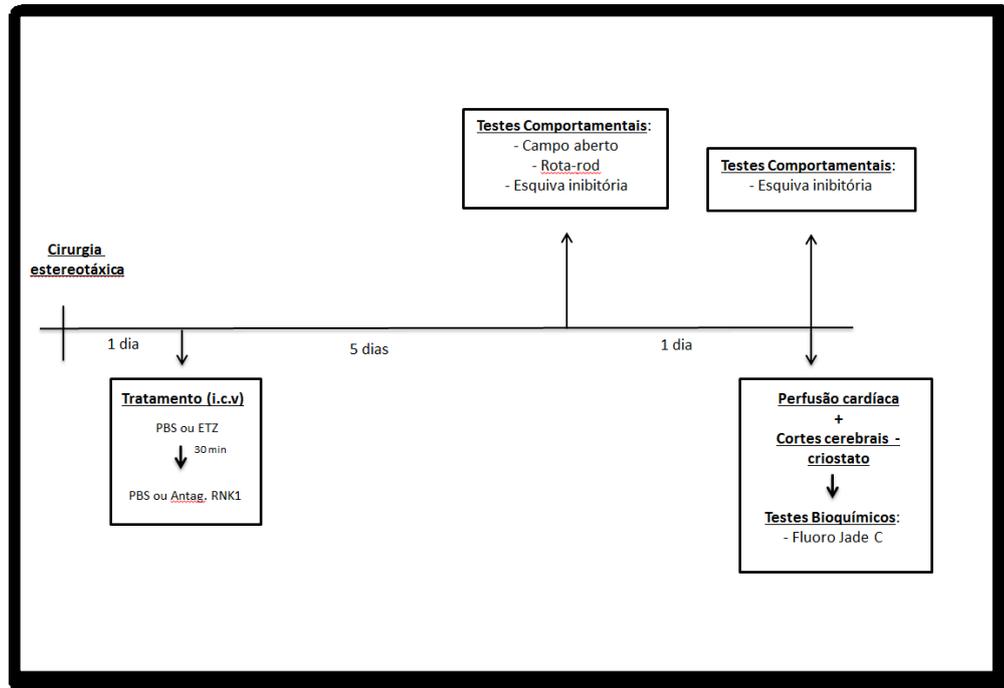
imobilizados individualmente no aparelho estereotáxico (Insight® Ltda., Ribeirão Preto, SP, Brasil). Foi administrada lidocaína (com 2 % de vasoconstrictor) na face rostral da cabeça, por via subcutânea, para anestesia local e redução do extravasamento sanguíneo no momento da incisão. A calota craniana foi perfurada com uma broca odontológica para a fixação de dois parafusos (um em cada lado dos ossos parietais) e uma cânula-guia foi colocada no ventrículo lateral. Foram utilizadas coordenadas para identificação do ventrículo lateral: ântero-posterior (AP = - 0,8 mm), medial-lateral (ML = +/- 1,5 mm) e dorso-ventral (DV = - 2,5 mm), segundo Paxinos & Watson (1998).

Após o término das cirurgias, os ratos foram reconduzidos às suas caixas recebendo água e ração à vontade. No período de recuperação os animais foram manipulados somente durante a troca das caixas. Findo este período, os ratos foram divididos em grupos e tratados por via central com uma injeção de PBS, ETZ ou L-733.060 através de uma agulha injetora conectada por um tubo de polietileno (PE-10 STWL; Plastics One Inc., Virginia, USA) utilizando uma micro-seringa com capacidade de 10µl (Hamilton 701 N).

2.4 Delineamento experimental

Protocolo 1 (Modelo Alzheimer – Tratamento dose única): Vinte e quatro horas após às cirurgias estereotáxicas para a implantação de cânulas unilateralmente i.c.v. cada rato recebeu uma dose única de ETZ 0,1mg (4µL/sítio). Após 30 minutos, os animais receberam o veículo (PBS, 4µL) ou o antagonista de receptores NK₁ L-733,060 (0,1nmol, 4µL). No 5º e 6º dia após o tratamento central, os animais foram avaliados sequencialmente nos testes comportamentais: campo aberto, roda giratória e esquivas inibitórias. Posteriormente foi realizada a perfusão intracardíaca e os cérebros removidos e seccionados a 40µm em um criostato para a posterior realização dos ensaios de neurodegeneração pela técnica do Fluoro Jade C.

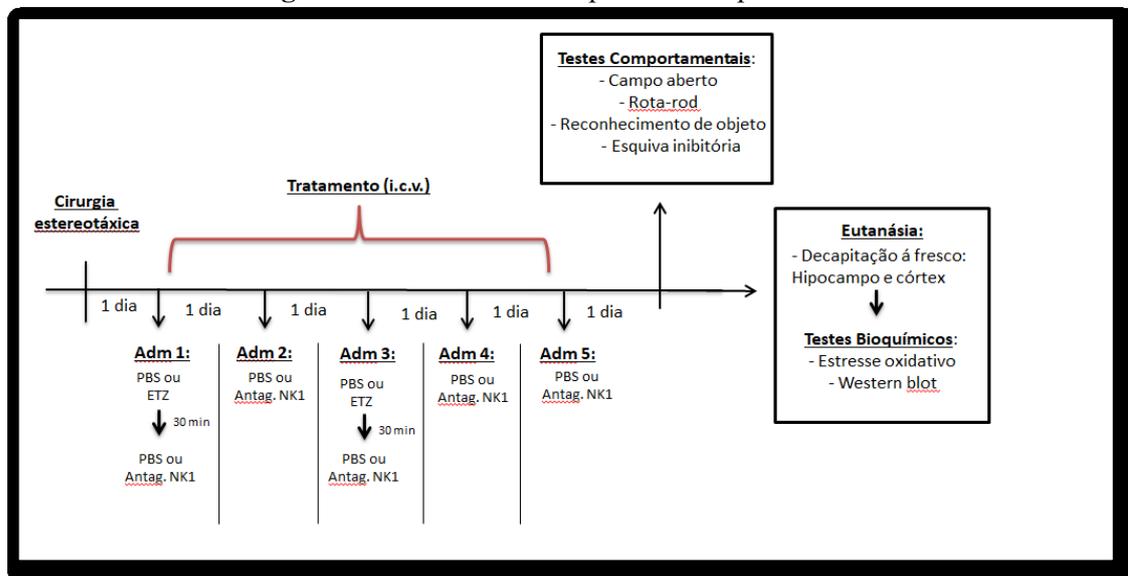
Figura 1: Delineamento do protocolo experimental 1



Fonte: Próprio autor.

Protocolo 2 (Modelo Alzheimer - Tratamento dose repetida): Vinte e quatro horas após às cirurgias estereotáxicas para a implantação de cânulas unilateralmente i.c.v. a ETZ 0,1mg (4 μ L/sítio) foi administrada, com uma segunda dose sendo repetida 48h após, totalizando 0,2mg de ETZ/sítio. Após 30 minutos da última microinjeção central, cada rato recebeu um tratamento repetido i.c.v. por 5 dias consecutivos com o veículo (PBS, 4 μ L) ou com o antagonista de receptores NK₁ L-733,060 (0,1nmol, 4 μ L). No dia seguinte, após o último tratamento central, os animais foram avaliados sequencialmente nos testes comportamentais do campo aberto, roda giratória e esquiva inibitória. Outros grupos de ratos foram submetidos ao mesmo procedimento descrito anteriormente, porém sendo avaliados no teste de reconhecimento de objetos. Posteriormente, os animais foram decapitados e o cérebro removido para dissecação do córtex e hipocampo, que foram armazenados para análises bioquímicas posteriores (estresse oxidativo e Western blot).

Figura 2: Delineamento do protocolo experimental 2



Fonte: Próprio autor.

2.5 Testes comportamentais

2.5.1 Teste do campo aberto (*Open-field*)

O experimento foi realizado de acordo com a metodologia de avaliação de atividade locomotora em uma arena de madeira recoberta com fórmica impermeável branca, com o chão branco de 100x100cm (dividida por linhas pretas em 25 quadrados de 20x20cm) e paredes brancas (40cm de altura). Cada rato foi colocado individualmente no centro da arena e, durante uma sessão de 5 minutos, foram contabilizados o número de cruzamentos centrais e periféricos percorridos, bem como o número de comportamentos de levantar (*rearing*). O número total de cruzamentos percorridos foi determinado pelo somatório dos quadrantes centrais e periféricos (Kelly, 1993).

2.5.2 Teste da roda giratória (*Rotarod*)

O rotarod é um dos testes mais utilizados para avaliar a função motora em roedores, por ser considerado um dos mais sensíveis para este propósito. Foi utilizado um aparelho rotarod automatizado (EFF 411, Insight® Ltda., Ribeirão Preto, SP, Brasil), que consiste em uma caixa de acrílico com um cilindro de 7cm de diâmetro, instalado transversalmente a aproximadamente 20cm do piso do equipamento, mantido em rotação (16 r.p.m) através de um motor. Ratos pré-selecionados foram colocados sobre a barra giratória e a latência para a primeira queda (em s) e o número de quedas durante a sessão foi registrado. Este teste permite

avaliar se os tratamentos promovem incoordenação motora nos animais (Dunham e Miya, 1957).

2.5.3 Teste da esQUIVA inibitória (*Step-down*)

As memórias de trabalho (MT), de curto (MC) e de longo prazo (ML) foram avaliadas através do teste da esQUIVA inibitória do tipo *step-down*. O aparelho consistiu em uma caixa (30x20x20cm) composta por três paredes e aço e uma de acrílico, com uma plataforma (8,0x1,5x20cm) na sua extremidade direita e uma base quadrada (grade metálica de 22x20cm) do lado esquerdo contendo uma série de barras de aço inoxidável (1mm de diâmetro) separadas em 1cm entre si e conectadas a um gerador de choque e a um scrambler (Insight® Ltda., Ribeirão Preto, SP, Brasil). Cada animal foi colocado individualmente sobre a plataforma e ao tocar o chão gradeado com as 4 patas, o animal recebeu um choque elétrico na intensidade de 0,5mA a 2s (sessão treino). Para a avaliação da memória, os animais foram submetidos à sessão teste aos 5s (memória de trabalho, MT), 90min (memória de curta duração, MC) e 24h (memória de longa duração, ML) após a sessão treino. O tempo (em s) que o animal permaneceu sobre a plataforma foi registrado e utilizado como índice de memória (Barros *et al.*, 2005).

2.5.6 Teste do reconhecimento de objetos

Para a realização da tarefa de reconhecimento de objetos foi utilizada a mesma arena descrita no item 2.5.1. O reconhecimento de objetos pode ser atribuído à preferência dos ratos em explorar mais os objetos novos do que os objetos familiares. Todos os animais foram inicialmente habituados ao ambiente (dia 0) durante 5 minutos vinte e quatro horas antes da sessão teste para a exploração do aparato na ausência de objetos. Na sessão treino os animais foram colocados na arena contendo dois objetos iguais cilíndricos de cor preta (A1 e A2) para livre exploração por 5 minutos. A sessão teste foi realizada 90 minutos após o treino para avaliação da memória de curta duração (MC), e 24 horas após o treino para avaliação da memória de longa duração (ML). Em cada sessão teste, um dos objetos foi substituído por um novo objeto (B para MC ou C para ML), permitindo o rato explorar o ambiente por mais 5 minutos em cada sessão. A exploração foi definida como cheirar ou tocar no objeto com o nariz e/ou as patas dianteiras. O tempo de exploração de cada objeto (“A1”, “A2”, “B” e “C”) foi cronometrado para posterior análise através do índice de discriminação de objeto (ID), calculado pela fórmula $[(\text{tempo de exploração do novo objeto} - \text{tempo de exploração do objeto familiar}) / \text{tempo total de exploração}] \times 100$ (Dere *et al.*, 2005a, 2005b).

2.6 Análises Bioquímicas

2.6.1 Dissecação de estruturas cerebrais

Os ratos foram submetidos à eutanásia por decapitação com guilhotina, sem uso de anestésicos, e seus cérebros rapidamente removidos e colocados em papel filtro em placa de Petri sob gelo. Imediatamente após, os cérebros foram lavados com solução gelada (4°C) de NaCl 0,9% e o córtex e o hipocampo foram isolados das estruturas circunjacentes utilizando tesoura de microdissecação. Terminada a dissecação, as estruturas cerebrais foram acondicionadas em tubos eppendorfs, pesadas e armazenadas em freezer à -80°C até o dia das análises bioquímicas.

2.6.2 Homogeneização dos tecidos

Os tecidos cerebrais foram sonicados e homogeneizados em tampão fosfato de sódio 20mM acrescido de cloreto de potássio 140mM em pH 7,4. O homogenato foi centrifugado a 3500rpm por 10 minutos a 4°C. Utilizou-se o sobrenadante para as análises posteriores.

2.6.3 Dosagem de proteínas

A concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford (1976). O princípio do método baseia-se na determinação da concentração de ligações peptídicas através da medida da absorvância do complexo proteína-corante. Este complexo absorve em comprimento de onda de 595 nm. A absorvância é considerada diretamente proporcional à concentração de proteína na solução analisada, onde uma solução de albumina (1 mg/mL) foi utilizada como padrão.

2.6.4 Estresse oxidativo

2.6.4.1 Conteúdo de glutathiona reduzida (GSH)

Os níveis de GSH foram determinadas de acordo com Sedlak e Lindsay (1968) com pequenas modificações. Os níveis de GSH foram avaliados por meio da quantificação de grupos sulfidril não proteicos em amostras de homogenato que foram submetidas à precipitação de proteínas por adição de TCA 20% seguida da centrifugação a 800g por 10 minutos. Os sobrenadantes foram utilizados para o ensaio bioquímico. L-cisteína foi utilizada para a construção da curva padrão dos grupos sulfidril e os resultados expressos em μmol de GSH.mg de proteína⁻¹.

2.6.4.2 Nitrito e nitrato (NOx)

As concentrações de nitratos e nitritos (NOx) em homogenato de córtex e hipocampo foram determinadas de acordo com Miranda *et al.*, (2001), utilizando o reagente de Griess (0,1% dihidrocloridronaftiletildiamida em água e 1% de sulfanilamida concentrada em 5% de ácido clorídrico). Uma curva de calibração foi feita utilizando nitrato de sódio, e cada

ponto da curva foi submetido aos mesmos tratamentos que as amostras. Neste protocolo, os nitratos são reduzidos pelo cloreto de vanádio a nitritos, que são detectados espectrofotometricamente a 540 nm pela reação com o reagente de Griess. Os resultados estão expressos em μmol de nitritos. mg de proteína⁻¹.

2.6.4.3 Atividade da enzima catalase (CAT)

A atividade enzimática da catalase foi determinada através do método de Aebi (1984). Na amostra previamente homogeneizada, foi adicionado Triton 0,1 % seguido de agitação. Esta mistura foi conservada em gelo durante 15 minutos. Ao tampão fosfato de potássio 10 mM, pH 7,0, foi adicionado H_2O_2 30 % (v/v). Após, foi realizada a leitura da queda da absorvância do H_2O_2 a 240 nm, à temperatura ambiente, durante 180 segundos. Para o cálculo, utilizou-se o coeficiente de degradação do H_2O_2 de 39,4 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Os resultados da atividade enzimática estão expressos em U/mg de proteína (unidade de atividade da catalase por mg de proteína).

2.6.4.4 Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi determinada de acordo com Bannister e Calabrese (1987). Primeiramente, foram realizadas leituras da auto-oxidação da adrenalina. Após, foram adicionados à amostra catalase 10mM, tampão glicina 50mM e adrenalina 60mM, e ao branco foi adicionada adrenalina 60mM. A atividade enzimática foi determinada pela inibição da auto-oxidação da adrenalina medida espectrofotometricamente em 480nm à temperatura ambiente. A atividade da enzima foi expressa em U/mg de proteína (unidade de atividade da SOD por mg de proteína).

2.6.4.5 Níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

O homogeneizado foi precipitado por meio de uma reação ácida com ácido tricloroacético (TCA, Vetec, São Paulo, Brasil) a 10% com sulfato de sódio adicionado ao sobrenadante na proporção 1:1 (v/v). Após centrifugação, o sobrenadante foi tratado com ácido tiobarbitúrico (TBA, Sigma-Aldrich St. Louis, MO, EUA) 0,67% na proporção de 1:1 (v/v). A mistura foi levada a um banho fervente durante 2 horas e, após, resfriada à temperatura ambiente. A absorvância obtida através da coloração rósea resultante foi medida em espectrofotômetro a 532nm. Concomitantemente, foi feita uma curva de calibração com 1,1,3,3- tetrametoxipropano, na qual todos os pontos foram tratados da mesma forma que as amostras. Os resultados foram expressos como nmol de TBARS/mg de proteína (Esterbauer e Cheeseman, 1990).

2.6.5 Ensaio de Western Blot (WB)

Na montagem do sistema vertical o gel de resolução foi confeccionado para uma concentração de 12,5% de poliacrilamida. De cada amostra, 40 µg de proteína total carregada com o tampão Blue Juice 5x foi aplicado nos poços do gel de concentração. O marcador de peso molecular usado foi o Full-Range Rainbow Marker (12-225 kDa; GE Healthcare). A corrida eletroforética foi realizada a uma voltagem constante de 120 V e 30 mA à temperatura ambiente. As proteínas separadas foram transferidas para membrana de nitrocelulose Hybond-ECL (GE Healthcare). Para este ensaio foram utilizados os seguintes anticorpos primários overnight: β -actina (Sigma Aldrich), Caspase-1 (Santa Cruz), Caspase-3 (Cell Signaling Technology), BAX (Santa Cruz), PAR-4 (Santa Cruz) e IL-1 β (Sino Biological), em uma diluição de 1:2500 (β -actina) e 1:1000 para demais anticorpos. As membranas foram incubadas com o anticorpo secundário mouse (1:10000) e rabbit (1:2000) durante 1 hora e seguido da revelação utilizando ECL Western Blotting (GE Healthcare) localizado no laboratório multiusuário do DFF.

2.6.6 Neurodegeneração por Fluoro-Jade C

O método histoquímico de marcação fluorescente foi realizado com o Fluoro-Jade C que se liga especificamente a neurônios em degeneração (Schmued e Hopkins, 2000). Após 7 dias da administração i.c.v. da neurotoxina ETZ os ratos foram anestesiados com hidrato de cloral 40 % e perfundidos transcardiacamente com tampão fosfato salina e, posteriormente, com paraformaldeído (PFA) 4% em PBS, pH 7,4. Após a perfusão, os cérebros foram removidos e colocados em fixador (PFA 4% em PBS) por 2 horas e em seguida transferidos para solução de PBS (0,1 M), para crioproteção. Os cérebros foram cortados em seções de 40µm em criostato (Microm HM-505-E) com temperatura variando entre -18 a -22 °C. Foram colocados 6 cortes coronais em cada lâmina previamente gelatinizada (solução para gelatinização: gelatina 0,5% e sulfato de cromo-alumínio 0,05%) espaçadas de 1 mm. Todas as placas foram armazenadas em freezer a -20 °C. Seguindo o protocolo proposto por Schmued *et al.*, (1997), as lâminas foram submetidas a banhos sucessivos de etanol absoluto durante 3 minutos, etanol 70% por 1 minuto, água destilada (dH₂O) por mais 1 minuto, permanganato de potássio durante 15 minutos com agitação branda, 3 lavagens em dH₂O por 1 minuto, 1 banho com fluoro-Jade (solução preparada a partir de 1 mL de FJ 0,0001% + 90 mL de ácido acético) por 30 minutos com agitação branda, 3 lavagens em dH₂O por 1 minuto, secagem das lâminas e, posteriormente, elas foram submersas em xilol e feita a montagem utilizando Entellan como meio de montagem. As lâminas foram analisadas com

auxílio do microscópio de fluorescência (EVOS M5000 Imaging System). Após capturadas, as imagens foram processadas e montadas no Software Adobe Photoshop (2015).

2.7 Análise estatística

Para as análises estatísticas foi utilizado o software Statistic[®] 10 (StatSoft Inc., EUA). Todas as variáveis foram submetidas ao teste de Shapiro-Wilk para análise da normalidade dos dados, a fim de definir a utilização de teste paramétrico ou não-paramétrico. Os dados que obedeceram a distribuição normal foram inicialmente submetidos à análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias. Para situações em que houve a reexposição de diferentes grupos experimentais ao mesmo contexto, adotou-se a ANOVA com medidas repetidas. Quando adequado, foi utilizado o teste *post-hoc* de Newman-Keuls para determinação das diferenças estatísticas entre os diferentes grupos experimentais. O teste “*t*” de Student bicaudal pareado ou não-pareado foi adotado para a comparação entre dois grupos experimentais. Para os dados que não obedeceram a distribuição normal foi utilizado os testes de Kruskal-Wallis (para comparações múltiplas) ou Mann-Whitney (para comparação entre dois grupos). Os gráficos foram confeccionados utilizando o software GraphPad Prism[®] 8.0 (GraphPad Prism, EUA), com os resultados expressos através da média \pm erro padrão da média (E.P.M.) ou mediana \pm intervalo interquartil (Q1-Q3), com os níveis de probabilidade inferiores ou iguais a 5% sendo considerados indicativos de diferenças significativas ($p \leq 0,05$).

3 RESULTADOS

Protocolo experimental 1 – Efeito do tratamento dose única com o antagonista dos RNK₁ no modelo animal de Doença de Alzheimer induzido por estreptozotocina

3.1 Teste do campo aberto

Em relação à movimentação central, a ANOVA de duas vias não revelou efeito significativo no Fator pré-tratamento [$F(1,33)=0,926$, $p=0,343$] e no Fator interação pré-tratamento x tratamento [$F(1,33)=0,160$, $p=0,691$], mas identificou um efeito significativo no Fator tratamento [$F(1,33)=7,238$, $p < 0,05$]. Apesar disso, o teste *post hoc* de Newman-Keuls não revelou qualquer diferença estatística entre os diferentes grupos experimentais ($p > 0,05$). Na movimentação periférica, total e vertical (*rearings*), a ANOVA de duas vias não revelou efeito significativo em nenhum dos fatores analisados (Movimentação periférica: Fator pré-tratamento = $F(1,33)=0,573$, $p=0,455$, Fator tratamento = $F(1,33)=0,101$, $p=0,753$, Fator interação = $F(1,33)=0,705$, $p=0,407$; Movimentação total: Fator pré-tratamento = $F(1,33)=0,909$, $p=0,347$, Fator tratamento = $F(1,33)=0,278$, $p=0,602$, Fator interação = $F(1,33)=0,629$, $p=0,433$; Movimentação vertical (*rearings*): Fator pré-tratamento =

$F(1,33)=4,113$, $p=0,051$, Fator tratamento = $F(1,33)=0,473$, $p=0,496$, Fator interação = $F(1,33)=0,414$, $p=0,424$).

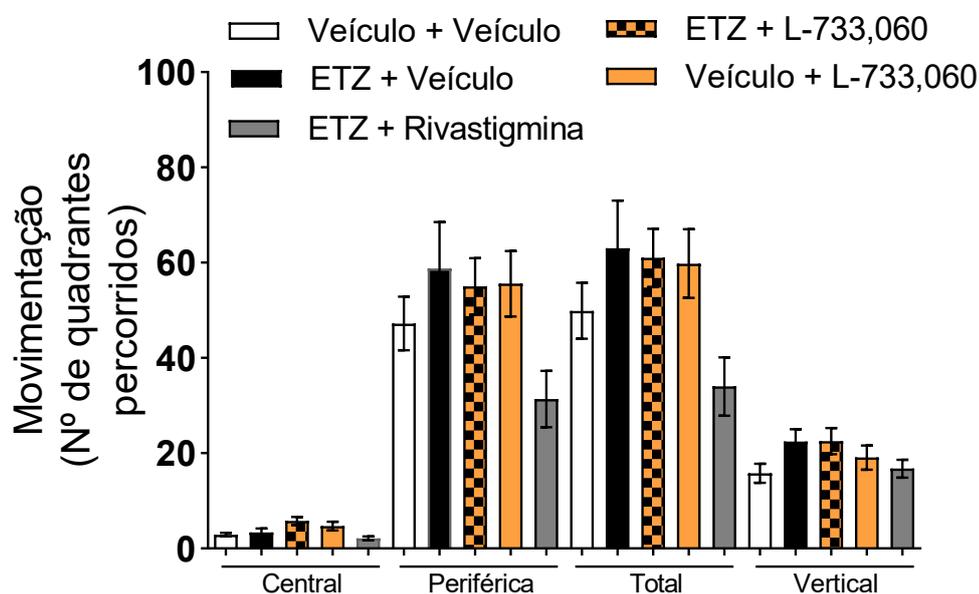


Figura 3: Efeito do tratamento dose única com o antagonista RNK_1 L-733,060 (0,1nmol) ou veículo sobre o comportamento exploratório de ratos pré-tratados com estreptozotocina (ETZ; 0,1mg) avaliados no teste do campo aberto (*open-field*). Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os E.P.M. (n=9-10/grupo).

3.2 Teste da roda giratória

A análise estatística pelo teste do Kruskal-Wallis não detectou diferença significativa entre os diferentes grupos experimentais no tempo de latência para a 1ª queda [$H37(3)=4,613$; $p=0,202$] e no número total de quedas [$H37(3)=4,601$; $p=0,203$] dos animais avaliados no teste da roda giratória (*rotarod*). Além disso, não foram observadas diferenças estatísticas entre o grupo ETZ + rivastigmina em relação ao grupo veículo + veículo (controle) e grupo ETZ + veículo [$H27(2)=2,010$; $p=0,366$] (Tabela 1).

Tabela 1: Efeito do tratamento dose única com o antagonista RNK_1 L-733,060 (0,1nmol) ou veículo sobre a atividade motora de ratos avaliados no teste da roda giratória (*rotarod*). Os resultados são expressos como mediana ± intervalo interquartil (n=9-10/grupo).

Grupos experimentais	Latência para a 1ª queda (s)	Número total de quedas
Veículo + Veículo	60,00 (60,00-60,00)	0,00 (0,00-0,00)
ETZ + Veículo	60,00 (47,50-60,00)	0,00 (0,00-0,50)
ETZ + L-733,060	60,00 (43,50-60,00)	0,00 (0,00-0,50)
Veículo + L-733,060	60,00 (60,00-60,00)	0,00 (0,00-0,00)
*ETZ + Rivastigmina	60,00 (60,00-60,00)	0,00 (0,00-0,00)

*Rivastigmina foi administrada por via oral e utilizada como grupo controle positivo, com a análise estatística sendo realizada separadamente comparando os grupos "ETZ+rivastigmina" versus "veículo+veículo" versus "ETZ+veículo".

3.3 Teste da esquiiva inibitória

A Figura 4 ilustra a latência (em segundos) para descida da plataforma de ratos avaliados durante a sessão teste da esquiiva inibitória para determinação da memória de trabalho (MT), de curta (MC) e longa duração (ML). A ANOVA de duas vias com medidas repetidas revelou um efeito significativo no Fator pré-tratamento [$F(1,33)=25,71, p<0,00001$], no Fator tratamento [$F(1,33)=4,26, p<0,05$] e no Fator interação pré-tratamento x tratamento [$F(1,33)=37,48, p<0,00001$]. O teste *post hoc* de Newman-Keuls mostrou que o pré-tratamento dose única com ETZ reduziu o tempo de latência para descida da plataforma dos ratos avaliados 5s ($p<0,0001$), 1,5h ($p<0,01$) e 24h ($p<0,01$) após o choque da sessão treino, quando comparados ao grupo controle. O tratamento em dose única com o antagonista de receptores NK₁ L-733,060, que não apresentou efeito *per se* ($p>0,05$), reverteu o efeito da ETZ na 1ª e 3ª sessão ($p<0,01$), mas não na 2ª sessão ($p=0,114$). Por sua vez, o grupo que recebeu o tratamento combinado de ETZ + rivastigmina (utilizada como controle positivo) quando comparado aos grupos veículo + veículo (controle) e ETZ + veículo, a ANOVA de uma via detectou diferença estatística entre os três grupos experimentais nas sessões de 5s [$F(2,23)=31,07, p<0,00001$], 1,5h [$F(2,23)=10,30, p<0,001$] e 24h [$F(2,23)=12,30, p<0,001$]. O teste *post hoc* de Newman-Keuls mostrou que a rivastigmina foi capaz de reverter os efeitos promovidos pela ETZ no tempo de latência para descida da plataforma dos ratos avaliados 5s ($p<0,001$), 1,5h ($p<0,01$) e 24h ($p<0,001$) após o choque da sessão treino.

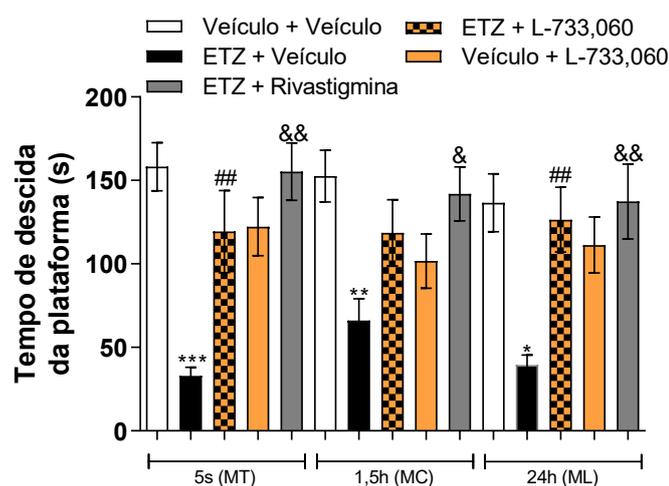
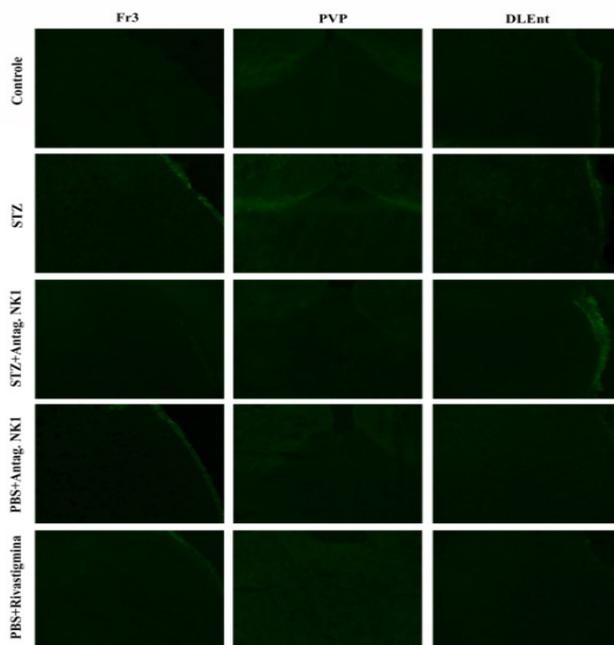


Figura 4: Efeito do tratamento dose única com o antagonista RNK₁ L-733,060 (0,1nmol) ou veículo sobre o prejuízo de memória induzido pela infusão i.c.v. de ETZ em ratos avaliados no teste de esquiiva inibitória (*step-down*). MT, MC e ML representam a memória de trabalho, de curta e de longa duração avaliadas 5s, 1,5h e 24h após o choque da sessão treino, respectivamente. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e cada barra vertical indica o E.P.M. (n=9-10/grupo). * $p<0,05$, ** $p<0,01$ e *** $p<0,001$ em relação ao grupo controle (veículo + veículo); ## $p<0,01$ em relação ao grupo ETZ + veículo; & $p<0,05$ e && $p<0,01$ em relação ao grupo ETZ + veículo.

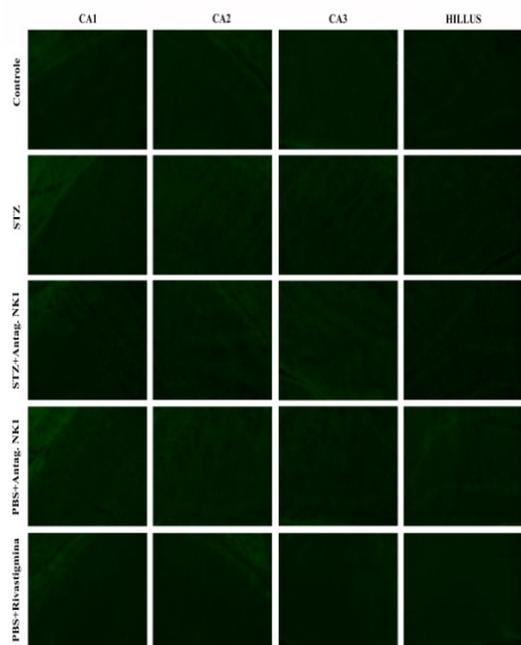
3.4 Fluoro Jade-C

A técnica de coloração com o Fluoro Jade-C (FJC) foi realizada para investigar um possível processo neurodegenerativo induzido pela infusão i.c.v. da ETZ. Após sete dias da administração de uma única dose de ETZ não foi observada marcação para FJC nas áreas do córtex frontal (Fr3), núcleo talâmico paraventricular posterior (PVP), córtex entorrinal dorsolateral (DLEnt), CA1, CA2 e CA3 do hipocampo, bem como hilo do giro denteado, não diferindo, portanto, do grupo controle (veículo). Este padrão de coloração histoquímica foi similar em relação aos demais grupos experimentais (Figura 5A e 5B). O tratamento com única dose de ETZ e eutanásia no 14º dia e o tratamento com 2 doses de ETZ e eutanásia no 7º dia foi observado marcação positiva para FJC apenas em um animal de cada grupo (Figura 5C e 5D), nos demais animais não foram observado alteração significativa.

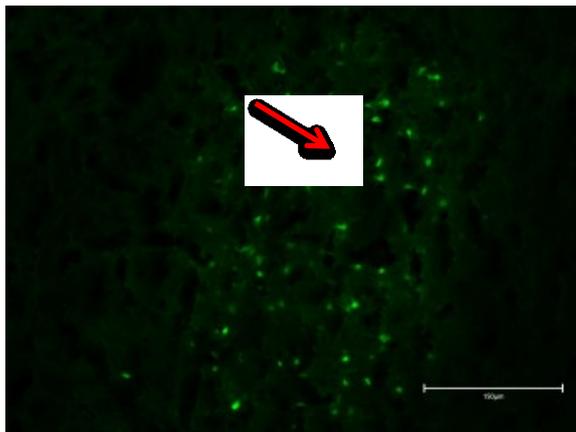
A)



B)



C)



D)

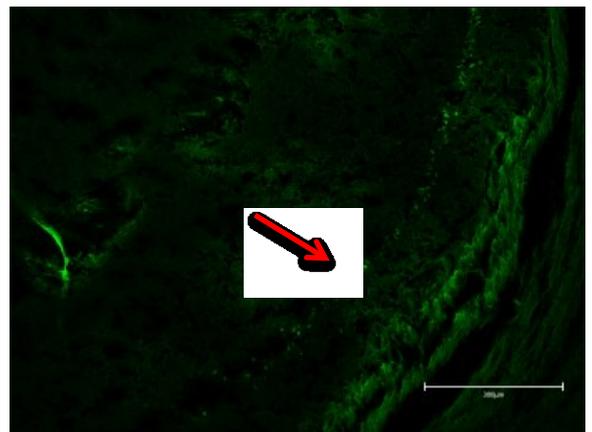


Figura 5: Fotomicrografias representativas de cortes coronais do encéfalo de ratos analisados pela técnica histoquímica do Fluoro Jade-C (FJC) 7 ou 14 dias após a administração i.c.v. de estreptozotocina (ETZ) dose única ou repetida. Efeito da administração i.c.v de ETZ em diferentes doses. Abreviaturas: Fr3 = área 3 do córtex frontal; PVP = parte posterior do núcleo talâmico paraventricular; DLEnt = córtex entorrinal dorsolateral; CA1, CA2 e CA3 = subregiões do hipocampo; Hillus = Hilo do giro denteado. A) Regiões cerebrais: Fr3, PVP, DLEnt; (B) Regiões cerebrais: CA1, CA2, CA3, Hillus; (C) Tratamento com dose única de ETZ e eutanásia no 14º dia (Região do tálamo); (D) Tratamento com duas doses de ETZ e eutanásia no 7º dia (Região CA1). (N = 5/grupo; 6 cortes cerebrais por animal). Lâminas analisadas no microscópio de fluorescência (EVOS M5000 Imaging System) e as imagens processadas e montadas no Software Adobe Photoshop (2015).

Protocolo experimental 2 – Efeito do tratamento repetido com o antagonista de RNK₁ no modelo de Doença de Alzheimer induzido por estreptozotocina (ETZ)

3.5 Teste do Campo aberto

Para os parâmetros comportamentais avaliados no teste do campo aberto, a ANOVA de duas vias não detectou diferença estatística em nenhum dos fatores (Movimentação central: Fator pré-tratamento = $F(1,35)=0,125$, $p=0,726$, Fator tratamento = $F(1,35)=1,085$, $p=0,305$, Fator interação = $F(1,35)=0,929$, $p=0,342$; Movimentação periférica: Fator pré-tratamento = $F(1,35)=0,784$, $p=0,382$, Fator tratamento = $F(1,35)=0,524$, $p=0,474$, Fator interação = $F(1,35)=1,313$, $p=0,260$; Movimentação total: Fator pré-tratamento = $F(1,35)=0,645$, $p=0,427$, Fator tratamento = $F(1,35)=0,645$, $p=0,427$, Fator interação = $F(1,35)=1,431$, $p=0,240$; Movimentação vertical (*rearings*): Fator pré-tratamento = $F(1,35)=0,667$, $p=0,420$, Fator tratamento = $F(1,35)=1,119$, $p=0,297$, Fator interação = $F(1,35)=1,322$, $p=0,258$) (Figura 6).

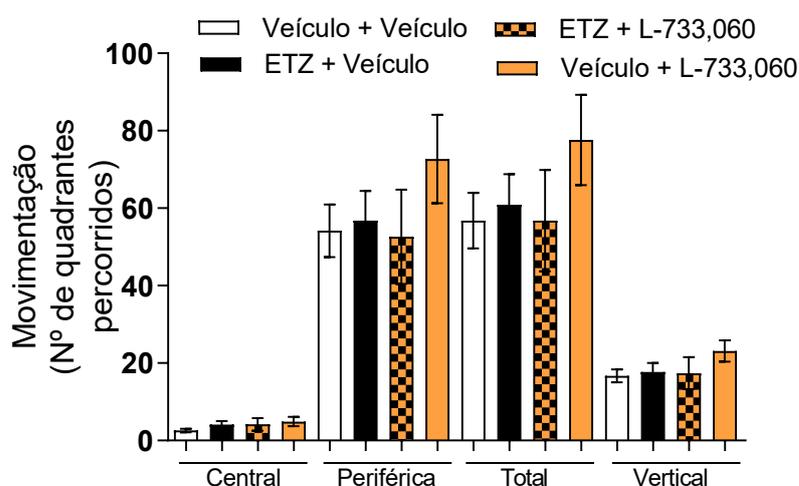


Figura 6: Efeito do tratamento repetido com o antagonista de RNK₁ L-733,060 (0,1nmol) ou veículo sobre o comportamento exploratório de ratos pré-tratados com estreptozotocina (ETZ; 0,2mg) avaliados no teste do campo aberto (*open-field*). Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e cada barra vertical indica o E.P.M. (n=9-10/grupo).

3.6 Teste da roda giratória

O teste de Kruskal-Wallis não detectou diferença estatística entre os diferentes grupos experimentais no tempo de latência para a 1ª queda [$H_{39}(3)=4,270$; $p=0,234$] e no número total de quedas [$H_{39}(3)=4,318$; $p=0,229$] dos animais avaliados no teste da roda giratória (*rotarod*) (Tabela 2).

Tabela 2: Efeito do tratamento repetido com o antagonista de RNK_1 L-733,060 (0,1nmol) ou veículo sobre a atividade motora de ratos pré-tratados com estreptozotocina (ETZ; 0,2mg) avaliados no teste da roda giratória (*rotarod*). Os resultados são expressos como mediana \pm intervalo interquartil (n=9-10/grupo).

Grupos experimentais	Latência para a 1ª queda (s)	Número total de quedas
Veículo + Veículo	60,00 (60,00-60,00)	0,00 (0,00-0,00)
ETZ + Veículo	60,00 (37,25-60,00)	0,00 (0,00-0,00)
ETZ + L-733,060	60,00 (55,50-60,00)	0,00 (0,00-0,00)
Veículo + L-733,060	60,00 (60,00-60,00)	0,00 (0,00-0,00)

3.7 Teste de reconhecimento de objetos

No teste de reconhecimento de objetos, a ANOVA de duas vias com medidas repetidas revelou um efeito significativo no Fator pré-tratamento [$F(1,40)=19,500$, $p<0,0001$], no Fator tratamento [$F(1,40)=13,319$, $p<0,001$] e no Fator interação pré-tratamento x tratamento [$F(1,40)=8,154$, $p<0,01$]. O teste *post hoc* de Newman-Keuls mostrou que o pré-tratamento dose dupla com ETZ foi capaz de reduzir em relação ao grupo controle a % do índice de discriminação dos ratos quando avaliados 1,5h ($p<0,01$) e 24h ($p<0,001$) após a sessão treino. O tratamento repetido com o antagonista de receptores NK_1 L-733,060, que não modificou a % do índice de discriminação dos ratos em relação ao grupo controle ($p>0,05$), reverteu totalmente os efeitos induzidos pela ETZ em ratos avaliados 1,5h e 24h (ambos $p<0,001$) após a sessão treino (Figura 7A).

Os resultados também mostraram que na sessão de familiarização (treino) os animais não apresentaram preferência entre os objetos idênticos A_1 e A_2 , conforme pode ser visto na Figura 7B para os grupos Veículo + Veículo ($t(9)=0,233$; $p=0,821$), ETZ + Veículo ($t(9)=0,392$; $p=0,704$), ETZ + L-733,060 ($t(13)=1,216$; $p=0,246$) e Veículo + L-733,060 ($t(9)=0,577$; $p=0,578$). Os animais do grupo controle apresentaram maior tempo de exploração do objeto B em relação ao objeto A_1 ($t(9)=4,561$, $p<0,001$) na sessão de 1,5h ($A_1=8,200 \pm 1,562s$; $B=16,500 \pm 1,996s$), bem como maior tempo de exploração do objeto C em relação ao objeto A_1 ($t(9)=5,255$, $p<0,001$) na sessão de 24h ($A_1=8,000 \pm 1,874s$; $C=17,000 \pm 2,813s$). O mesmo perfil foi observado para o grupo tratado com o antagonista de RNK_1 ,

não ocorrendo diferença significativa em relação ao grupo controle (veículo). Para o grupo tratado com ETZ, não houve diferença significativa entre o tempo de exploração dos objetos A₁ e B ($t(9)=0,392, p=0,704$) na sessão de 1,5h ($A_1= 14,100 \pm 2,447s$; $B= 15,100 \pm 1,602s$), e entre os objetos A₁ e C ($t(9)=0,533, p=0,607$) na sessão de 24h ($A_1= 11,400 \pm 2,372s$; $C= 12,300 \pm 3,439s$). Contudo, no grupo tratado com ETZ + L-733,060 houve diferença significativa entre o tempo de exploração do objeto B em relação ao A₁ ($t(9)=6,009, p<0,001$) na sessão de 1,5h ($A_1= 5,900 \pm 1,251s$; $B= 14,100 \pm 2,002s$), assim como entre o objeto C em relação ao A₁ ($t(9)=4,479, p<0,001$) na sessão de 24h ($A_1= 5,600 \pm 1,035s$; $C= 15,000 \pm 2,633s$).

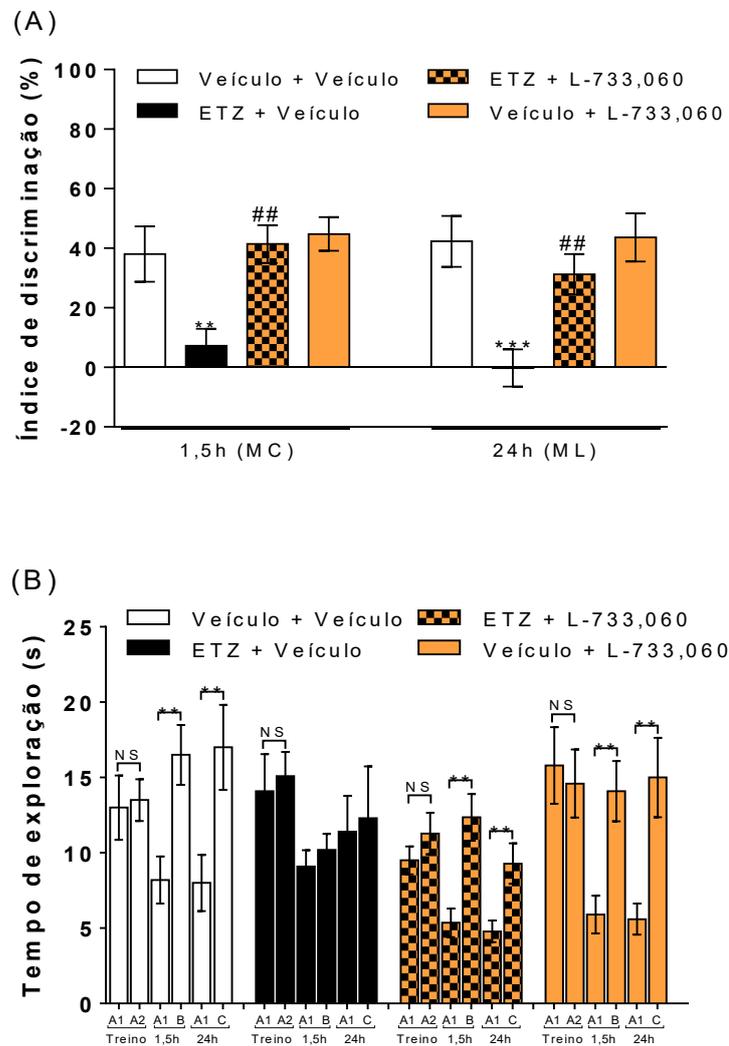


Figura 7: Efeito do tratamento repetido com o antagonista de RNK₁ L-733,060 (0,1nmol) sobre o índice de discriminação de objetos (A) e tempo total de exploração dos objetos (B) de ratos pré-tratados com estreptozotocina (ETZ; 0,2mg) avaliados no teste de reconhecimento de objetos. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e cada barra vertical indica o E.P.M. A1 e A2 = tempo de exploração do objeto A1 e A2, respectivamente; B= tempo de exploração do objeto B; C= tempo de exploração do objeto C; NS = não significativo; ** $p<0,01$ e *** $p<0,001$ em relação ao

grupo controle (Veículo + Veículo) ou em relação aos objetos B ou C, $##p<0,01$ em relação ao grupo ETZ + Veículo.

3.8 Teste da esQUIVA inibitória

A Figura 8 ilustra a latência (em segundos) para descida da plataforma em ratos avaliados durante a sessão teste da esQUIVA inibitória para determinação da memória de trabalho (MT), de curta (MC) e longa duração (ML). A ANOVA de duas vias com medidas repetidas revelou um efeito significativo no Fator pré-tratamento [$F(1,33)=6,33, p<0,01$] e no Fator interação pré-tratamento x tratamento [$F(1,33)=28,41, p<0,0001$]. O teste *post hoc* de Newman-Keuls mostrou que o pré-tratamento i.c.v. com duas doses de ETZ foi capaz de reduzir o tempo de latência para descida da plataforma dos ratos avaliados 5s ($p<0,001$), 1,5h ($p<0,001$) e 24h ($p<0,001$) após o choque da sessão treino, quando comparados ao grupo controle. O tratamento repetido i.c.v. com o antagonista de receptores NK₁ L-733,060, que não apresentou efeito *per se* ($p>0,05$), reverteu totalmente o efeito da ETZ nas três sessões analisadas ($p<0,01$).

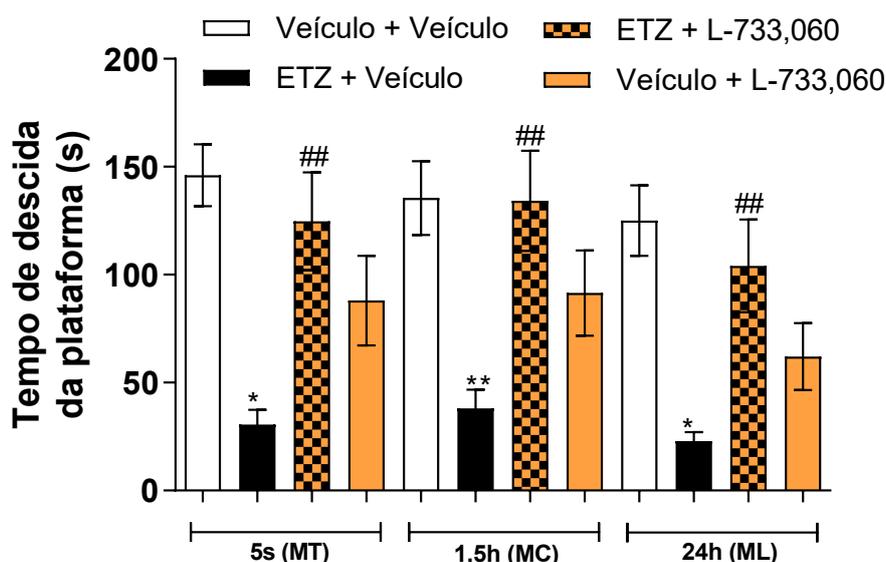


Figura 8: Efeito do tratamento repetido com o antagonista de RNK₁ L-733,060 (0,1nmol) sobre o prejuízo de memória induzido pela estreptozotocina (ETZ) em ratos avaliados no teste da esQUIVA inibitória (*step-down*). MT, MC e ML representam a memória de trabalho, de curta e de longa duração avaliadas 5s, 1,5h e 24h após o choque da sessão treino, respectivamente. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os E.P.M. * $p<0,05$ e ** $p<0,01$ em relação ao grupo controle (Veículo + Veículo); $##p<0,01$ em relação ao grupo ETZ + Veículo.

3.9 Conteúdo de glutathiona (GSH) reduzida

Os níveis de GSH quantificados no hipocampo e córtex estão representados na Figura 8. No hipocampo, a ANOVA de duas vias não revelou diferença estatística no Fator pré-tratamento [$F(1,16)=1,347, p=0,255$] e no Fator interação [$F(1,16)=0,013, p=0,909$], no

entanto houve diferença no Fator tratamento [$F(1,16)=8,462, p<0,01$]. O teste *post hoc* de Newman-Keuls mostrou que a administração repetida do antagonista de RNK_1 L-733,060 em animais pré-tratados com ETZ aumentou os níveis da GSH em relação ao grupo controle ($p<0,05$) (Figura 9A). No córtex cerebral, a ANOVA de duas vias não detectou diferença estatística no Fator pré-tratamento [$F(1,29)=1,570, p=0,220$] e Fator interação [$F(1,29)=0,001, p=0,977$], entretanto revelou diferença no Fator tratamento [$F(1,29)=8,017, p<0,01$]. O teste *post hoc* de Newman-Keuls mostrou que a administração repetida do antagonista de RNK_1 L-733,060 em animais pré-tratados com ETZ aumentou os níveis da GSH quando comparados ao grupo controle ($p<0,05$; Figura 9B).

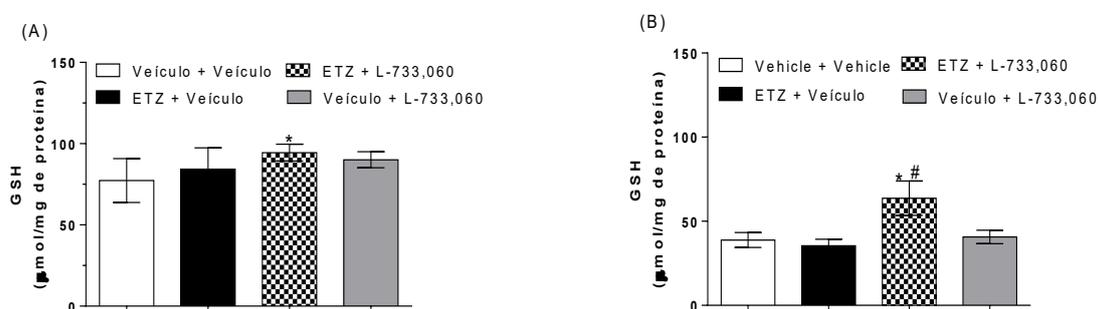


Figura 9: Efeito do tratamento repetido com o antagonista de RNK_1 L-733,060 (0,1nmol) no conteúdo de GSH do hipocampo (A) e córtex cerebral (B) de ratos pré-tratados com estreptozotocina (ETZ; 0,2mg). Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e cada barra vertical indica o E.P.M. * $p<0,05$ em relação ao grupo veículo + veículo (controle); # $p<0,05$ em relação ao grupo ETZ + veículo.

3.10 Conteúdo de nitrito/nitrato (NOx)

Os níveis de nitrito/nitrato (NOx) no hipocampo e córtex cerebral estão representados nas Figuras 10A e 10B, respectivamente. No hipocampo, a ANOVA de duas vias não detectou diferença estatística para o Fator pré-tratamento [$F(1,16)=0,570, p>0,05$], Fator tratamento [$F(1,16)=0,178, p>0,05$] e Fator interação pré-tratamento x tratamento [$F(1,16)=0,553, p>0,05$] (Figura 10A). Já no córtex cerebral, a ANOVA de duas vias revelou diferença estatística apenas para o Fator pré-tratamento [$F(1,16)=9,367; p<0,01$], com o teste *post-hoc* de Newman-keuls indicando que a ETZ foi capaz de aumentar os níveis de NOx em relação ao grupo controle ($p\leq 0,05$) (Figura 10B).

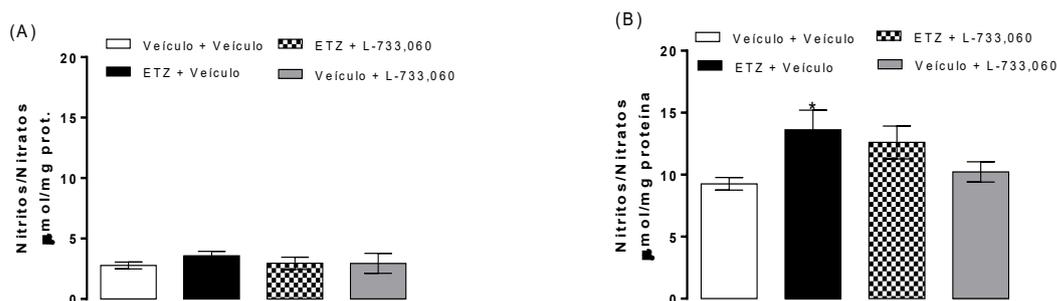


Figura 10: Efeito do tratamento repetido com o antagonista de RNK₁ L-733,060 (0,1nmol) ou veículo nos níveis de nitrito/nitrato (NOx) no hipocampo (A) e córtex cerebral (B) de ratos pré-tratados com estreptozotocina (ETZ; 0,2mg). Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e cada barra vertical indica o E.P.M. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (Veículo + Veículo).

3.11 Atividade da enzima catalase (CAT)

No hipocampo, a ANOVA de duas vias detectou diferença estatística para o Fator pré-tratamento [$F(1,16)=16,643$, $p < 0,001$], tratamento [$F(1,16)=2,461$, $p < 0,01$] e interação [$F(1,16)=5,327$, $p < 0,05$] (Figura 11A). O teste de Newman-keuls indicou que a ETZ foi capaz de reduzir significativamente a atividade da CAT no hipocampo em relação ao grupo controle ($p < 0,001$), enquanto o tratamento repetido com L-733,060, que não modificou *per se* a atividade da CAT, reverteu o efeito promovido pela ETZ ($p < 0,001$). No córtex cerebral, a ANOVA de duas vias detectou diferença estatística para o Fator pré-tratamento [$F(1,19)=7,261$, $p < 0,05$] e Fator tratamento [$F(1,19)=6,664$, $p < 0,01$], sem revelar diferença entre estes dois fatores [$F(1,19)=1,125$, $p = 0,302$] (Figura 11B). O teste de Newman-keuls indicou que a ETZ reduziu a atividade da CAT no córtex, não havendo diferença em relação ao grupo controle para o tratamento com o antagonista NK₁ L-733,060 isoladamente ou em combinação com ETZ ($p > 0,05$).

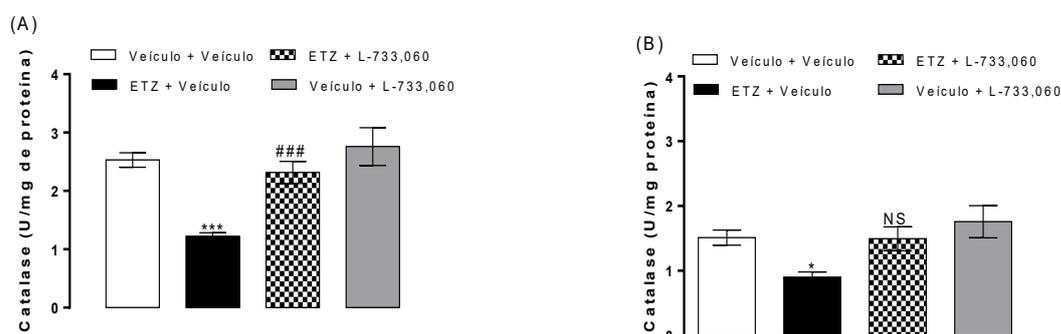


Figura 11: Efeito do tratamento repetido com o antagonista de RNK₁ L-733,060 (0,1nmol) ou veículo na atividade da enzima catalase (CAT) do hipocampo (A) e córtex cerebral (B) de ratos pré-tratados com estreptozotocina (ETZ; 0,2mg). Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e cada barra vertical indica o E.P.M. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ em relação ao grupo controle (Veículo + Veículo); ### $p < 0,001$ em relação ao grupo ETZ + Veículo. NS = não significativo em relação ao grupo controle.

3.12 Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD)

No hipocampo, a ANOVA de duas vias revelou diferença estatística para o Fator pré-tratamento [$F(1,18)=21,910$, $p<0,001$] e Fator tratamento [$F(1,18)=5,493$, $p<0,05$], mas sem interação entre esses dois fatores [$F(1,18)=2,485$, $p=0,132$] (Figura 12A). O teste *post-hoc* de Newman-Keuls indicou que a ETZ aumentou significativamente a atividade da SOD no hipocampo quando comparado ao grupo controle ($p<0,001$), e o tratamento com o antagonista NK_1 L733,060 aboliu o efeito da neurotoxina sobre a SOD quando comparado ao grupo que recebeu apenas ETZ ($p<0,05$). No córtex cerebral, a ANOVA de duas vias detectou diferença estatística para o Fator tratamento [$F(1,16)=9,809$, $p<0,01$] e Fator interação pré-tratamento x tratamento [$F(1,16)=23,930$, $p<0,001$]. Embora a ANOVA de duas vias não tenha revelado diferença estatística para o Fator pré-tratamento [$F(1,16)=2,225$, $p=0,155$], o teste *post hoc* de Newman-Keuls indicou uma tendência da ETZ em reduzir a atividade da SOD em relação ao grupo controle ($p=0,069$). Já o tratamento com L-733,060, que não apresentou efeito *per se*, quando associado à ETZ aumentou significativamente a atividade da SOD no córtex cerebral quando comparado a todos os demais grupos experimentais ($p<0,01$) (Figura 12B).

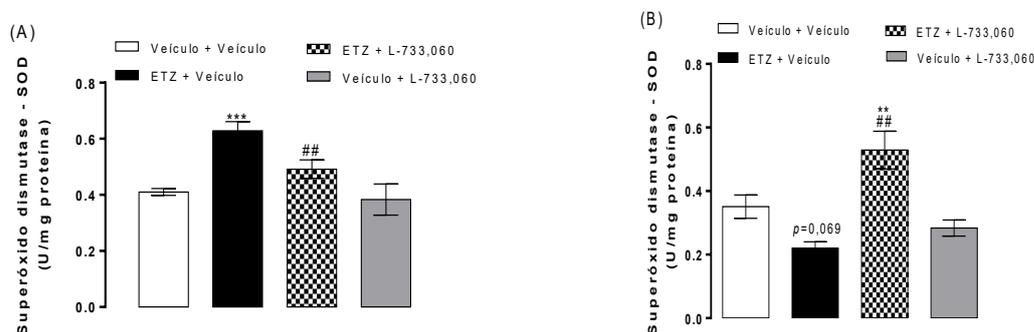


Figura 12: Efeito do tratamento repetido com o antagonista de RNK_1 L-733,060 (0,1nmol) ou veículo na atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) do hipocampo (A) e córtex cerebral (B) de ratos pré-tratados com estreptozotocina (ETZ; 0,2mg). Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e cada barra vertical indica o E.P.M. ** $p<0,01$ e *** $p<0,001$ em relação ao grupo controle (Veículo + Veículo); ## $p<0,01$ em relação ao grupo ETZ + Veículo.

3.13 Níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

No hipocampo, a ANOVA de duas vias revelou diferença estatística para o Fator pré-tratamento [$F(1,30)=34,012$, $p<0,00001$], Fator tratamento [$F(1,30)=51,840$, $p<0,00001$] e no Fator interação [$F(1,30)=68,013$, $p<0,00001$] (Figura 13A). O nível de peroxidação lipídica no hipocampo aumentou significativamente no grupo ETZ ($p<0,001$), enquanto o tratamento com o antagonista de RNK_1 L-733,060 reverteu totalmente o efeito induzido pela ETZ ($p<0,001$) (Figura 12A). No córtex cerebral, a ANOVA de duas vias revelou diferença estatística para o Fator pré-tratamento [$F(1,18)=17,155$, $p<0,001$], Fator tratamento

[F(1,18)=13,556, $p<0,01$] e no Fator interação [F(1,18)=13,529, $p<0,01$] (Figura 12B). O nível de peroxidação lipídica no córtex cerebral aumentou significativamente no grupo ETZ ($p<0,001$), enquanto o tratamento com o antagonista de RNK1 L-733,060 reverteu totalmente o efeito induzido pela ETZ ($p<0,001$) (Figura 13B).

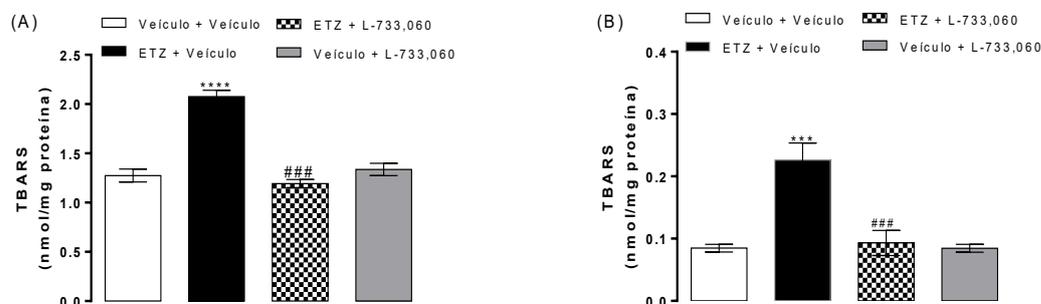


Figura 13: Efeito do tratamento repetido com o antagonista de RNK₁ L-733,060 (0,1nmol) ou veículo nos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) do hipocampo (A) e córtex cerebral (B) de ratos pré-tratados com estreptozotocina (ETZ; 0,2mg). Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e cada barra vertical indica o E.P.M. **** $p<0,001$ e ***** $p<0,0001$ em relação ao grupo controle (Veículo + Veículo); ### $p<0,001$ em relação ao grupo ETZ + Veículo.

3.14 Ensaios de *Western Blot* (WB)

O WB foi conduzido para mensuração dos níveis das proteínas caspase-1, caspase-3, BAX, IL-1 β e PAR-4 no hipocampo de ratos. Em relação à caspase-1, a ANOVA de duas vias não revelou diferença estatística para o Fator pré-tratamento [F(1,12)=0,0120, $p=0,91453$], Fator tratamento [F(1,12)=0,0030, $p=0,95740$] e Fator interação [F(1,12)=0,4288, $p=0,52490$] (Figura 14A). Para a caspase-3, a ANOVA de duas vias revelou diferença estatística para o Fator pré-tratamento [F(1,20)=8,833, $p<0,01$] e uma tendência para o Fator tratamento [F(1,20)=3,033, $p=0,09$], sem revelar diferença no Fator interação [F(1,20)=2,942, $p=0,1035$]. O nível da caspase-3 aumentou significativamente no grupo ETZ + L-733,060 quando comparado ao grupo controle (Veículo + Veículo; $p<0,05$), grupo ETZ + Veículo ($p<0,05$) e grupo Veículo + L-733,060 ($p<0,01$) (Figura 14B). Para a BAX, a ANOVA de duas vias revelou diferença estatística para o Fator tratamento [F(1,11)=9,620, $p<0,01$], sem revelar diferença no Fator pré-tratamento [F(1,11)=0,4192, $p=0,5306$] e Fator interação [F(1,11)=1,556, $p=0,2381$]. O antagonista dos RNK₁ L-733,060 reduziu significativamente o nível da BAX em relação aos grupos controle (Veículo + Veículo) e ETZ + L-733,060 (ambos $p<0,05$) (Figura 14C). Para o imunoconteúdo de IL-1 β , a ANOVA de duas vias não revelou diferença estatística para o Fator pré-tratamento [F(1,12)=0,2890, $p=0,6007$] e Fator interação [F(1,12)=0,0949, $p=0,7634$]. Embora a ANOVA tenha revelado diferença estatística para o Fator tratamento [F(1,12)=6,5601, $p=0,024943$], o teste *post-hoc* de Newman-keuls não confirmou qualquer diferença entre os grupos experimentais ($p>0,05$; Figura 14D). Para o

imunocontéudo da PAR-4, a ANOVA de duas vias não revelou qualquer diferença estatística para os fatores pré-tratamento [$F(1,12)=0,1008$, $p=0,7563$], tratamento [$F(1,12)=0,0069$, $p=0,9351$] e interação [$F(1,12)=0,3243$, $p=0,5796$].

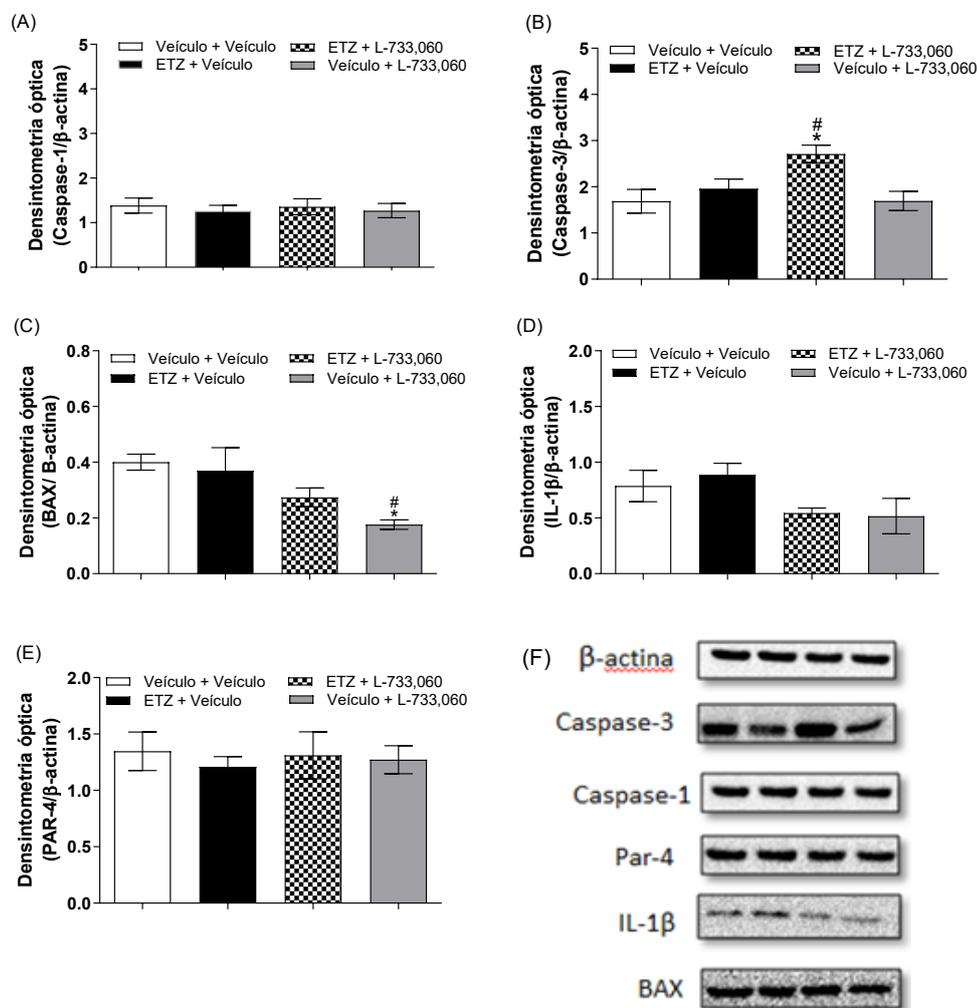


Figura 14: Densitometria da expressão das proteínas caspase-1 (A), caspase-3 (B), BAX (C), IL-1 β (D) e PAR-4 (E) em homogenato de hipocampo de ratos. (F) Imagem representativa das bandas (blots) da β -actina e de cada proteína analisada. Os imunocontéudos foram determinados pela razão entre a densidade óptica (D.O.) da banda das respectivas proteínas e a D.O. da banda da β -actina (utilizada como controle de carregamento). Os dados estão representados pela média \pm E.P.M. da D.O. dos blots de cada proteína avaliada em amostras obtidas a partir de um “pool” de três animais de cada grupo experimental, com dois experimentos independentes. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (Veículo + Veículo); # $p < 0,05$ em relação ao grupo ETZ + Veículo.

4 DISCUSSÃO

No presente trabalho investigamos as alterações comportamentais (cognitivas) e bioquímicas (através da análise de marcadores de estresse oxidativo, neuroinflamação, apoptose neuronal e neurodegeneração) em um modelo animal de DA esporádica induzida pela administração i.c.v. da neurotoxina ETZ. Em seguida, analisamos a possível participação

dos RNK₁ para SP, através do tratamento i.c.v. agudo ou repetido com o antagonista seletivo dos RNK₁ L-733,060, nas alterações ocasionadas pela ETZ. Inicialmente, para se certificar que os ratos não possuíam alterações na atividade exploratória e locomotora após as injeções i.c.v. de ETZ, foram realizados os testes do campo aberto (*open-field*) e da roda giratória (*rotarod*) cinco dias após as infusões centrais da neurotoxina. Nossos resultados mostraram que o pré-tratamento com ETZ (dose única ou dupla) não interferiu na atividade exploratória e locomotora dos animais avaliados nos testes do campo aberto e da roda giratória, respectivamente, descartando assim, eventuais prejuízos na função motora que pudessem influenciar os resultados obtidos nos testes específicos de avaliação cognitiva. O teste da esQUIVA inibitória (TEI) foi realizado para avaliar o comportamento cognitivo (mnemônico). Nesse teste, observamos que o tratamento i.c.v. com ETZ em dose única prejudicou a memória de trabalho, de curta e de longa duração dos animais, sugerindo um déficit cognitivo induzido pela neurotoxina. De acordo com Mehla *et al.* (2013), a ETZ em dose única (1mg/kg) ou dupla (3mg/kg) também induziu comprometimento cognitivo quando os animais foram avaliados no teste do labirinto em cruz elevado e no labirinto aquático de Morris, e esse comprometimento foi sustentado até o 10º dia (1mg/kg em dose única ou dupla) ou 14º dia (3mg/kg em dose única ou dupla). Em nosso estudo, a dose de ETZ utilizada corresponde à 0,3mg/Kg, ou seja, de 3 a 10 vez menor do que aquela empregada por Mehla e colaboradores (2013), e ainda assim, foi possível observar um declínio do aprendizado e memória dos animais. Nossos resultados também mostraram que o tratamento com o antagonista de RNK₁ reverteu o prejuízo induzido pela ETZ sobre a memória de trabalho, de curta e de longa duração, uma vez que o L-733,060 aumentou o tempo de latência de descida da plataforma dos animais quando avaliados 5s, 1,5h e 24h após o choque, no TEI. Esses resultados sugerem um efeito protetor para o L-733,060 contra o declínio cognitivo induzido pela ETZ. Podemos sugerir que para o prejuízo mnemônico ocasionado pela neurotoxina possa envolver a mobilização de um ligante endógeno, possivelmente a SP, o agonista natural preferencial dos RNK₁. Além disso, podemos sugerir que a SP e os RNK₁ locais, a partir de regiões cerebrais circumventriculares, estão envolvidos nas ações deletérias da ETZ sobre os mecanismos de aquisição, consolidação e evocação da memória. Para investigar se o prejuízo mnemônico induzido pela dose única de ETZ envolve uma possível neurodegeneração, utilizamos o método histoquímico de marcação fluorescente com FJC. Em todos os grupos experimentais não observamos marcações positivas para FJC nas regiões de Fr3, PVP, DLEnt, CA₁, CA₂ e CA₃ do hipocampo, bem como hilo do giro denteado, sugerindo que as alterações comportamentais induzidas pela ETZ são independentes de mecanismos envolvendo morte

neuronal. Majkutewicz *et al.* (2016) observaram neurodegeneração hipocampal 21 dias após a infusão da ETZ 3mg/Kg. Como mencionado anteriormente, nossos dados diferem tanto em termos de nível da dose empregada (em nosso estudo correspondendo a 0,35mg/Kg) quanto do dia da realização da eutanásia (7º dia) em relação ao trabalho de Majkutewicz e cols, fatores que tornam o modelo experimental aqui empregado diferente daquele descrito na literatura envolvendo neurodegeneração. Assim, hipotetizamos em nosso estudo que a interferência mnemônica ocasionada pela administração central de ETZ possa estar relacionada a outros mecanismos distintos, como alterações do sistema redox, do padrão de expressão de proteínas e/ou neurotransmissores, não envolvendo necessariamente um processo neurodegenerativo.

Assim, adotamos um novo esquema de doses e eutanásia em momentos diferentes, com o objetivo de melhor caracterizar o efeito da ETZ sobre a neurodegeneração. Os resultados mostraram, em ambos os grupos experimentais, morte neuronal em apenas 1 animal, representando 20% do total, sugerindo, portanto, que estamos trabalhando com uma dose limítrofe (sublimiar) para o início da neurodegeneração, o que representaria a fase inicial da DA, condição em que já é possível observar um certo grau de declínio cognitivo (déficit leve), entretanto não vindo acompanhado de mecanismos neurodegenerativos. No protocolo experimental 2, o teste do campo aberto foi utilizado para avaliar a atividade exploratória/locomotora dos animais. No modelo animal de DA induzido pela administração central de ETZ, nossos dados mostraram que não houve diferenças significativas em nenhum dos grupos experimentais quando os principais parâmetros comportamentais como movimentação central, periférica, total e vertical (rearing) foram avaliados, sugerindo ausência de prejuízo no comportamento exploratório e locomotor dos animais. Esse resultado foi reforçado pelo emprego do teste da roda giratória, um dos testes mais sensíveis para avaliação do comprometimento motor. Nesse teste, não foi observado diferenças significativas no tempo de latência para a 1ª queda, bem como no número de quedas dos animais, excluindo, portanto, um possível comprometimento motor dos animais que pudesse interferir na análise dos testes cognitivos. Para a avaliação cognitiva foram utilizados dois testes comportamentais: reconhecimento de objeto (RO) e esquiva inibitória. No teste de RO, o pré-tratamento com a ETZ reduziu o índice de discriminação (ID) em comparação ao grupo controle, sugerindo um déficit cognitivo. O trabalho de Sorrial e El Sayed (2017) mostra resultados semelhantes, onde camundongos injetados com ETZ-icv apresentaram prejuízo de memória nos testes do labirinto espacial em Y e RO. O emprego de injeções intracerebroventriculares de ETZ vem sendo amplamente utilizado como modelo animal de

DA não transgênico (Grieb, 2016). A ETZ quando administrada no ventrículo lateral produz resistência insulínica local (Salkovic-Petrisic e Hoyer *et al.*, 2007), similar àquela observada no cérebro de pacientes com DA através de estudos de neuroimagem. Nossos resultados ainda mostraram que o tratamento repetido com o antagonista de RNK₁ L-733,060 recuperou o ID e o tempo de exploração do objeto B e C em animais previamente tratados com a ETZ, sugerindo que o tratamento com L-733,060 reverte o déficit de memória de curta e de longa duração promovido pela neurotoxina. No teste da esQUIVA INIBITÓRIA, a ETZ reduziu o tempo de latência de descida da plataforma nas três sessões avaliadas, mostrando um prejuízo induzido pela neurotoxina nos mecanismos envolvidos na consolidação e evocação da memória. O tratamento repetido com o antagonista NK₁ recuperou o tempo de latência de descida da plataforma nos animais pré-tratados com a ETZ e avaliados 5s, 1,5h e 24h após a sessão treino, que pode ser interpretado como uma ação protetora do antagonista de RNK₁ contra o prejuízo induzido pela neurotoxina sobre a memória de trabalho, curta e longa duração. Até o presente momento, não há outros estudos trazendo evidências do possível envolvimento dos RNK₁ nas alterações mnemônicas em modelos animais de DA induzido pela ETZ. No entanto, estudos prévios revelaram um efeito protetor do antagonista do RNK₁ (NAT, N-acetil-L-triptofano; 2.5 mg/Kg) contra o prejuízo cognitivo induzido por traumatismo craniano (TC) em ratos Sprague-Dawley avaliados no teste do labirinto aquático de Morris e no teste de reconhecimento de objetos (DonKin *et al.*, 2011), assim como o tratamento com o L-733,060 (10mg/Kg, i.p, durante 16 dias) , no teste do labirinto aquático de Morris, aliviou o déficit de memória espacial induzida por TC em camundongos C57BL/6J (Li *et al.*, 2019). Em nosso trabalho, utilizamos dois testes comportamentais que permitem avaliar tipos distintos de memórias. Enquanto a esQUIVA INIBITÓRIA permite avaliar um tipo particular de memória aversiva ao contexto, em função do estresse ao animal proporcionado pelo choque nas patas durante a sessão treino, o teste do RO avalia a memória operacional e de reconhecimento. O estresse também pode interferir na velocidade e em outras características na consolidação da memória (Tse *et al.*, 2007; Van Kesteren, 2010; Pedraza *et al.*, 2016; Haubrich *et al.*, 2016). Memórias emocionais negativas, por exemplo, podem recrutar circuitos neuronais em regiões diferentes daquelas memórias neutras ou positivas, e a resposta comportamental decorrente do aprendizado seria diferente (Rozeske *et al.*, 2015). Revisões analisaram o efeito do estresse no aprendizado e na memória (Kim e Diamond, 2002; Joels *et al.*, 2006; Sandi e Pinelo-Nava, 2007). No geral, o estresse tem mostrado facilitar a memória para eventos emocionalmente estimulantes, mas prejudica a memória para eventos neutros (Payne *et al.*, 2007). Outros trabalhos mostram a relação do estresse e a fase

da aprendizagem, com o estresse quando aplicado antes da aquisição da aprendizagem não promovendo efeito (Li *et al.*, 2008) ou facilitando a formação subsequente da memória (Shors, Weiss e Thompson, 1992), enquanto o estresse sendo aplicado durante a recuperação resultando em déficit de memória (De Quervain *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2008).

Evidências atuais indicam o envolvimento do estresse oxidativo na patogênese da DA. O estresse oxidativo e os radicais livres promovem déficit de memória e, portanto, comprometem o comportamento de pacientes com DA (Gibson e Huang Butterfield, 2005; Sultana e Butterfield, 2010). Memórias requerem o recrutamento de diversas regiões cerebrais com características diferentes. A consolidação da memória é complexa e envolve a transferência gradual de informações entre o hipocampo (HPC), córtex cerebral (CC) e amígdala após sua aquisição e armazenamento (Wang *et al.*, 2006; Tse *et al.*, 2007). No presente estudo investigamos o possível envolvimento do estresse oxidativo nos efeitos da ETZ no córtex e hipocampo, duas regiões cerebrais amplamente envolvidas nos processos de aprendizado e memória. Além disso, avaliamos se os RNK₁ estão envolvidos nas ações da neurotoxina, através do uso do antagonista potente e seletivo de RNK₁ L-733,060. Para estimar o estresse oxidativo induzido pela ETZ, uma grande parte dos estudos utiliza como medida os níveis de malondialdeído (MDA), um produto da peroxidação lipídica que serve como indicador da geração de radicais livres, além dos níveis de glutathiona (GSH), um antioxidante endógeno envolvido na desintoxicação celular dos radicais livres contra o estresse oxidativo (Salkovic-Petrisic e Hoyer, 2007). Diante da lipoperoxidação existe uma perda da seletividade na troca iônica e liberação de enzimas lisossomais hidrolíticas, com consequente formação de produtos citotóxicos, entre eles o MDA, culminando na morte celular (Ferreira *et al.*, 1997). A geração de radicais livres é uma das principais causas de neurotoxicidade induzida por ETZ, e vem sendo associada à neuroinflamação, presente há mais de 1 semana após a administração da ETZ-icv (Salkovic-Petrisic e Hoyer, 2007). Outros trabalhos mostram a presença da neuroinflamação 1h após uma única dose de 1,5mg/Kg de ETZ-icv (Knezovic *et al.*, 2017). A neuroinflamação frequentemente vem acompanhada pelo processo de estresse oxidativo, mas alguns estudos mostram que esses dois eventos podem ocorrer de forma independente, embora trabalhem em conjunto para o desenvolvimento da DA (Knezovic *et al.*, 2017). Rajasekar *et al.* (2014) mostraram citotoxicidade dose-dependente induzida pela ETZ em astrócitos durante o período de incubação de 24h e também a indução de liberação de NO (óxido nítrico), bem como a geração dose-dependente de EROS, o aumento da formação de MDA e redução dos níveis de glutathiona. O nosso trabalho mostrou um aumento significativo dos níveis de TBARS no grupo ETZ-icv na região do

hipocampo e do córtex cerebral, sugerindo um aumento na formação de radicais livres e danos aos lipídeos de membranas neuronais induzidos pela neurotoxina nas estruturas cerebrais estudadas. Em contrapartida, a peroxidação lipídica induzida pela infusão central de ETZ foi completamente abolida pelo tratamento repetido com o antagonista de RNK_1 L733,060, sugerindo o recrutamento de um ligante endógeno (possivelmente a SP) pela neurotoxina, compatível com uma atividade antioxidante e protetora contra as ações lesivas no SNC ocasionadas pela neurotoxina. Li e colaboradores (2019), avaliando os efeitos da SP no estresse oxidativo em um modelo animal de TCE, mostraram que o L-733,060 também reduziu os níveis de MDA induzido por TCE (Li *et al.*, 2019). Outros estudos também revelaram aumento significativo nos níveis de MDA no cérebro de ratos tratados com ETZ-icv (Sharma e Gupta, 2001; Sharma e Gupta, 2002; Ishrat *et al.*, 2006; Pathan *et al.*, 2006; Naik *et al.*, 2017). Uma tendência progressiva ao estresse oxidativo foi observada 1, 7 e 21 dias após a administração da ETZ-icv (duas injeções de 3mg/kg) em ratos com 4 meses de idade (Sharma e Gupta, 2001). Por outro lado, esses mesmos trabalhos mostraram uma redução dos níveis de glutatona no cérebro de ratos tratados com ETZ-icv (Sharma e Gupta, 2001; Sharma e Gupta, 2002; Ishrat *et al.*, 2006; Pathan *et al.*, 2006; Naik *et al.*, 2017).

A glutatona (GSH) é um tripeptídeo rico em resíduos de cisteína responsável pela manutenção dos grupamentos sulfidrilas (tióis) provenientes das proteínas, e representa uma das principais linhas de defesas antioxidantes não-enzimáticas da célula. Os grupamentos sulfidrilas são responsáveis pela transferência de suas ligações “-SH” à GSH, e se ligam aos radicais livres estimulando a sua eliminação da célula, atenuando assim, o processo de estresse oxidativo. Em síntese, uma redução de grupamentos sulfidrilas ou da atividade da GSH no SNC favorece a ocorrência de danos oxidativos diretos a proteínas e DNA de células neuronais. No presente trabalho, o conteúdo da GSH foi quantificado através da determinação dos grupamentos sulfidrílicos não protéicos. Nossos resultados revelaram que a ETZ não foi capaz de alterar significativamente os níveis da GSH no hipocampo e no córtex cerebral, no entanto, o tratamento repetido com o antagonista de RNK_1 em animais pré-tratados com ETZ, aumentou os níveis da GSH no hipocampo e no córtex cerebral, o que pode ser interpretado como um mecanismo de defesa contra o aumento do estresse oxidativo induzido pela ETZ e indicando uma propriedade antioxidante para o antagonista de RNK_1 L733,060. Já em relação aos níveis de nitrito/nitrato (NOx) nas regiões estudadas, a ETZ aumentou o seu conteúdo apenas no córtex cerebral, mas não no hipocampo. No entanto, o tratamento repetido com o antagonista de RNK_1 não foi capaz de reverter o efeito da ETZ nos níveis de NOx no córtex cerebral. O estresse oxidativo desempenha um papel vital, não apenas pela produção

excessiva de EROS, mas também devido ao esgotamento de enzimas de defesa antioxidante, como SOD e CAT (Ozay *et al.*, 2017). Embora o mecanismo exato pela qual a ETZ-icv prejudica a função cognitiva permaneça desconhecido, essas alterações bioquímicas envolvendo o estresse oxidativo, no hipocampo e córtex cerebral, juntamente com diversos outros fatores, poderiam formar a base biológica que justifique o declínio do aprendizado e memória. No nosso trabalho, as defesas antioxidantes enzimáticas foram determinadas pela mensuração da atividade da CAT e SOD no hipocampo e córtex cerebral. Pode-se observar que a ETZ diminuiu significativamente a atividade da CAT nas duas regiões cerebrais, corroborando os dados obtidos por Naik e colaboradores (2017), que observaram a redução dessas enzimas no cérebro após administração da ETZ (1.5 mg/5 ul). Também mostramos que o efeito promovido pela ETZ sobre a CAT das duas regiões cerebrais foi restaurado pelo tratamento repetido com o antagonista de RNK₁, revertendo o prejuízo na atividade da enzima catalase induzida pela ETZ. A baixa atividade da CAT está associada a muitas doenças neurológicas, entre elas a DA (Al-Abrash *et al.*, 2000), sugerindo que uma regulação adequada desta enzima poderia ser um alvo molecular na investigação de possíveis mecanismos da DA.

Por outro lado, a ETZ aumentou a atividade da SOD no hipocampo, mas promoveu uma redução marginal de 37% (embora não significativa) no córtex cerebral. O tratamento com o antagonista de RNK₁ L-733,060 aboliu o efeito da ETZ sobre a SOD no hipocampo, já a atividade dessa enzima permaneceu elevada no córtex cerebral dos animais do grupo ETZ + L-733,060. Li *et al.*, (2019) mostraram um aumento da atividade da SOD em ratos tratados com L-733,060, entretanto não revelaram qual região cerebral foi analisada. Estudos apontam que a principal linha de defesa enzimática do hipocampo é representada pela SOD, face a maior concentração dos cofatores zinco e cobre nessa região (Ferreira *et al.*, 2012). O aumento da SOD no hipocampo pode ser resultante da maior capacidade dessa região cerebral frente ao insulto promovido pela neurotoxina, na tentativa de proteger o hipocampo contra o estresse oxidativo. O aumento da SOD nessa região pode justificar a razão pela qual não foram encontrados níveis elevados de NO_x no hipocampo, indicando a capacidade dessa região de manutenção da homeostasia a favor da neutralização dos radicais livres.

A BAX, uma das proteínas pró-apoptóticas estudadas no presente trabalho, é responsável por aumentar a permeabilidade da membrana mitocondrial levando ao rompimento da organela com consequente liberação do citocromo c no citosol. O citocromo c se liga à proteína Apaf-1 e esse complexo ativa a caspase 9, que por sua vez, ativa a caspase 3, desencadeando a morte da célula por apoptose (Green & Reed, 1998; Luo *et al.*, 1998;

Munoz-Pinedo *et al.*, 2006). A caspase-3, também analisada no presente estudo, é a principal caspase efetora, sendo responsável, entre outras funções, pelo reconhecimento e clivagem da subunidade que inibe o fator de fragmentação do DNA (*DFF- DNA fragmentation factor*), liberando sua subunidade ativa, denominada CAD (*Caspase-Activated DNase*) que irá migrar para o núcleo fragmentando o DNA em segmentos de tamanhos característicos da morte celular por apoptose (Amarante-Mendes, 2003). Nossas análises por imunoblotting revelaram um aumento da expressão da caspase-3 e redução concomitante da BAX no hipocampo dos animais do grupo tratado com o ETZ + L-733,060. Podemos sugerir que o aumento dos níveis da caspase 3 frente a um insulto promovido pela ETZ representa um efeito neuroprotetor do antagonista dos RNK₁, uma vez que a forma da caspase-3 clivada é que representa a marca registrada de apoptose neuronal. Entretanto, outros trabalhos mostraram um aumento da expressão da caspase 3 após o tratamento crônico com nanopartículas de SP em ratos lesados com 6-OHDA, indicando que quanto maior a concentração de SP, melhor o efeito na proteção contra a apoptose neuronal induzida pela neurotoxina 6-OHDA (Lu et al., 2015; Zhao et al., 2016).

A IL-1 β tem sido amplamente reconhecida como necessária para a iniciação das respostas imunes inatas e adaptativas na resolução de inflamações agudas (Garlanda *et al.*, 2013). A redução da expressão da IL-1 β no grupo tratado com ETZ+L-733,060 e no grupo L-733,060 sugere um efeito protetor do antagonista dos RNK₁ L-733,060 contra o processo neuroinflamatório. Por fim, não observamos alterações no imunoconteúdo hipocampal das demais proteínas analisadas (caspase-1 e PAR-4) também conhecidas estar envolvidas em processos apoptóticos (El-Guendy e Rangnekar, 2003; Sakamaki e Satou, 2009).

5 CONCLUSÃO

Nossos resultados sugerem que o sistema neurocinérgico mediado pela SP, o principal ligante endógeno dos RNK₁, está envolvido nas alterações cognitivas e oxidativas induzidas pela administração central de ETZ, um modelo experimental de DA esporádica. Esse estudo traz evidências para o efeito neuroprotetor do antagonista dos RNK₁, L-733,060, que parece envolver uma atividade antioxidante e antiapoptótica.

REFERÊNCIAS

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol.**, v. 105, p. 121-126, 1984.

AKSENOV, M.Y.; AKSENOV, M.V.; BUTTERFIELD, D.A.; et al. Protein oxidation in the brain in Alzheimer's disease. **Neuroscience**, v. 3, p. 373- 83, 2001.

AL-ABRASH, A.S.; AL-QUOBAILI, F.A., AL-AKHRAS, G.N. Catalase evaluation in different human diseases associated with oxidative stress. **Saudi Medical Journal**, v. 21, p.826–830, 2000.

ALLURI,R.; AMBATI, SR.; ROUTHU,R.; et al. Phosphoinositide 3-kinase inhibitor AS605240 ameliorates streptozotocin-induced Alzheimer's disease like sporadic dementia in experimental rats. **EXCLI J**. v. 19, p. 71–85, 2020.

AMARANTE-MENDES, G.P. Apoptose: Programa molecular de morte celular. Einstein. 2003.

BANNISTER, J.V.; CALABRESE, L. Assays for SOD. **Methods Biochem Anal.**, v. 32, p. 279-312, 1987.

BARROS, D.M.; RAMIREZ, M.R.; IZQUIERDO, I. Modulation of working, short- and long-term memory by nicotinic receptors in the basolateral amygdala in rats. **Neurobiol Lear Mem**, v. 83, p. 113-118, 2005.

BRADFORD, M.M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

CHAUHAN, V.S.; KLUTTZ, J.M.; BOST, K.L.; et al. Prophylactic and therapeutic targeting of the neurokinin-1 receptor limits neuroinflammation in a murine model of pneumococcal meningitis. **J Immunol.**, v. 186, p. 7255–7263, 2011.

CHAUHAN, V.S.; STERKA, D.G. Jr.; GRAY, D.L.; et al. Neurogenic exacerbation of microglial and astrocyte responses to *Neisseria meningitidis* and *Borrelia burgdorferi*. **J. Immunol**. v. 180, p. 8241–8249, 2008.

DERE, E.; HUSTON, J.P.; DE SOUZA SILVA, M.A. Integrated memory for objects, places, and temporal order: Evidence for episodic-like memory in mice. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 84, p. 214-21, 2005.

DERE, E.; HUSTON, J.P.; DE SOUZA SILVA, M.A. Episodic-like memory in mice: Simultaneous assessment of object, place and temporal order memory. **Brain Research Protocols**, v. 16 p. 10-9, 2005.

DE QUERVAIN, D. J.; ROOZENDAAL, B.; MCGAUGH, J. L. Stress and glucocorticoids impair retrieval of long-term spatial memory. **Nature**, v. 394, p. 787–790, 1998.

DONKIN, J.J.; CERNAK, I.; BLUMBERGS, P.C.; VINK, R. A substance P antagonist reduces axonal injury and improves neurologic outcome when administered up to 12 hours after traumatic brain injury. **J. Neurotrauma**, v. 28, p. 217–224, 2011.

DUNHAM, N.W.; MIYA, T.S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. **J Am Pharm Assoc Am Pharm Assoc.**, v. 46, p. 208-209, 1957.

- DUYCKAERTS, C.; DELATOUR, B.; POTIER, M.C. Classification and basic pathology of Alzheimer disease. **Acta Neuropathol**, v. 118, p. 5–36, 2009.
- EBNER, K.; SINGEWALD, N. The role of substance P in stress and anxiety responses. **Amino Acids**, v. 31, p. 251–272, 2006.
- EBNER, K.; RUPNIAK, N.M.; SARIA, A.; SINGEWALD, N. Substance P in the medial amygdala: emotional stress-sensitive release and modulation of anxiety-related behavior in rats. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 101, p. 4280-4285, 2004.
- EL-GUENDY, N.; RANGNEKAR, V.M. Apoptosis by Par-4 in cancer and neurodegenerative diseases. **Exp Cell Res.**, v. 283, p. 51-66, 2003.
- ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K.H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. **Methods Enzymol.**, v. 186, p. 407-421, 1990.
- FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Associação Médica Brasileira**. v. 43, p. 61-68, 1997).
- GARLANDA, C.; DINARELLO, C.A.; MANTOVANI, A. The interleukin-1 family: back to the future. **Immunity**. v. 9, p. 1003-18, 2013.
- GIBSON, G.E.; HUANG, H.M. Oxidative stress in Alzheimer's disease. **Neurobiol Aging**, v. 26, p. 575–578, 2005.
- GRIEB, P. Intracerebroventricular Streptozotocin Injections as a Model of Alzheimer's Disease: in Search of a Relevant Mechanism. **Mol Neurobiol**, v. 53, p. 1741–1752, 2016.
- HAUBRICH, J.; CASSINI, L. F.; DIEHL, F.; et al. Novel learning accelerates systems consolidation of a contextual fear memory. **Hippocampus**. v. 26, p. 924-32, 2016.
- ISHRAT, T.; KHAN, M.B.; HODA, M.N.; et al. Coenzyme Q10 modulates cognitive impairment against intracerebroventricular injection of streptozotocin in rats. **Behav Brain Res**, v. 171, p. 916, 2006.
- JOELS, M.; PU, Z.; WIEGERT, O.; et al. Learning under stress: How does it work? **Trends in Cognitive Sciences**, v. 10, p. 152–158, 2006.
- KELLY, A.E. Locomotor activity and exploration. **In: Behavioural Neuroscience: a Practical Approach** vol. II. Oxford: Ed. A. Sahgal. p. 121, 1993.
- KIM, J. J.; DIAMOND, D. M. The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 3, p. 453–462, 2002.
- KNEZOVIC, A.; LONCAR, A.; HOMOLAK, J.; et al. Rat brain glucose transporter-2, insulin receptor and glial expression are acute targets of intracerebroventricular streptozotocin: risk factors for sporadic Alzheimer's disease? **J Neural Transm**, v. 124, p. 695–708, 2017.
- LI, Q.; WU, X.; YANG, Y.; et al. Tachykinin NK1 receptor antagonist L-733,060 and substance P deletion exert neuroprotection through inhibiting oxidative stress and cell death after traumatic brain injury in mice. **Int J Biochem Cell Biol.**, v. 107, p. 154-165, 2019.

- LI, S.; WANG, C.; WANG, W.; et al. Chronic mild stress impairs cognition in mice: From brain homeostasis to behavior. **Life Sciences**, v. 82, p. 934–942, 2008.
- LI, S.; JIN, M.; KOEGLSPERGER, T.; et al. Soluble Abeta oligomers inhibit long-term potentiation through a mechanism involving excessive activation of extrasynaptic NR2B-containing NMDA receptors. **J Neurosci.**, v. 31, p. 6627-38, 2011.
- LU, C.T.; JIN, R.R.; JIANG, Y.N.; et al. Gelatin nanoparticle-mediated intranasal delivery of substance P protects against 6-hydroxydopamine-induced apoptosis: an in vitro and in vivo study. **Drug Des Devel Ther.**, v. 9, p. 1955-1962, 2015
- MAJKUTEWICZ, I.; KUROWSKA, E.; PODLACHA, M.; et al. Dimethyl fumarate attenuates intracerebroventricular streptozotocin-induced spatial memory impairment and hippocampal neurodegeneration in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 30, p. 24–37, 2016.
- MARRIOT, I. The role of tachykinins in central nervous system inflammatory responses. **Front. Biosci.**, v. 9, p. 2153–2165, 2004.
- MATTSON, M.P. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. **Nature**, v. 430, p. 631-639, 2004.
- MAYEUX, R.; STERN, Y. Epidemiology of Alzheimer disease. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 2, a006239, 2012.
- MEHLA, J.; PAHUJA, M.; GUPTA, Y.K. Streptozotocin-Induced Sporadic Alzheimer's Disease: Selection of Appropriate Dose. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 33, p. 17–21, 2013.
- MIRANDA, K.M.; ESPEY M.G.; WINK D.A. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. **Nitric Oxide**, v. 5, p. 62-71, 2001.
- NAIK, B.; NIRWANE, A.; MAJUNDAR, A. Pterostilbene ameliorates intracerebroventricular streptozotocin induced memory decline in rats. **Cogn Neurodyn.**, v. 11, p. 35–49, 2017.
- OTSUKA, M.; YOSHIOKA, K. Neurotransmitter functions of mammalian tachykinins. **Physiol Rev.** v. 73, p. 229-308, 1993.
- OZAY, R.; TURKOGLU, E.; GURER, B.; et al. Does decorin protect neuronal tissue via its antioxidant and antiinflammatory activity from traumatic brain injury? An experimental study. **World Neurosurg**, v. 97, p. 407–415, 2017.
- PAYNE, J. D.; JACKSON, E. D.; HOSCHEIDT, S.; et al. Stress administered prior to encoding impairs neutral but enhances emotional long-term episodic memories. **Learning & Memory**, v. 14, p. 861–868, 2007.
- PATHAN, A.R.; VISWANAD, B.; SONKUSARE, S.K.; RAMARAO, P. Chronic administration of pioglitazone attenuates intracerebroventricular streptozotocin induced-memory impairment in rats. **Life Sci**, v. 79, p. 2209-22016, 2006.
- PAXINOS, G.; WATSON, C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. **Academic Press**, New York, 1986.

PEDRAZA, L. K.; SIERRA, R. O.; BOOS, F. Z.; et al. The dynamic nature of systems consolidation: Stress during learning as a switch guiding the rate of the hippocampal dependency and memory quality. **Hippocampus**, v. 26, p. 362-71, 2016.

QUERFURTH, H.W.; LAFERLA, F.M. Alzheimer's disease. **N Engl J Med.**, v. 362, p. 329–344, 2010.

RAFFA, R.B. Possible role(s) of neurokinins in CNS development and neurodegenerative or other disorders. **Neurosci Biobehav Rev.**, v. 22, p. 789-813, 1998.

RAJASEKAR, N.; DWIVEDI, S.; NATH, C. et al. Protection of streptozotocin induced insulin receptor dysfunction, neuroinflammation and amyloidogenesis in astrocytes by insulin. **Neuropharmacology**, v. 86, p. 337–352, 2014.

RASLEY, A.; MARRIOT, I.; HALBERSTADT, C.R.; et al. Substance P augments *Borrelia burgdorferi*-induced prostaglandin E2 production by murine microglia. **J. Immunol.**, v. 172, p. 5707–5713, 2004.

REITZ, C.; BRAYNE, C.; MAYEUX, R. Epidemiology of Alzheimer disease. **Nat Rev Neurol**, v. 7, p. 137–152, 2011.

ROBINSON, P.; WHITE, A.C.; LEWIS, D.E.; et al. Sequential expression of the neuropeptides substance P and somatostatin in granulomas associated with murine cysticercosis. **Infect. Immun.**, v. 70, p. 4534–4538, 2002.

ROZESKE, R. R.; VALERIO, S.; CHAUDUN, F.; HERRY, C. Prefrontal neuronal circuits of contextual fear conditioning. **Genes, Brain and Behavior**, v. 14, p. 22–36, 2014.

SAKAMAKI, K.; SATOU, Y. Caspases: evolutionary aspects of their functions in vertebrates. **J Fish Biol**, v. 74, p. 727-53, 2009.

SALKOVIC-PETRISIC, M.; HOYER, S. Central insulin resistance as a trigger for sporadic Alzheimer-like pathology: an experimental approach. **J Neural Transm Suppl**, v. 72, p. 217–233, 2007.

SANDI, C.; PINELO-NAVA, M. T. Stress and memory: Behavioral effects and neurobiological mechanisms. **Neural Plasticity**, v. 2007, p. 78970, 2007.

SCHMUED, L.C.; ALBERTSON, C.; SLIKKER, W. Jr. Fluoro-Jade: a novel fluorochrome for the sensitive and reliable histochemical localization of neuronal degeneration. **Brain Res.**, v. 751, p. 37-46, 1997.

SCHMUED, L.C.; HOPKINS, K.J. Fluoro-Jade: novel fluorochromes for detecting toxicant-induced neuronal degeneration. **Toxicol Pathol.**, v. 28, p. 91-99, 2000.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R.H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Anal Biochem.**, v. 25, p. 192-205, 1968.

SELKOE, D.J. Alzheimer's disease results from the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid beta-protein. **J Alzheimers Dis**, v. 3, p.75-80, 2001.

SHARMA, M.; GRUPTA, Y.K. Intracerebroventricular injection of streptozotocin in rats produces both oxidative stress in the brain and cognitive impairment. **Life Sci**, v. 68, p. 1021-1029, 2001.

SHARMA, M.; GRUPTA, Y.K. Chronic treatment with trans resveratrol prevents intracerebroventricular streptozotocin induced cognitive impairment and oxidative stress in rats. **Life Sci**, v. 71, p. 2489-2498, 2002.

SORRIAL, M. E.; EL SAYED, N. S. E. D. Efeito protetor do ácido valpróico no modelo de camundongo esporádico induzido pela estreptozotocina por doença de Alzheimer esporádica: possível envolvimento do sistema colinérgico. **Arch Pharmacol Naunyn-Schmiedeberg**, v. 390, p. 581–593, 2017.

SULTANA, R; BUTTERFIELD, D.A. Role of oxidative stress in the progression of Alzheimer's disease. **J Alzheimers Dis.**, v. 19, p. 341–353, 2010.

TSE, D.; LANGSTON, R. F.; KAKEYAMA, M.; et al. Schemas and memory consolidation. **Science**. v. 316, p. 76–82, 2007.

WANG, H.; HU, Y.; TSIEN, J. Z. Molecular and systems mechanisms of memory consolidation and storage. **Progress in neurobiology**, v. 79, p. 123-135, 2006.

VAN KESTEREN, M. T.; RIJKEMA, M.; RUITER, D. J.; FERNÁNDEZ, G. Retrieval of associative information congruent with prior knowledge is related to increased medial prefrontal activity and connectivity. **The Journal of Neuroscience**, v. 30, p. 15888-94, 2010.

VINET-OLIPHANT, H.; ALVAREZ, X.; BUZA, E.; et al. Neurokinin-1 receptor (NK1-R) expression in the brains of SIV-infected rhesus macaques: implications for substance P in NK1-R immune cell trafficking into the CNS. **Am. J. Pathol.**, v. 177, p. 1286–1297, 2010.

ZHAO, Y.Z.; JIN, R.R.; YANG, W.; et al. Using Gelatin Nanoparticle Mediated Intranasal Delivery of Neuropeptide Substance P to Enhance Neuro-Recovery in Hemiparkinsonian Rats. **PLoS One**. v. 11, p. e0148848, 2016.

5 ARTIGO 3 - ANTAGONISMO DOS RECEPTORES NEUROKINÉRGICOS NK₁ REVERTE O DÉFICIT MOTOR NO MODELO EXPERIMENTAL DE PARKINSONISMO INDUZIDO POR HALOPERIDOL E HEMIPARKINSONISMO INDUZIDO POR 6-HIDROXIDOPAMINA (6-OHDA) EM RATOS WISTAR.

Resumo: A Doença de Parkinson (DP) é a segunda doença neurodegenerativa mais prevalente e incapacitante no mundo, e se caracteriza pela perda progressiva de neurônios dopaminérgicos na via nigroestriatal levando ao déficit motor. O dano neuronal associado à DP é resultante de reações inflamatórias e de estresse oxidativo. Evidências mostram que a neurocinina substância P (SP) e seus receptores neurokinérgicos NK₁ (RNK₁) participam modulando processos inflamatórios no SNC, entretanto ainda não está claro o real papel da via SP-RNK₁ na gênese e progressão da DP. O objetivo do presente estudo foi investigar a possível participação dos RNK₁ nas alterações motoras e bioquímicas nos modelos de parkinsonismo induzido por haloperidol e de hemiparkinsonismo induzido pela neurotoxina 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA). No experimento 1, ratos Wistar adultos machos previamente canulados por estereotaxia no estriado dorsal ou substância nigra receberam uma injeção intraperitoneal de haloperidol (1mg/kg; i.p.) e, 20 minutos após, uma infusão intraestriatal ou intranigral do veículo (PBS) ou do antagonista dos RNK₁ L-733,060 (0,1 ou 0,5nmol; 0,5μL), sendo o tempo de catalepsia dos animais avaliado durante 60 minutos. No experimento 2, ratos com cânulas unilaterais intra-estriatais foram infundidos com veículo (PBS) ou 6-OHDA (20μg; 4μL) e, após 30 minutos, receberam um tratamento intraestriatal repetido (uma vez ao dia durante 13 dias) com veículo (PBS) ou L-733,060 (0,1nmol; 4μL). A movimentação espontânea (teste do campo aberto, CA) e a atividade motora (teste da roda giratória, RR) foram avaliadas no 7º e 14º dias após o tratamento repetido. As rotações contralaterais induzidas por apomorfina (0,6mg/Kg i.p.) foram analisadas no 14º dia após a indução da lesão estriatal. O estriado (EST) e a substância nigra (SN) foram dissecados para determinação dos principais indicadores de estresse oxidativo, apoptose e de neurodegeneração. Nossos resultados mostraram que o tratamento agudo intraestriatal, mas não intranigral, com L-733,060 diminuiu o tempo de catalepsia induzido pelo haloperidol. No CA, o tratamento repetido intraestriatal com L-733,060 reverteu o prejuízo induzido pela 6-OHDA sobre a locomoção quando os animais foram avaliados no 7º e 14º dias após a lesão estriatal. No RR, a 6-OHDA induziu prejuízo motor nos animais avaliados no 7º dia após a lesão estriatal, efeito que foi revertido pelo L-733,060. As rotações contralaterais induzidas pela apomorfina foram revertidas pelo tratamento repetido intraestriatal com L-733,060. A 6-

OHDA reduziu a CAT e SOD no EST e SN, efeito que foi revertido pelo L-733,060. O antagonista RNK_1 aumentou, por si só, a atividade da CAT e SOD, e reduziu os níveis de NOx. A 6-OHDA reduziu o imunoconteúdo de tirosina-hidroxilase (TH), porém este efeito não foi revertido pelo L-733,060. Não foram observadas alterações nos indicadores de apoptose e neuroinflamação. Nossos resultados sugerem que os RNK_1 estão envolvidos na modulação das alterações motoras induzidas pela administração do haloperidol (i.p) e 6-OHDA (estriatal), bem como nas reações oxidativas, em modelos experimentais de DP.

Palavras-chaves: L-733,060; antagonista NK_1 ; estresse oxidativo; atividade motora; parkinson.

1 INTRODUÇÃO

A doença de Parkinson (DP) é a segunda doença neurodegenerativa mais comum na população mundial, com uma prevalência de 1% em indivíduos acima dos 60 anos e aumentando acentuadamente com o avanço da idade (Miller e O'Callaghan (2015). A DP é uma doença irreversível, progressiva e neurodegenerativa (Gonza'lez e Pacheco, 2014), sendo caracterizada pela perda de neurônios dopaminérgicos da substância negra levando ao desenvolvimento dos sintomas motores como bradicinesia, acinesia, rigidez e instabilidade motora, que são a marca registrada da doença (Ehringer e Hornykiewicz, 1960; Lees, 2007).

Estudos recentes têm indicado que o dano neuronal progressivo associado a DP pode ser consequência de reações inflamatórias locais no sistema nervoso central (SNC) (Tuppo e Arias, 2005; Pennisi *et al.*, 2017). O principal marcador neuroinflamatório na DP é a ativação das células gliais, sendo observado aumento da ativação microglial com acúmulo de citocinas pró-inflamatórias e radicais livres (Gao *et al.*, 2002). O aumento da expressão e dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, tais como interleucinas (IL-1, IL-6), fator de necrose tumoral ($TNF-\alpha$), espécies reativas de oxigênio (EROS) e óxido nítrico (NO), bem como o aumento da ativação da ciclooxigenase (COX-2), desencadeiam de forma orquestrada uma cascata de eventos que conduzem ao processo neurodegenerativo subjacente à doença (Ros-Bernal *et al.*, 2011; Phani *et al.*, 2012). Infelizmente o tratamento farmacológico aprovado atualmente na clínica limita-se única e exclusivamente ao retardo da evolução natural da DP, permitindo apenas uma melhora temporária dos sintomas e do estado funcional do paciente acometido.

A neurocinina substância P (SP) e seus receptores neurocinérgicos NK_1 (RNK_1) são amplamente expressos no SNC, especificamente em neurônios e células gliais. Os RNK_1 estão abundantemente localizados em neurônios dopaminérgicos e colinérgicos dos gânglios da base, indicando, portanto, que estes neurônios estão sob o controle regulatório pela SP

participando da modulação da atividade motora (Graybiel, 1986; Reid *et al.*, 1990). Mudanças nos níveis da SP foram relatadas em modelos animais de distúrbios motores e no cérebro *post mortem* de pacientes com DP, sugerindo o envolvimento desta neurocinina na fisiopatologia da DP (Chen *et al.*, 2004). Estudos recentes indicam que as interações envolvendo a substância P (SP) e seus RNK₁ modulam a resposta inflamatória durante eventos neurodegenerativos (Lee *et al.*, 1994; Rasley *et al.*, 2004; Chauhan *et al.*, 2008). Entretanto, o papel funcional da SP na regulação da neuroinflamação, bem como na sobrevivência de neurônios dopaminérgicos ainda permanece indefinido até os dias atuais.

Este trabalho, portanto, visou investigar a possível participação dos RNK₁ para SP nas alterações motoras e em marcadores de estresse oxidativo, neuroinflamação e apoptose neuronal em ratos avaliados no modelo de parkinsonismo farmacológico e no modelo de hemiparkinsonismo induzido pela neurotoxina 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Animais e considerações éticas

Foram utilizados ratos Wistar machos, adultos, provenientes do Biotério Setorial do DFF da UFPE. Os animais foram mantidos em uma sala com condições controladas de temperatura (22 ± 2 °C) e iluminação (ciclo claro/escuro de 12 horas, com luz ligada às 7:00 h). Água e comida disponíveis à vontade. Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com os padrões internacionais de bem-estar dos animais recomendados pela Sociedade Brasileira de Neurociência e Comportamento (SBNeC) e pela Society for Neuroscience (SFN). Os protocolos experimentais foram submetidos e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA/UFPE - Processo nº 0014/2018).

2.2 Drogas e soluções

Foram utilizadas as seguintes drogas: antagonista seletivo dos receptores NK₁ L-733,060 (Tocris Bioscience, Avonmouth, Bristol United Kingdom), quetamina (Dopalen, Sespo Ind. E Com. Ltda, SP, Brasil); xilazina (SESPO Ind. e Com. Ltda, SP, BRASIL); lidocaína (Bravet®, Bravet Ltda, RJ, Brasil); heparina (Blau Farmacêutica S.A); hidrato de cloral (Sigma-Aldrich, Brasil); imipramina (Sigma-Aldrich, Brasil), haloperidol (Sigma-Aldrich, Brasil), apomorfina (Sigma-Aldrich, Brasil), 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA, Sigma-Aldrich, Brasil). L-733,060 foi dissolvido em etanol absoluto como solução estoque na concentração de 1mM e armazenado à -20°C. No momento do uso, L-733,060 foi diluído em

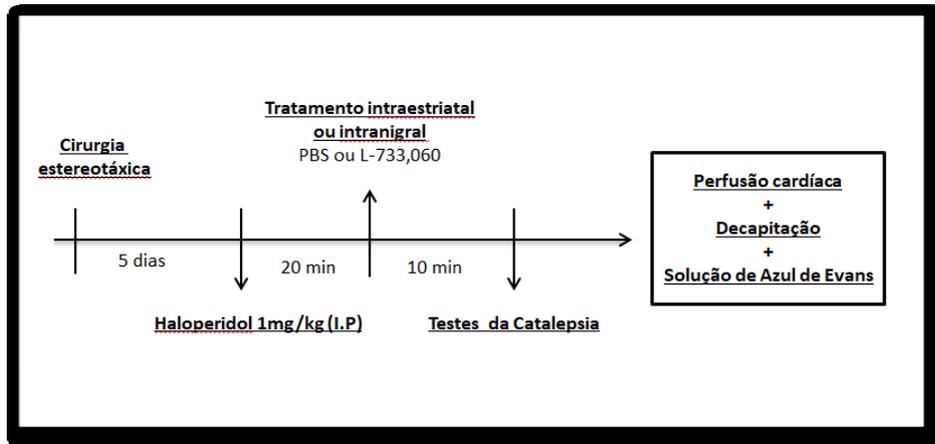
solução tampão fosfato PBS (pH=7.4; VWR Life Science Products, Solon, Ohio, USA). 6-OHDA foi dissolvida em tampão PBS à 0,1% de metabissulfito na concentração de 1mg/mL.

2.3 Cirurgia estereotáxica

O procedimento de estereotaxia foi realizado para a implantação de cânulas diretamente no estriado dorsal ou na substância negra (SN) para posterior administração das drogas. Ratos foram anestesiados com quetamina (100 mg/kg) e xilazina (20 mg/kg) (i.p.) e imobilizados individualmente no aparelho estereotáxico (Insight). Foi administrada lidocaína (com 2 % de vasoconstrictor) na face rostral da cabeça, por via subcutânea, para anestesia local e redução do extravasamento sanguíneo no momento da incisão. A calota craniana foi perfurada com uma broca odontológica para a fixação de dois parafusos (um em cada lado dos ossos parietais) e uma cânula-guia foi colocada no estriado ou SN. Foram utilizadas coordenadas para identificação do estriado dorsal: ântero-posterior (AP = + 0,5 mm), medial-lateral (ML = +/- 2,5 mm) e dorso-ventral (DV = - 5,0 mm); e da substância negra: anteroposterior (AP = - 5,0mm), medial-lateral (ML = +/- 2,2mm) e dorso-ventral (DV = - 6,8mm), segundo Paxinos & Watson (1986). Após o término das cirurgias, os ratos foram reconduzidos às suas caixas recebendo água e ração à vontade. No período de recuperação os animais foram manipulados somente durante a troca das caixas. Findo este período, os ratos foram divididos em grupos e tratados por via central com uma injeção de veículo (PBS), 6-OHDA ou L-733,060 através de uma agulha injetora conectada por um tubo de polietileno (PE-10 STWL; Plastics One Inc., Virginia, USA) utilizando uma micro-seringa com capacidade de 10 µl (Hamilton 701 N).

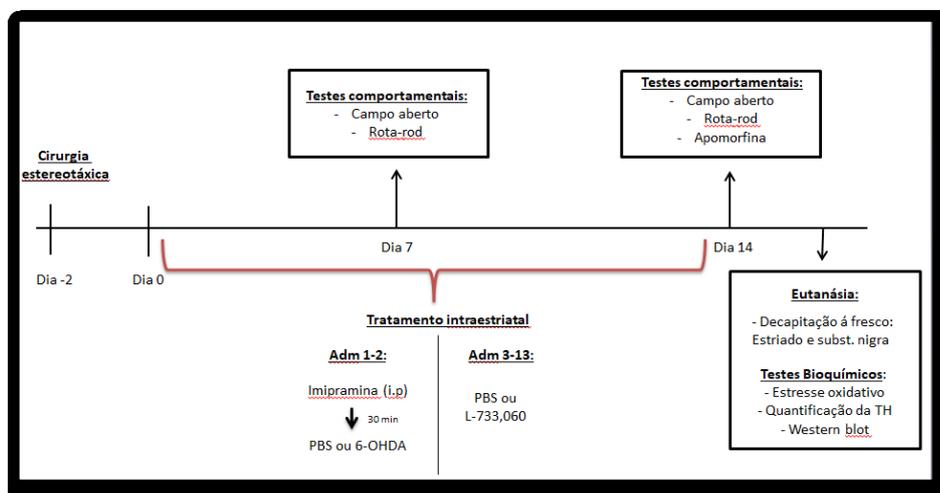
2.4 Delineamento experimental

Protocolo 1 (Modelo do parkinsonismo farmacológico) – Ratos foram submetidos a cirurgias estereotáxicas para a implantação de cânulas unilateralmente intraestriatal ou intranigral. Após 5 dias de recuperação, os animais receberam uma injeção intraperitoneal (i.p.) de haloperidol 1mg/kg e, 20 min após, a infusão intraestriatal ou intranigral do veículo (PBS) ou do antagonista RNK₁ L-733,060 (0,1 ou 5nmol; 0,5µL). Após 10 min, cada rato foi avaliado no teste da catalepsia. Posteriormente, realizamos a perfusão intracardíaca, decapitação e infusão da solução de azul de Evans 0,5% (0,5uL) para confirmação da localização das cânulas.

Figura 1: Delineamento do protocolo experimental 1

Fonte: Próprio autor.

Protocolo 2 (Modelo de hemiparkinsonismo induzido pela 6-OHDA – Tratamento dose repetida): Ratos foram submetidos à cirurgia de implantação de cânulas unilateralmente intraestriatal. Após dois dias de recuperação, os animais foram tratados no dia 1 e 2 com o veículo (PBS) ou 6-OHDA (20 μ g, 4 μ L; 5 μ g/ μ L) para induzir a lesão neuronal. Após 30 minutos, os animais receberam veículo (PBS) (4 μ L) ou antagonista de RNK₁ L-733,060 (4 μ L, 0,1nmol), sendo tratados por 13 dias consecutivos. No 7^o e 14^o dia, após o último tratamento central, os animais foram avaliados nos testes comportamentais. Posteriormente, os animais foram decapitados e o cérebro de cada rato foi removido para dissecação do estriado e substância nigra, que foram armazenados para análises bioquímicas (estresse oxidativo, quantificação dos níveis de tirosina hidroxilase e western blot).

Figura 2: Delineamento do protocolo experimental 2

Fonte: Próprio autor.

2.5 Testes comportamentais

2.5.1 Teste da catalepsia

O haloperidol é uma droga que atua bloqueando os receptores dopaminérgicos do tipo D2 e induz o comportamento de catalepsia em roedores, efeito que pode ser revertido pelo tratamento com agonistas diretos ou indiretos do sistema dopaminérgico (Costall e Naylor, 1974). Para isso, cada rato foi colocado individualmente em uma barra horizontal (0,5cm de diâmetro), elevada a 5cm da mesa, para avaliação do tempo de catalepsia (permanência demorada e involuntária do animal em uma posição não usual) em intervalos de 10min, durante uma sessão total de 1h consecutiva à injeção do haloperidol. Caso o animal saísse da barra antes dos 10 min ele seria reconduzido a barra por no máximo 3 vezes.

2.5.2 Teste do campo aberto (*open-field*)

O campo aberto (*open-field*) é um teste amplamente utilizados para a avaliação da atividade locomotora e exploratória em roedores (Walsh e Cummins, 1976). O teste foi realizado em uma arena de madeira coberta com fórmica impermeável branca, com o chão branco de 100x100cm (dividida por linhas pretas em 25 quadrados de 20x20cm) e paredes brancas (40cm de altura). Cada rato foi colocado individualmente no centro da arena e a frequência de locomoção foi contabilizada pelo número de quadrantes percorridos, bem como o número de comportamentos de levantar (*rearing*). Drogas neurodegenerativas (como 6-OHDA, por exemplo) são capazes de reduzir a atividade locomotora neste teste (Kelly, 1993).

2.5.3 Teste da roda giratória (*rotarod*)

O rotarod é um dos testes mais utilizados e sensíveis para medir a função motora em roedores. Foi utilizado um aparelho rotarod automatizado (EFF 411, Insight® Equipamentos LTDA), que consiste em uma caixa de acrílico com um cilindro de 7cm de diâmetro, instalado transversalmente a aproximadamente 20cm do piso do equipamento, mantido em rotação fixa de 16 r.p.m através de um motor. Ratos pré-selecionados (sem prejuízo motor anterior ao tratamento) foram colocados sobre a barra giratória e a latência para a primeira queda (em s) e o número de quedas durante a sessão foi registrado. Este teste permite avaliar se os tratamentos promovem incoordenação motora nos animais (Duham e Miya, 1957).

2.5.4 Teste das rotações contralaterais induzidas pela apomorfina

A depleção de dopamina foi avaliada pelo comportamento rotacional induzido pela apomorfina. Este é um teste sensível a lesões estriatais com extensões maiores que 80% (Deumens *et al.*, 2002). No 14º dia após a lesão estriatal induzida com 6-OHDA, os animais receberam apomorfina 0,6mg/Kg i.p. e foram colocados em recipientes plásticos cilíndricos (diâmetro de 25 cm) por 30 minutos. O comportamento rotacional foi observado e

determinado através da contagem de número de rotações de 360° contralaterais (na direção contrária à lesão).

2.6 Análises bioquímicas

2.6.1 Dissecação de estruturas cerebrais

Os ratos foram submetidos à eutanásia por decapitação com guilhotina, sem uso de anestésicos, e seus cérebros rapidamente removidos e colocados em papel filtro em placa de Petri sob gelo. Imediatamente após, os cérebros foram lavados com solução gelada (4°C) de NaCl 0,9% e o estriado e a substância nigra foram isolados das estruturas circunjacentes utilizando tesoura de microdissecação. Terminada a dissecação, as estruturas cerebrais foram acondicionadas em tubos eppendorfs, pesadas e armazenadas em freezer à -80°C até o dia das análises bioquímicas.

2.6.2 Homogeneização dos tecidos

Os tecidos cerebrais foram sonicados e homogeneizados em tampão fosfato de sódio 20mM acrescido de cloreto de potássio 140mM em pH 7,4. O homogenato foi centrifugado a 3500rpm por 10 minutos a 4°C. Utilizou-se o sobrenadante para as análises posteriores.

2.6.3 Dosagem de proteínas

A concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford (1976). O princípio do método baseia-se na determinação da concentração de ligações peptídicas através da medida da absorvância do complexo proteína-corante. Este complexo absorve em comprimento de onda de 595nm. A absorvância é considerada diretamente proporcional à concentração de proteína na solução analisada, onde uma solução de albumina (1mg/mL) foi utilizada como padrão.

2.6.4 Estresse oxidativo

2.6.4.1 Conteúdo de glutathiona reduzida (GSH)

Os níveis de GSH foram determinadas de acordo com Sedlak e Lindsay (1968) com pequenas modificações. Os níveis de GSH foram avaliados por meio da quantificação de grupos sulfidríla não proteicos em amostras de homogenato que foram submetidas à precipitação de proteínas por adição de TCA 20% seguida da centrifugação a 800g por 10 minutos. Os sobrenadantes foram utilizados para o ensaio bioquímico. L-cisteína foi utilizada para a construção da curva padrão dos grupos sulfidríla e os resultados expressos em $\mu\text{mol de GSH.mg de proteína}^{-1}$.

2.6.4.2 Conteúdo de nitrito e nitrato (NOx)

As concentrações de nitratos e nitritos (NOx) em homogenato de estriado e substância negra foram determinadas de acordo com Miranda *et al.*, (2001), utilizando o reagente de Griess (0,1% dihidrocloridronaftiletilendiamida em água e 1% de sulfanilamida concentrada em 5% de ácido clorídrico). Uma curva de calibração foi feita utilizando nitrato de sódio, e cada ponto da curva foi submetido aos mesmos tratamentos que as amostras. Neste protocolo, os nitratos são reduzidos pelo cloreto de vanádio a nitritos, que são detectados espectrofotometricamente a 540nm pela reação com o reagente de Griess. Os resultados estão expressos em μmol de nitritos.mg de proteína⁻¹.

2.6.4.3 Atividade da enzima catalase (CAT)

A atividade enzimática da CAT foi determinada através do método de Aebi (1984). Na amostra previamente homogeneizada, foi adicionado Triton 0,1 % seguido de agitação. Esta mistura foi conservada em gelo durante 15 minutos. Ao tampão fosfato de potássio 10 mM, pH 7,0, foi adicionado H₂O₂ 30% (v/v). Após, foi realizada a leitura da queda da absorbância do H₂O₂ a 240nm, à temperatura ambiente, durante 180 segundos. Para o cálculo, utilizou-se o coeficiente de extinção do H₂O₂ de 39,4 mM⁻¹cm⁻¹. Os resultados da atividade enzimática estão expressos em U/mg de proteína (unidade de atividade da CAT por mg de proteína).

2.6.4.4 Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi determinada de acordo com Bannister e Calabrese (1987). Primeiramente, foram realizadas leituras da auto-oxidação da adrenalina. Após, foram adicionados à amostra catalase 10mM, tampão glicina 50mM e adrenalina 60mM, e ao branco foi adicionada adrenalina 60mM. A atividade enzimática foi determinada pela inibição da auto-oxidação da adrenalina medida espectrofotometricamente em 480nm à temperatura ambiente. A atividade da enzima foi expressa em U/mg de proteína (unidade de atividade da SOD por mg de proteína).

2.6.4.5 Níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

O homogeneizado foi precipitado por meio de uma reação ácida com ácido tricloroacético (TCA, Vetec, São Paulo, Brasil) a 10% com sulfato de sódio adicionado ao sobrenadante na proporção 1:1 (v/v). Após centrifugação, o sobrenadante foi tratado com ácido tiobarbitúrico (TBA, Sigma-Aldrich St. Louis, MO, EUA) 0,67% na proporção de 1:1 (v/v). A mistura foi levada a um banho fervente durante 2 horas e, após, resfriada à temperatura ambiente. A absorbância obtida através da coloração rósea resultante foi medida em espectrofotômetro a 532nm. Concomitantemente, foi feita uma curva de calibração com 1,1,3,3-tetrametoxipropano, na qual todos os pontos foram tratados da mesma forma que as

amostras. Os resultados foram expressos como nmol de TBARS/mg de proteína (Esterbauer e Cheeseman, 1990).

2.6.5 Ensaio de Western Blot (WB)

Na montagem do sistema vertical o gel de resolução foi confeccionado para uma concentração de 12,5% de poliacrilamida. De cada amostra do estriado, 40 μ g de proteína total carregada com o tampão Blue Juice 5x foi aplicado nos poços do gel de concentração. O marcador de peso molecular usado foi o Full-Range Rainbow Marker (12-225kDa; GE Healthcare). A corrida eletroforética foi realizada a uma voltagem constante de 120V e 30mA à temperatura ambiente. As proteínas separadas foram transferidas para membrana de nitrocelulose Hybond-ECL (GE Healthcare). Para este ensaio foram utilizados os seguintes anticorpos primários: β -actina (Sigma Aldrich), Tirosina Hidroxilase (Cell Signaling Technology), Caspase-1 (Santa Cruz), Caspase-3 (Cell Signaling Technology) e PAR-4 (Santa Cruz), em uma diluição de 1:2500 (β -actina) e 1:1000 para os demais anticorpos. As membranas foram incubadas com o anticorpo secundário mouse (1:10000) e rabbit (1:2000) durante 1 hora, seguido da revelação utilizando ECL Western Blotting (GE Healthcare).

2.7 Análise estatística

Para as análises estatísticas foi utilizado o software Statistic[®] 10 (StatSoft Inc., EUA). Todas as variáveis foram submetidas ao teste de Shapiro-Wilk para análise da normalidade dos dados, a fim de definir a utilização de teste paramétrico ou não-paramétrico. Os dados que obedeceram a distribuição normal foram inicialmente submetidos à análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias. Para situações em que houve a reexposição dos diferentes grupos experimentais ao mesmo contexto, adotou-se a ANOVA com medidas repetidas. Quando adequado, foi utilizado o teste *post-hoc* de Newman-Keuls para determinação das diferenças estatísticas entre os diferentes grupos experimentais. O teste “*t*” de Student bicaudal pareado ou não-pareado foi adotado para a comparação entre dois grupos experimentais. Para os dados que não obedeceram a distribuição normal foi utilizado os testes de Kruskal-Wallis (para comparações múltiplas) ou Mann-Whitney (para comparação entre dois grupos). Os gráficos foram confeccionados utilizando o software GraphPad Prism[®] 6.01 (GraphPad Prism, EUA), com os resultados expressos através da média \pm erro padrão da média (E.P.M.) ou mediana \pm intervalo interquartil (Q1-Q3), com os níveis de probabilidade inferiores ou iguais a 5% sendo considerados indicativos de diferenças significativas ($p < 0,05$).

3 RESULTADOS

Protocolo experimental 1 – Efeito do tratamento dose única com o antagonista de RNK₁ no modelo de parkinsonismo farmacológico induzido pelo haloperidol

3.1 Teste da catalepsia

A Figura 3 ilustra o comportamento de catalepsia induzida por haloperidol em ratos avaliados a cada 10 minutos durante uma sessão total de 60 minutos. A influência do tratamento intraestriatal (Fig. 3A) ou intranigral (Fig. 3B) com o antagonista de RNK₁ L-733,060 (0,1 ou 5nmol) no comportamento dos animais foi comparada com o grupo controle (veículo).

Observa-se que a administração sistêmica do haloperidol (1mg/kg; i.p.) aumentou progressivamente o tempo de catalepsia dos animais nos primeiros dez minutos, com este efeito sendo mantido ao longo de toda a sessão de observação comportamental. A ANOVA com medidas repetidas revelou um efeito significativo no Fator tratamento intraestriatal [$F(1,18)=6,96, p<0,01$], no Fator repetição [$F(1,18)=8,56, p<0,0001$] e no Fator interação tratamento x repetição [$F(1,18)=2,80, p<0,01$] (Figura 3A). O teste *post hoc* de Newman-Keuls mostrou que o tratamento intraestriatal com o antagonista de receptores NK₁ L-733,060, na dose de 0,1nmol, foi capaz de diminuir significativamente o tempo de catalepsia dos animais na primeira (10min) e segunda (20min) sessões ($p<0,05$), não diferindo do grupo controle (veículo) a partir da terceira sessão (30min) de observação comportamental ($p>0,05$). Já a maior dose testada (5nmol) do antagonista de receptores NK₁ L-733,060 reduziu significativamente o tempo de catalepsia dos animais na primeira (10min; $p<0,001$), segunda (20min); $p<0,05$) e terceira sessões (30min; $p<0,05$) quando comparados ao grupo controle (veículo), com perda total do seu efeito a partir dos 40 minutos da administração do haloperidol ($p>0,05$; Figura 3A). A ANOVA com medidas repetidas não detectou qualquer diferença estatística no Fator tratamento intranigral [$F(1,16)=0,00, p=0,991$], Fator repetição [$F(1,16)=0,60, p=0,662$] e Fator interação tratamento x repetição [$F(1,16)=1,30, p=0,236$] (Figura 3B).

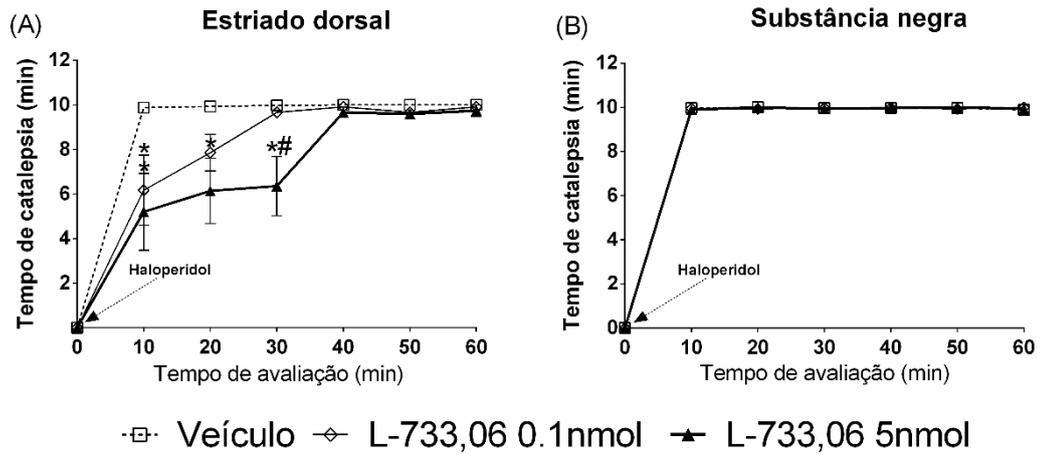


Figura 3: Efeito da administração intraestriatal (A) ou intranigral (B) do antagonista de RNK₁ L-733,060 (0,1 ou 5nmol) sobre o tempo de catalepsia induzida pelo haloperidol (1mg/Kg; i.p.) em ratos. Os resultados são expressos como média ± erro padrão da média; * $p \leq 0,05$ em relação ao grupo controle (veículo).

Protocolo experimental 2 – Efeito do tratamento repetido com o antagonista de RNK1 no modelo de hemiparkinsonismo induzido pela 6-hidroxidopamina

3.2 Peso corporal

Não houve diferenças significativas no peso dos animais avaliados no 7º e 14º dia ($p > 0,05$) (Figura 4).

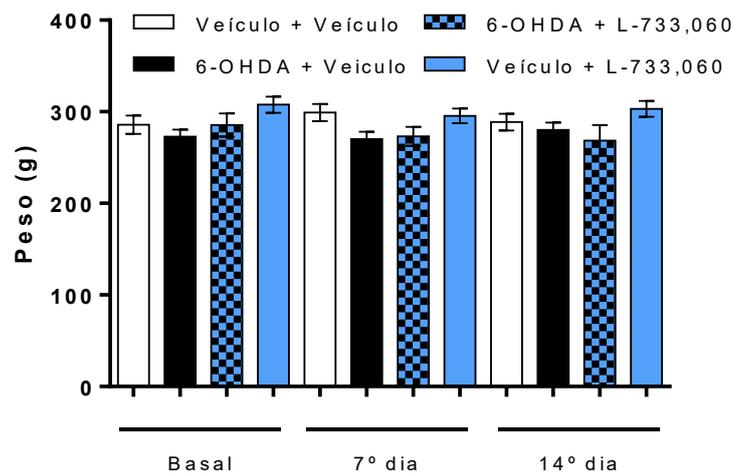


Figura 4: Efeito do tratamento repetido com o antagonista de RNK₁ L-733,060 em ratos pré-tratados com 6-hidroxidopamina (6-OHDA; 0,2mg) sobre o peso corporal avaliado no 7º e 14º dia. Os resultados são expressos como média ± erro padrão da média.

3.3 Teste do campo aberto

Em relação à movimentação central dos ratos avaliados 7 dias após os tratamentos, a ANOVA de duas vias não detectou efeito no Fator pré-tratamento [$F(1,34)=3,047, p=0,090$] e no Fator interação pré-tratamento x tratamento [$F(1,34)=1,429, p=0,240$], mas identificou um efeito significativo no Fator tratamento [$F(1,34)=6,464, p=0,015$]. O teste *post hoc* de Newman-Keuls revelou que o antagonista de RNK₁ L-733,060 aumentou a movimentação central em relação ao grupo controle ($p<0,05$). Na movimentação periférica, a ANOVA de duas vias revelou efeito significativo no Fator pré-tratamento [$F(1,34)=19,015, p=0,000114$], sem ocorrer efeito no Fator tratamento [$F(1,34)=3,270, p=0,079$] e no Fator interação [$F(1,34)=3,752, p=0,061$]. O teste *post hoc* de Newman-Keuls indicou que a infusão intraestriatal da 6-OHDA reduziu significativamente a movimentação periférica dos animais em relação ao grupo controle ($p<0,001$), e o tratamento repetido com o antagonista de RNK₁ L-733,060 em animais pré-tratados com a 6-OHDA aboliu totalmente o efeito da neurotoxina sobre a movimentação periférica. Na movimentação total, a ANOVA de duas vias revelou efeito significativo no Fator pré-tratamento [$F(1,34)=17,050, p=0,000223$] e no Fator tratamento [$F(1,34)=5,007, p=0,032$], sem efeito no Fator interação [$F(1,34)=2,681, p=0,111$]. O teste *post hoc* de Newman-Keuls indicou que a infusão intraestriatal da 6-OHDA reduziu significativamente a movimentação total dos animais em relação ao grupo controle ($p<0,001$), e o tratamento repetido com o antagonista de RNK₁ L-733,060 em animais pré-tratados com a 6-OHDA aboliu totalmente o efeito da neurotoxina sobre a movimentação total. Na movimentação vertical (*rearing*), a ANOVA de duas vias indicou um efeito no Fator pré-tratamento [$F(1,34)=25,890, p=0,000013$] e no Fator Tratamento [$F(1,34)=4,278, p=0,046$]. O teste de Newman-Keuls revelou que a infusão intraestriatal da 6-OHDA reduziu significativamente a movimentação vertical dos animais em relação ao grupo controle ($p<0,001$), e o tratamento L-733,060 em animais pré-tratados com a 6-OHDA aboliu totalmente o efeito da neurotoxina sobre a movimentação vertical ($p<0,05$) (Figura 5A).

Em relação à movimentação central dos ratos avaliados 14 dias após os tratamentos, a ANOVA de duas vias não detectou efeito no Fator pré-tratamento [$F(1,34)=1,372, p=0,250$] e no Fator interação pré-tratamento x tratamento [$F(1,34)=2,752, p=0,106$], mas identificou um efeito significativo no Fator tratamento [$F(1,34)=6,795, p=0,013$]. O teste *post hoc* de Newman-Keuls revelou que o antagonista de RNK₁ L-733,060 aumentou a movimentação central em relação ao grupo controle ($p<0,05$). Na movimentação periférica, a ANOVA de duas vias revelou efeito significativo no Fator pré-tratamento [$F(1,34)=18,116, p=0,000154$], no Fator tratamento [$F(1,34)=8,560, p=0,0061$], mas sem efeito no Fator interação

[F(1,34)=0,065, $p=0,799$]. O teste *post hoc* de Newman-Keuls indicou que a infusão intraestriatal da 6-OHDA reduziu significativamente a movimentação periférica dos animais em relação ao grupo controle ($p<0,001$), enquanto o antagonista de RNK₁ L-733,060 aumentou a movimentação periférica em comparação ao grupo controle. Na movimentação total, a ANOVA de duas vias revelou efeito significativo no Fator pré-tratamento [F(1,34)=12,813, $p=0,0011$] e no Fator tratamento [F(1,34)=12,559, $p=0,00117$], sem efeito no Fator interação [F(1,34)=0,0003, $p=0,986$]. O teste de Newman-Keuls indicou que a infusão intraestriatal da 6-OHDA reduziu a movimentação total dos animais ($p<0,001$), enquanto o antagonista de RNK₁ L-733,060 aumentou a movimentação total dos animais em relação ao grupo controle. Além disso, o tratamento com o antagonista de RNK₁ L-733,060 em animais pré-tratados com a 6-OHDA reverteu totalmente o efeito da neurotoxina sobre a movimentação total. Na movimentação vertical (*rearing*), a ANOVA de duas vias indicou um efeito no Fator pré-tratamento [F(1,34)=23,772, $p=0,000025$] e no Fator Tratamento [F(1,34)=12,056, $p=0,00143$]. O teste de Newman-Keuls revelou que a infusão intraestriatal da 6-OHDA reduziu enquanto o antagonista NK₁ aumentou a movimentação vertical dos animais em relação ao grupo controle ($p<0,001$). Já o tratamento com o L-733,060 em animais pré-tratados com a 6-OHDA apresentou uma tendência marginal ($p<0,062$) em abolir o efeito da neurotoxina sobre a movimentação vertical (Figura 5B).

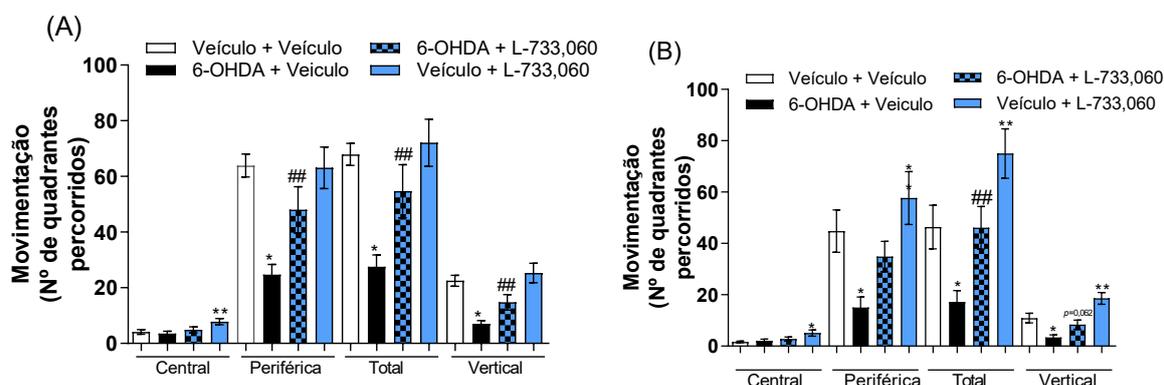


Figura 5: Efeito do tratamento com o antagonista de RNK₁ L-733,060 em ratos submetidos ao modelo de hemiparkinsonismo induzido pela 6-hidroxidopamina (6-OHDA; 0,2mg) avaliados no 7º (A) e 14º dia (B) após os tratamentos no teste do campo aberto (*open-field*). Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média. * $p<0,05$ e ** $p<0,01$ em relação ao grupo controle (veículo); ## $<0,01$ em relação ao grupo 6-OHDA.

3.4 Teste da roda giratória

Entre os grupos experimentais de ratos submetidos ao teste da roda giratória (*rotarod*) e avaliados 7 dias após os diferentes tratamentos, o teste de Kruskal-Wallis revelou uma

diferença estatística na latência para a 1ª queda [H37(3)=12,833; $p=0,0050$] e no número total de quedas [H37(3)=12,879; $p=0,0049$] dos animais (Tabela 1). O teste de comparações múltiplas de Dunn revelou que a 6-OHDA (grupo 6-OHDA + veículo) reduziu a latência para a 1ª queda ($p<0,05$), bem como aumentou o número total de quedas ($p<0,05$) dos animais em relação ao grupo controle (Veículo + Veículo). No entanto, o grupo de animais tratados com o antagonista de RNK_1 + 6-OHDA não apresentou diferença estatística em relação ao grupo controle (Veículo + Veículo) e em relação ao grupo 6-OHDA + Veículo, em ambos os parâmetros comportamentais avaliados ($p>0,05$; Tabela 1).

Para os demais grupos experimentais avaliados no teste da roda giratória (*rotarod*) 14 dias após os diferentes tratamentos, o teste de Kruskal-Wallis não revelou qualquer diferença estatística na latência para a 1ª queda [H37(3)=0,0192; $p=0,999$] e no número total de quedas [H37(3)=0,0091; $p=0,999$] dos animais (Tabela 1).

Tabela 1 - Efeito do tratamento repetido com o antagonista de RNK_1 L-733,060 em ratos submetidos ao modelo de hemiparkinsonismo induzido pela 6-hidroxidopamina (6-OHDA; 0,2mg) avaliados no 7º e 14º dia após os tratamentos no teste da roda giratória (*rotarod*). Os resultados são expressos como mediana \pm intervalo interquartil (n=9-11/grupo).

Grupos experimentais		Latência para a 1ª queda (s)	Número total de quedas
7º dia	Veículo + Veículo	120,00 (120,00-120,00)	0,00 (0,00-0,00)
	6-OHDA + Veículo	83,00 (120,00-32,00)*	1,00 (2,00-0,00)*
	6-OHDA + L-733,060	120,00 (120,00-112,50)	0,00 (0,50-0,00)
	Veículo + L-733,060	120,00 (120,00-120,00)	0,00 (0,00-0,00)
14º dia	Veículo + Veículo	120,00 (120,00-120,00)	0,00 (0,00-0,00)
	6-OHDA + Veículo	120,00 (120,00-120,00)	0,00 (0,00-0,00)
	6-OHDA + L-733,060	120,00 (120,00-120,00)	0,00 (0,00-0,00)
	Veículo + L-733,060	120,00 (120,00-120,00)	0,00 (0,00-0,00)

3.5 Teste das rotações contralaterais induzidas pela apomorfina

No 14º dia após a infusão intraestriatal da 6-OHDA, cada grupo experimental de ratos recebeu apomorfina (0,6mg/kg, i.p.), um agonista dopaminérgico que induz rotações contrárias à lesão (rotação contralateral). Não foi observado comportamento rotacional nos grupos de animais que receberam apenas o veículo (grupo controle) ou o antagonista de receptores NK_1 L-733,060. A ANOVA de duas vias revelou um efeito significativo no Fator pré-tratamento [F(1,41)=15,450, $p<0,001$], no Fator tratamento [F(1,41)=6,523, $p<0,01$] e no Fator interação pré-tratamento x tratamento [F(1,41)=6,523, $p<0,01$] (Figura 6). O teste *post hoc* de Newman-Keuls mostrou que o pré-tratamento com 6-OHDA (grupo 6-OHDA + Veículo) aumentou significativamente o número de rotações contralaterais em relação ao grupo controle (Veículo + Veículo); $p<0,001$). Por sua vez, o tratamento repetido (14dias)

com o antagonista de receptores NK_1 L-733,060 (0,1nmol) reverteu o número de rotações contralaterais dos animais em relação ao grupo 6-OHDA + Veículo ($p < 0,001$).

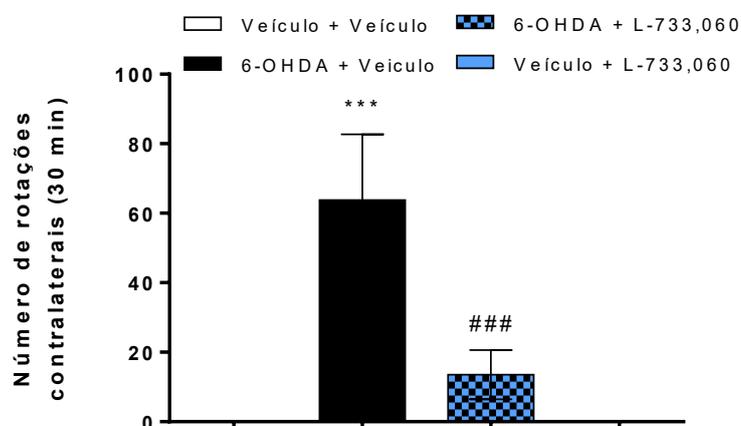


Figura 6: Efeito do tratamento repetido com o antagonista de NK_1 L-733,060 sobre o comportamento rotacional (contralateral) induzido por apomorfina (0,6mg/kg, i.p.) em ratos com lesão unilateral induzida pela 6-OHDA. Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média. *** $p < 0,001$ em relação ao grupo controle (veículo); ### $p < 0,001$ em relação ao grupo 6-OHDA.

3.6 Conteúdo de grupos sulfidril (GSH)

Os níveis de GSH no estriado (A) e substância nigra (B) não foram alterados por nenhum dos tratamentos ($p > 0,05$) (Figura 7).

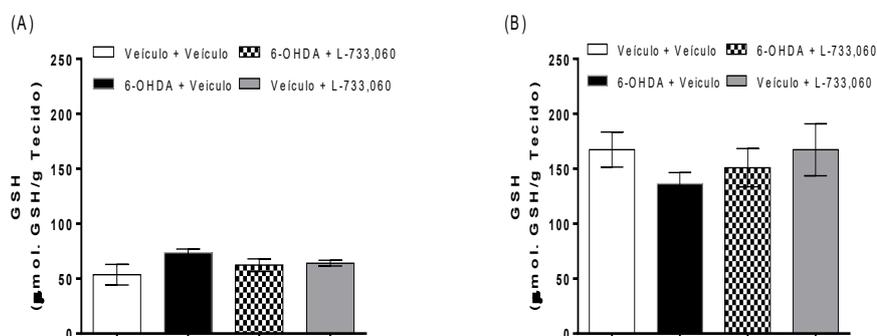


Figura 7: Efeito do tratamento repetido com o antagonista de NK_1 L-733,060 no conteúdo de sulfidrilas (GSH) do estriado (A) e substância nigra (B) de ratos avaliados 14 dias após a infusão intraestriatal da 6-OHDA. Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média.

3.7 Conteúdo de nitrito e nitrato (NOx)

Os níveis de NOx no estriado (A) não foram alterados nos grupos 6-OHDA e 6-OHDA + L-733,060 em comparação ao grupo controle ($p > 0,05$). No entanto, o tratamento com L-733,060 apresentou uma tendência ($p = 0,07$) em reduzir os níveis de NOx em relação aos demais grupos experimentais, embora não tenha ocorrido diferença significativa entre

eles. Já na substância negra (B), o único tratamento que modificou os níveis de NOx foi com o antagonista de RNK₁ L-733,060, que por si só reduziu os níveis de NOx em relação ao grupo controle ($p < 0,01$) e em relação ao grupo 6-OHDA ($p < 0,01$). Além disso, o grupo tratado com 6-OHDA + L-733,060 apresentou uma tendência ($p = 0,09$) em reduzir os níveis de NOx quando comparado ao grupo 6-OHDA (Figura 8B).

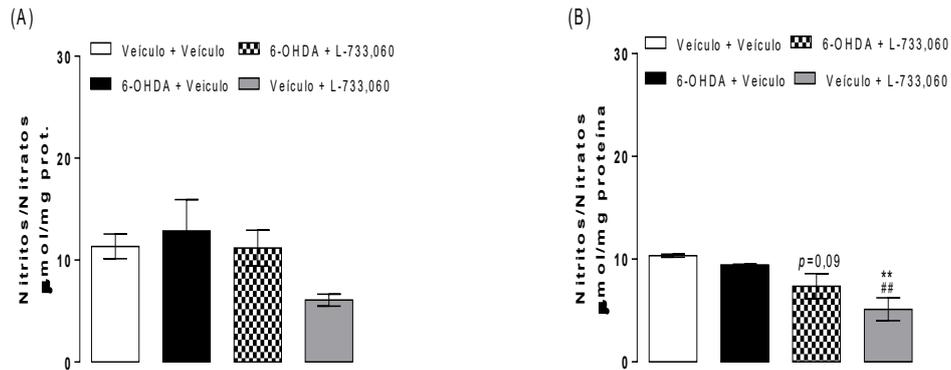


Figura 8: Efeito do tratamento repetido com o antagonista de RNK₁ L-733,060 na concentração de nitrito e nitrato (NOx) do estriado (A) e substância negra (B) de ratos avaliados 14 dias após a infusão intraestriatal da 6-OHDA. Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média. ** $p \leq 0,01$ em relação ao grupo controle (veículo); ## $p < 0,001$ em relação ao grupo 6-OHDA.

3.8 Atividade da enzima catalase (CAT)

A atividade da CAT no estriado (A) foi reduzida significativamente pelo pré-tratamento com a 6-OHDA ($p < 0,01$), efeito abolido totalmente pelo tratamento com o L-733,060 ($p < 0,01$). O antagonista de RNK₁ por si só aumentou a atividade da CAT no estriado ($p < 0,01$; Figura 9A). Na região de substância negra (B), a atividade da CAT não foi alterada por nenhum dos tratamentos ($p > 0,05$), embora tenhamos observado uma tendência em aumentar a atividade dessa enzima no grupo tratado com o antagonista NK₁ L-733,060 ($p = 0,06$) (Figura 9B).

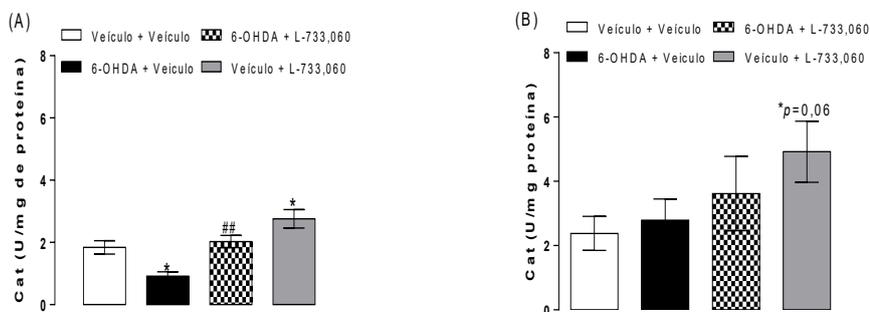


Figura 9: Efeito do tratamento repetido com o antagonista de RNK₁ L-733,060 na atividade da enzima catalase (CAT) do estriado (A) e substância negra (B) de ratos avaliados 14 dias após a infusão intraestriatal da 6-OHDA. Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média. * $p \leq 0,05$ em relação ao grupo controle (veículo); ## $p < 0,01$ em relação ao grupo 6-OHDA.

3.9 Atividade da superóxido dismutase (SOD)

No estriado (A), a atividade da SOD não foi alterada por nenhum dos tratamentos ($p > 0,05$; Figura 10A), enquanto na substância nigra (B) o pré-tratamento com a 6-OHDA reduziu significativamente a atividade da SOD em comparação ao grupo controle ($p < 0,05$), efeito que foi totalmente abolido pelo tratamento com L-733,060. Além disso, o antagonista de $RN K_1$ por si só aumentou significativamente a atividade da SOD na substância nigra quando comparado ao grupo controle ($p < 0,001$; Figura 10B).

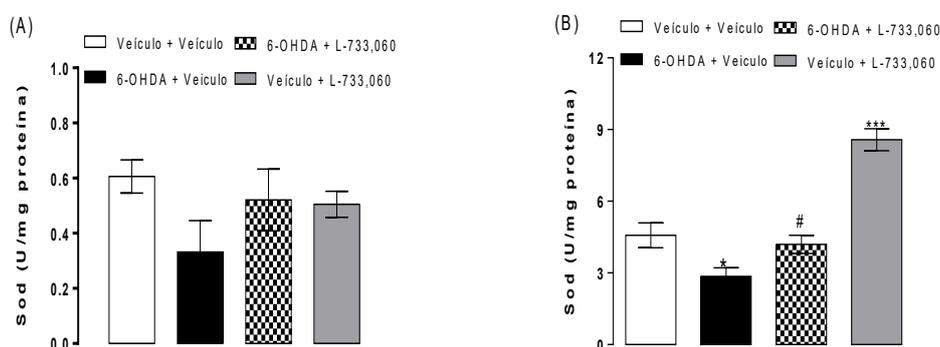


Figura 10: Efeito do tratamento repetido com o antagonista de $RN K_1$ L-733,060 na atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) do estriado (A) e substância nigra (B) de ratos avaliados 14 dias após a infusão intraestriatal da 6-OHDA. Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média. * $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,001$ em relação ao grupo controle (veículo); # $p < 0,05$ em relação ao grupo 6-OHDA.

3.10 Níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) avaliados no estriado (A) e substância nigra (B) não foram modificados por nenhum dos tratamentos realizados ($p > 0,05$).

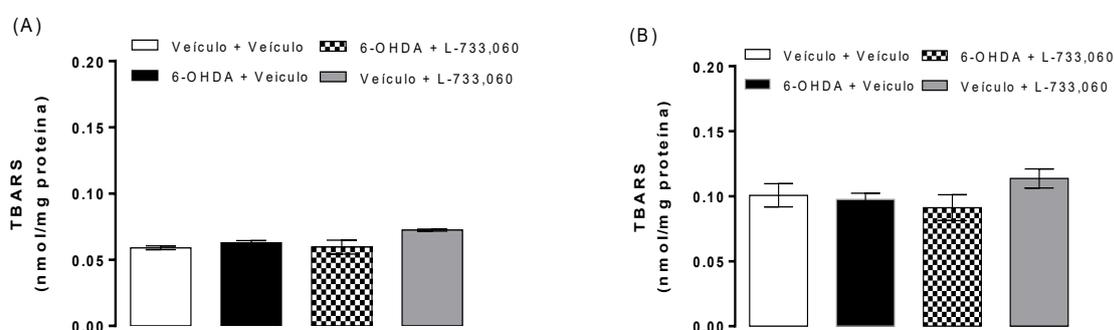


Figura 11: Efeito do tratamento repetido com o antagonista de $RN K_1$ L-733,060 no conteúdo de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) do estriado (A) e substância nigra (B) de ratos avaliados 14 dias após a infusão intraestriatal da 6-OHDA. Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média.

3.12 Ensaios de *Western Blot* (WB)

O WB foi conduzido para quantificar os níveis de expressão da TH, caspase-1, caspase-3, IL-1 β e PAR-4 no estriado de ratos. Em relação à TH, embora a ANOVA de duas vias não tenha revelado diferença estatística para os três fatores analisados, uma tendência não significativa foi observada para o Fator pré-tratamento [F(1,25)=3,18259, $p=0,0866$] e Fator tratamento [F(1,25)=3,30497, $p=0,0811$]. Quando aplicado o teste *post hoc* de Newman-Keuls, a análise mostrou que o pré-tratamento com a 6-OHDA reduziu significativamente o imunocontéudo de TH em relação ao grupo controle ($p<0,05$). Já o grupo 6-OHDA + L733,060, que não diferiu do grupo 6-OHDA ($p>0,05$), apresentou níveis reduzidos do imunocontéudo de TH quando comparado ao grupo controle, embora sem ocorrer diferença estatística entre os grupos ($p=0,0768$) (Figura 14A). Em relação à expressão das demais proteínas investigadas, a ANOVA de duas vias não revelou qualquer diferença estatística entre os grupos experimentais ($p>0,05$; Figura 14B-F).

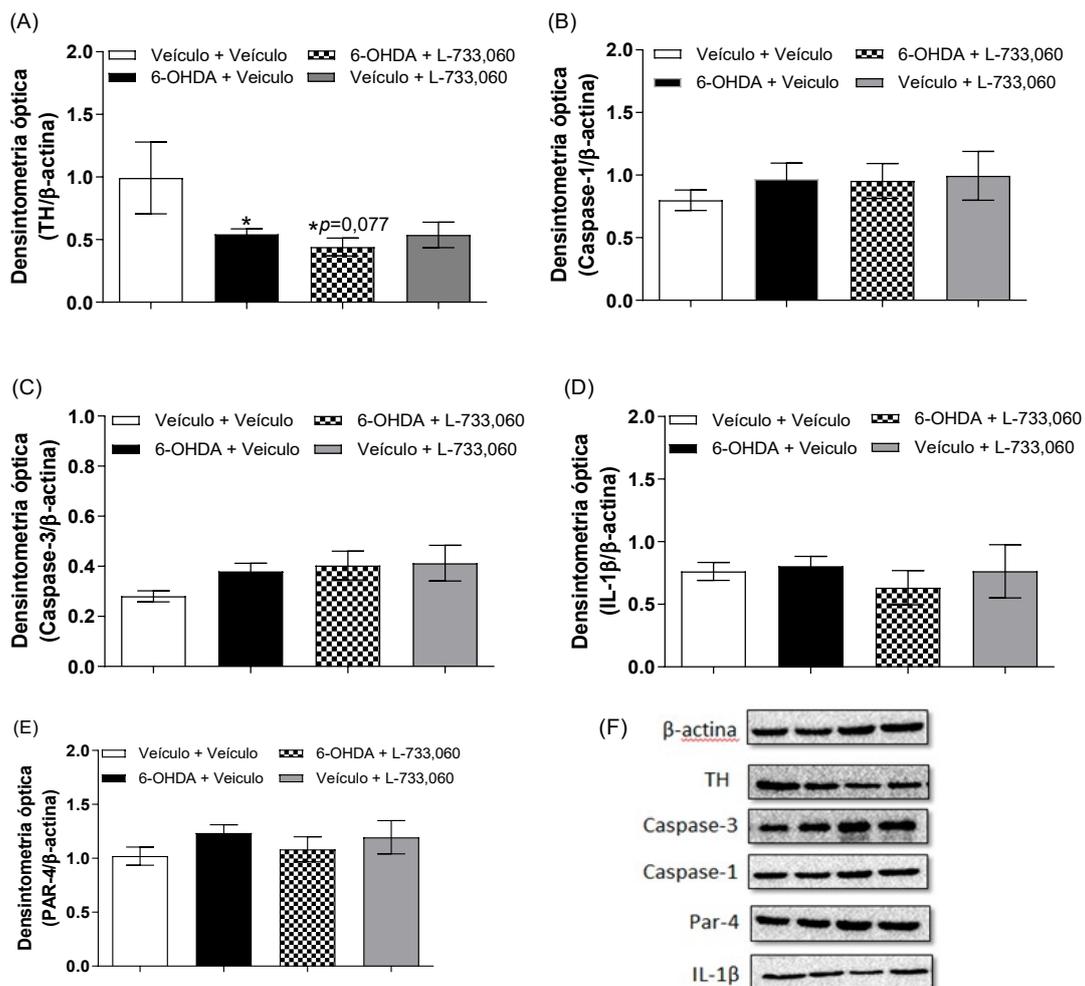


Figura 12: Densitometria da expressão da proteína TH (A), caspase-3 (B), caspase-1 (C), IL-1 β (D) e PAR-4 (E) em homogenato de estriado de ratos. (F) Imagem representativa das bandas (blots) da β -

actina e de cada proteína analisada. Os imunocorrelatos foram determinados pela razão entre a densidade óptica (D.O.) da banda das respectivas proteínas e a D.O. da banda da β -actina (utilizada como controle de carregamento). Os dados estão representados pela média \pm E.P.M. da D.O. dos blots de cada proteína avaliada em amostras obtidas a partir de um “pool” de três animais de cada grupo experimental, com dois experimentos independentes. $*p \leq 0,05$ em relação ao grupo controle (veículo).

4 DISCUSSÃO

O presente trabalho avaliou a participação dos receptores neurocinérgicos NK₁ para SP nas alterações motoras induzidas experimentalmente utilizando dois tipos distintos de modelos animais: (i) o parkinsonismo farmacológico, com o propósito de analisar a possível influência dos RNK₁ do estriado dorsal e substância nigra nas alterações motoras (catalepsia) induzidas por haloperidol, (ii) modelo de hemiparkinsonismo induzido pela infusão intraestriatal unilateral da neurotoxina 6-OHDA, com o intuito de avaliar o possível envolvimento dos RNK₁ nas alterações motoras e em parâmetros indicativos de estresse oxidativo, neuroinflamação e apoptose induzidas pela 6-OHDA.

No protocolo experimental 1, nossos resultados revelaram que o bloqueio dos receptores dopaminérgicos pelo haloperidol promoveu o comportamento de catalepsia em ratos, corroborando estudos anteriores os quais constataram que a inibição desses receptores pelo antagonista dopaminérgico leva ao comprometimento motor em roedores avaliados no teste da catalepsia, sintoma que mimetiza a hipocinesia, uma das principais alterações motoras observadas na DP (Hauber *et al.*, 2001; Del Bel *et al.*, 2002). Nosso estudo mostrou que o tratamento intraestriatal com o antagonista de RNK₁ L-733,060 diminuiu o tempo de catalepsia induzida por haloperidol nas três primeiras sessões, com perda do efeito a partir dos últimos 30min do teste. Este efeito foi mais evidente na maior dose utilizada (5nmol) do antagonista dos RNK₁. Por outro lado, quando o tratamento foi realizado por via intranigral, o antagonista dos RNK₁ não foi capaz de modificar o prejuízo motor ocasionado pelo haloperidol.

Os núcleos basais apresentam uma organização bem definida constituída por um conjunto de núcleos subcorticais com diferentes estruturas e funções, atuando como uma grande unidade funcional do sistema de controle motor (Grafton, 1990). O corpo estriado, constituído pelo caudado e putâmem, representa o local de entrada das informações nos núcleos da base recebendo importantes aferências glutamatérgicas do córtex sensório-motor. Já o globo pálido interno (GPi) e a substância negra reticulada (SNr) são os núcleos responsáveis pelas principais eferências, representando o local de saída das informações dos núcleos basais. Através de projeções GABAérgicas, a porta de saída modula a atividade de neurônios corticais e quando se trata do circuito motor, essa influência é exercida, essencialmente, em áreas motoras: área motora primária, área motora suplementar e área pré-

motora (Mello e Villares, 1997). Acredita-se que o corpo estriado seja a principal estrutura cerebral responsável pelo comportamento de catalepsia induzida por antipsicóticos (Costall e Naylor, 1972). Já a substância negra é uma estrutura que possui grande complexidade de conexões apresentando interconexões com o corpo estriado tanto aferentes (fibras estriadonigrais) como eferentes (fibras nigroestriatais) (Machado, 1998). A via nigroestriatal tem fundamental importância na modulação da retroalimentação a partir do tálamo para o córtex motor (Robbins *et al.*, 1996). O estriado representa um dos componentes dos núcleos basais com a maior diversidade de neurotransmissores, entre eles merecendo destaque a presença abundante das neurocininas como a SP. Estudos analisando a distribuição dos receptores para SP indicam que seus receptores NK₁ são encontrados em densidade relativamente elevada no estriado, porém estando em baixas concentrações na substância negra (Saffroy *et al.*, 1988; Mantyh *et al.*, 1989). Em contrapartida é na substância negra que pode ser encontrado um dos maiores níveis de SP do SNC (Arai e Emson, 1986). Terminações nervosas contendo SP fazem contato sináptico com corpos celulares de neurônios colinérgicos do estriado (Bolam *et al.*, 1986). Os RNK₁ estão presentes primariamente em interneurônios colinérgicos estriatais, embora, tenha sido encontrada a presença destes receptores em uma pequena população de neurônios estriatais não-colinérgicos (Aubrey *et al.*, 1993). Estudos *in vivo* e *in vitro* mostraram que a estimulação dos RNK₁ pela SP é capaz de aumentar a liberação de acetilcolina no estriado (Arenas *et al.*, 1991; Petitet *et al.*, 1991; Anderson *et al.*, 1993; Guzman *et al.*, 1993). Estes dados são compatíveis com a ideia de que a SP liberada localmente no estriado a partir de axônios colaterais de neurônios estriado-nigrais pode se ligar nos RNK₁ presentes em interneurônios colinérgicos estriatais, estimulando a liberação de acetilcolina.

Além disso, já é sabido que há um aumento de receptores colinérgicos na DP, bem como uma exarcebação da modulação colinérgica como consequência da degeneração de neurônios dopaminérgicos nigroestriatais (Ventura *et al.*, 2010). Assim, a manipulação local deste circuito colinérgico-neurocinérgico (SP) do estriado influencia consideravelmente o comportamento motor mediada por dopamina (Anderson *et al.*, 1995). Desta forma, nossos resultados mostraram que o bloqueio dos RNK₁ do estriado dorsal pelo L-733,060 diminui o prejuízo motor de ratos avaliados no modelo do parkinsonismo farmacológico, sugerindo que a SP endógena, via estimulação tônica dos RNK₁, parece ter papel inibitório sobre a atividade motora. Assim, podemos supor que o bloqueio dos RNK₁ do estriado dorsal estaria impedindo a estimulação colinérgica como consequência do bloqueio dopaminérgico induzido pelo haloperidol.

No protocolo experimental 2, utilizamos 3 testes comportamentais que permitem melhor avaliar a atividade motora utilizando o modelo experimental de DP induzido pela administração intraestriatal unilateral da 6-OHDA, com o comportamento dos animais sendo avaliados 7 e 14 dias após a lesão induzida pela neurotoxina. No teste da roda giratória (*rotarod*), observamos que a 6-OHDA levou a um prejuízo motor nos animais após 7 dias da infusão central da neurotoxina, com recuperação total da atividade motora após 14 dias. Fadanni em 2018 mostrou que o tratamento com a 6-OHDA não prejudica a capacidade dos animais de manter-se no cilindro em movimento aos 7 ou 14 dias após a lesão. Reforçando ainda a aceitação da hipótese de que não há prejuízos motores induzidos pela dose de 10µg de 6-OHDA no teste da roda giratória, Matheus e colaboradores (2016a) mostrou claramente que a administração de uma dose de 10µg de 6-OHDA ainda permite que o sistema se adapte e mantenha a função motora, enquanto após a administração de uma dose de 20µg de 6-OHDA, o sistema perde a capacidade de adaptação, resultando em déficit locomotor. Apesar disso, não se pode descartar completamente um possível prejuízo motor no 7º e 14º dia pelo fato de que no teste do rotarod o animal é forçado a realizar a movimentação. Adicionalmente, é importante destacar que o aprendizado gerado pela repetição do teste levou parte dos animais a descerem voluntariamente do cilindro (Fadanni, 2018). Diante disto, realizamos adicionalmente o teste do campo aberto, pois aqui temos uma avaliação da movimentação espontânea (voluntária) dos animais.

No teste do campo aberto foi observado que a infusão intraestriatal de 6-OHDA foi capaz de diminuir a movimentação periférica, total e vertical (*rearings*) dos animais avaliados tanto no 7º quanto no 14º dia. Estudos anteriores mostraram que lesões induzidas com 10µg de 6-OHDA no estriado dorsal ou 12µg na área ventral do estriado dorsal não afetam a locomoção no teste do campo aberto (Matheus *et al.*, 2016a, b), exceto aos 7 dias após a lesão (Da Silva *et al.*, 2016). Apesar da dose insuficiente para ocasionar um déficit na atividade locomotora espontânea durante a segunda e terceira semana após a lesão, os autores observaram uma redução de 60% do conteúdo dopaminérgico estriatal, além do aumento dos níveis de 5-HT estriatais na primeira semana, onde os autores também observaram déficit motor dos animais quando avaliados no teste do labirinto em cruz elevado (Da Silva *et al.*, 2016). Assim, a diminuição da atividade locomotora observada aos 7 dias da administração da 6-OHDA pode estar relacionada ao aumento dos níveis de 5-HT estriatal, tornando a primeira semana após as cirurgias um período sujeito a algum tipo de alteração motora. Em nosso trabalho, mostramos que o prejuízo da atividade locomotora espontânea induzido pela 6-OHDA foi totalmente revertido pelo tratamento repetido com o antagonista do receptor NK₁

L-733,060. Thornton e Vink (2012) mostraram que o bloqueio dos efeitos da SP com administração de um antagonista de RNK_1 é capaz de preservar a integridade da BHE, reduzir processos inflamatórios, atenuando o processo de morte celular induzida pela 6-OHDA, resultando, portanto, em uma significativa melhora na função motora. Outros trabalhos sugerem que o efeito do antagonista RNK_1 está relacionado primordialmente ao seu papel protetor contra a inflamação (Wang *et al.*, 2014; Martinez e Philipp, 2016), sugerindo ainda que a inflamação neurogênica possa contribuir significativamente para a degeneração dopaminérgica em modelos animais de DP precoce.

Nesse estudo, ainda observamos no teste do campo aberto um aumento significativo na movimentação central do grupo tratado com o antagonista de RNK_1 quando comparados ao grupo controle. Esse dado sugere um possível efeito ansiolítico promovido pelo bloqueio dos RNK_1 , já bem descritos na literatura. Apesar do campo aberto ter sido utilizado com o objetivo de avaliarmos a atividade motora, o consenso maior é de que o teste do campo aberto reflete algo muito maior do que a mera atividade motora (Stanford, 2007; Ramos, 2008; Harro, 2017), de forma que os comportamentos avaliados nesse teste dependem de emocionalidade e locomoção e, por essa razão, não é possível ao experimentador separar fatores emocionais e não-emocionais (Ramos, 2008). A SP e os RNK_1 parecem estar envolvidos em comportamentos emocionais. O trabalho de Sosulina *et al.*, (2015) aponta uma contribuição importante para a ação do tipo ansiogênica da SP na amígdala. E em contraste, o bloqueio farmacológico da SP com antagonistas dos RNK_1 foi capaz de reduzir comportamentos semelhantes aos de ansiedade e depressão. Os antagonistas RNK_1 também têm um efeito ansiolítico em várias condições em teste de ansiedade e de interação social (Kramer *et al.*, 1998; Rupniak *et al.*, 2001; Dableh *et al.*, 2005). Por isso, uma influência do antagonista RNK_1 sobre a motivação para a exploração (*drive* exploratório) poderia explicar o aumento da movimentação central observado em nosso estudo. Dados publicados anteriormente demonstraram que injeções de baixa dose de 6-OHDA podem causar alterações motoras dependendo do tempo após lesão e o teste utilizado (Branchi *et al.*, 2008; Campos *et al.*, 2013; Da Silva *et al.*, 2016), o que dá importância ao uso de ferramentas de avaliação comportamental com maior precisão. Neste sentido, optamos pela realização do terceiro teste das rotações contralaterais induzidas pela apomorfina. No teste das rotações contralaterais, os animais tratados com a 6-OHDA apresentaram um aumento significativo do comportamento rotacional unilateral após o desafio farmacológico com a apomorfina, confirmando a efetividade da lesão estriatal e da depleção do conteúdo de dopamina nessa região (Deumens *et al.*, 2002). Por sua vez, o tratamento repetido com o antagonista dos RNK_1 L-733,060

diminuiu as rotações contralaterais à lesão, revertendo totalmente o efeito promovido pela 6-OHDA. No trabalho de Li *et al.*, (2019), foi indicado diversos efeitos positivos do antagonista RNK₁ L-733,06, entre eles a diminuição da permeabilidade da BHE e formação de edema cerebral; melhora dos escores de função neurológica; inibição de citocinas pró-inflamatórias e ativação da micróglia; inibição da via apoptótica mediada por mitocôndrias e insultos oxidativos. Qualquer um desses mecanismos pode estar envolvido na proteção ocasionada pelo antagonista RNK₁ frente à depleção dopaminérgica induzida pelo 6-OHDA. Sendo o estresse oxidativo um dos principais mecanismos envolvidos nas ações da 6-OHDA (Blum *et al.*, 2001), decidimos em nosso estudo investigar os principais parâmetros do estresse oxidativo. Nossos resultados não mostraram diferenças significativas nos níveis de GSH, nitrito/nitrato (NOx) e TBARS entre os grupos pré-tratados com 6-OHDA e o grupo controle após 14 dias da administração da neurotoxina. Apenas a atividade das enzimas CAT estriatal e SOD nigral foi reduzida pela 6-OHDA em comparação ao grupo controle. Apesar de diversos estudos mostrarem a influência da 6-OHDA na geração de radicais livres, em nosso trabalho não observamos a produção de estresse oxidativo pela neurotoxina. Uma possível explicação estaria relacionada ao momento da avaliação de nossas amostras bioquímicas, uma vez que estudos mostraram uma produção de radicais livres após 24 horas da administração da toxina, com retorno aos níveis normais até 7 dias, sendo que no presente trabalho a avaliação dos principais parâmetros indicativos de estresse oxidativo foi realizada após 14 dias da administração da 6-OHDA. No trabalho de Smith e Cass (2007) os índices de estresse oxidativo no corpo estriado se apresentaram elevados dentro de 24 horas após administração de 6-OHDA, com retorno aos níveis basais após 7 dias. Esses achados são semelhantes a outros modelos de lesões cerebrais onde o estresse oxidativo ocorre logo após o insulto (Wu *et al.*, 2002; Aksenov *et al.*, 2003; Hall *et al.*, 2004). Henze *et al.*, (2005) também encontraram que EROS e ERNS são formadas no corpo estriado 25 minutos após a lesão do estriado induzida pela 6-OHDA, com retorno aos níveis basais em 7 dias. Esse aumento e subsequente queda dos níveis de espécies reativas poderiam justificar os resultados negativos observados no 14º dia de avaliação em nosso estudo. Em conjunto, esses resultados mostram a natureza transitória dos marcadores de estresse oxidativo, sugerindo que o processo de estresse oxidativo está envolvido nos estágios iniciais da perda neuronal, com possíveis mecanismos adaptativos em outros períodos.

Por outro lado, nossos resultados também mostraram que o tratamento repetido com o antagonista RNK₁ L-733,060 aumentou significativamente os níveis de SOD na região de SN. A SOD e a CAT são enzimas antioxidantes que catalisam a redução da glutathiona (Halima *et*

al., 2017). O aumento na produção de EROS provoca a exaustão dessas enzimas (Özay *et al.*, 2017). No trabalho de Li *et al.*, (2019) em um modelo de traumatismo crânio encefálico (TCE), o tratamento com o L-733,060 foi capaz de inibir a diminuição dos níveis de SOD provocada pelo TCE, resultado semelhante ao encontrado em nosso estudo, onde o tratamento com o L-733,060 reverteu a diminuição das enzimas SOD e CAT promovida pelo 6-OHDA. Além disso, em modelos *in vitro*, o tratamento com o L-733,060 reduziu a produção de EROS, diminuindo o estresse oxidativo e em última análise evitando a morte celular (Li *et al.*, 2019). Além das EROS, as ERNS, representadas por radicais NO, NO₂, ONOO⁻ contribuem para os mecanismos pró-oxidantes e dano neuronal (Halliwell, 2009). Reações com o oxigênio e água formam os ânions nitrato (NO₃⁻) e nitrito (NO₂⁻) (Valko *et al.*, 2007). O NO reage com o O₂^{•-} para formar o ONOO⁻, o qual, em seguida, aciona a morte celular por apoptose (Bonfoco *et al.*, 1995). Lipton *et al.*, (1993) sugerem que a ação neurotóxica do NO possa derivar das suas reações com O₂^{•-} para formar ONOO⁻, o qual pode ser o agente neurotóxico. O estresse nitrosativo pode conduzir a reações de nitrosilação que, por sua vez, alteram a estrutura das proteínas inibindo suas funções normais (Valko *et al.*, 2007). No presente trabalho, nossos resultados mostraram que o tratamento repetido com o antagonista dos RNK₁ (L-733,060), por si só, reduz os níveis de nitrito e nitrato (NO_x) na região de estriado dorsal e na SN, indicando um efeito protetor contra o estresse nitrosativo. L-733,060 também reduziu significativamente alguns dos principais marcadores associados ao estresse oxidativo, efeito semelhante àqueles descritos para várias outras substâncias com propriedades antioxidantes conhecidas, sugerindo assim, um potencial efeito protetor para o antagonista dos RNK₁ L-733,060 contra as ações neurotóxicas induzidas pela 6-OHDA em um modelo animal de hemiparkinsonismo. Nossos resultados sugerem que diante de condições neurotóxicas proporcionadas pela infusão central de 6-OHDA, a SP possa ser liberada estimulando os RNK₁ em células microgliais e/ou astrocítárias, ativando o fator transcricional NF-κβ que é responsável pelo recrutamento de vias relacionadas à promoção do estresse oxidativo.

Nos ensaios de WB, nossos resultados mostraram que a administração unilateral da 6-OHDA reduziu significativamente o imunoconteúdo da TH no estriado, o que caracteriza a perda de neurônios dopaminérgicos nessa região (Chu *et al.*, 2011; Thornton e Vink, 2012; Zhao *et al.*, 2016), justificando as alterações motoras apresentadas pelos animais quando avaliados nos testes comportamentais. Entretanto, a 6-OHDA não promoveu qualquer alteração nos demais imunomarcadores inflamatórios (IL-1β) e apoptóticos (Casp-1, Casp-3, BAX e PAR-4) no estriado dos animais, apesar do evidente comprometimento motor

ocasionado pela neurotoxina. Embora o modelo de hemiparkinsonismo induzido pela 6-OHDA já esteja bem descrito na literatura, cabe aqui ressaltar que dependendo da região cerebral em que a 6-OHDA é infundida, bem como do número de injeções e da dose da neurotoxina administrada, os animais apresentam diferentes tempos de progressão e severidade da lesão cerebral. Por exemplo, a infusão intranigral ou intra-feixe prosencefálico medial promove degeneração severa com perda de células nigrais acima de 90%, o que mimetiza as fases mais avançadas ou finais da DP humana. Em contrapartida, a administração intraestriatal induz degeneração mais branda, com perda de aproximadamente 70% das células nigrais, o que mimetiza as fases iniciais sintomáticas da DP. Este último modelo citado foi o escolhido no presente estudo, a fim de se investigar o potencial efeito neuroprotetor do antagonista dos RNK₁ para SP contra as alterações motoras e em marcadores de estresse oxidativo, neuroinflamatório e de apoptose induzidas pela 6-OHDA. Embora o tratamento repetido (13 dias) com L733,060 tenha revertido o prejuízo motor induzido pela neurotoxina nos animais, nossos resultados mostraram que o antagonista dos RNK₁ não foi capaz de reverter os efeitos da neurotoxina sobre o imunocontéudo da TH. Uma justificativa para este achado seria a utilização do estriado de ambos os hemisférios cerebrais para a realização das análises bioquímicas em nosso trabalho, diferentemente de outros estudos que utilizam o lado ipsilateral à infusão da 6-OHDA ao invés do lado contralateral do mesmo animal (Smith e Cass, 2007; Thornton e Vink, 2012). Kozlowski *et al.*, 2004, revelou a ocorrência de alterações compensatórias bilaterais no conteúdo de TH nigroestriatal após lesões unilaterais induzidas pela 6-OHDA em ratos. Conseqüentemente, no presente estudo, não podemos descartar eventuais alterações na expressão de marcadores inflamatórios e apoptóticos no lado contralateral à infusão de 6-OHDA na tentativa de compensar a perda de neurônios dopaminérgicos no lado ipsilateral. Considerando que as análises por WB foram realizadas com ambos os hemisférios associados, possíveis mecanismos compensatórios inter-hemisférios poderiam ter ocorridos em direções opostas, o que justificaria a falta de efeito da 6-OHDA sobre os níveis das demais proteínas analisadas (IL-1 β , Casp-1, Casp-3, BAX e PAR-4) e a impossibilidade do presente estudo de investigar a influência dos RNK₁ sobre esses imunomarcadores. Além disso, é possível que em estágios mais avançados ou em condições de degeneração severa, a SP e seus RNK₁ possam mobilizar vias de sinalização recrutando mediadores neuroinflamatórios e pró-apoptóticos, no entanto, estudos complementares são necessários, especialmente utilizando modelos experimentais que mimetizam os estágios avançados da DP.

5 CONCLUSÃO

Em conjunto, nossos resultados sugerem que os RNK₁ para SP estão envolvidos na modulação do parkinsonismo farmacológico induzido pelo haloperidol, e que o antagonista dos RNK₁ L-733,060 exerce efeitos antioxidantes e neuroprotetores contra o prejuízo motor induzido pela infusão intraestriatal da neurotoxina 6-OHDA, um modelo experimental que mimetiza as fases iniciais sintomáticas da DP.

REFERÊNCIAS

- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol.**, v. 105, p. 121-126, 1984.
- AKSENOV, M.Y.; AKSENOV, M.V.; BUTTERFIELD, D.A.; et al. Protein oxidation in the brain in Alzheimer's disease. **Neuroscience.**, v. 3, p. 373- 83, 2001.
- AKSENOV, M.Y.; HASSELROT, U.; WU, G.; et al. Temporal relationships between HIV-1 Tat-induced neuronal degeneration, OX-42 immunoreactivity, reactive astrocytosis, and protein oxidation in the rat striatum. **Brain Res**, v.987, p. 1–9, 2003.
- ANDERSON, J. J.; CHASE, T. N.; ENGBER, T. M. Substance P increases release of acetylcholine in the dorsal striatum of freely moving rats. **Brain Res.**, v. 623, p. 189-194, 1993.
- ANDERSON, J.J., RANDALL, S., CHASE T.N. The neurokinin1 receptor antagonist CP-99,994 reduces catalepsy produced by the dopamine D2 receptor antagonist raclopride: correlation with extracellular acetylcholine levels in striatum. **J Pharmacol Exp Ther.**, v. 274, p. 928-36, 1995.
- ARENAS, E.; ALBERCH, J.; PEREZ-NAVARRO, E.; et al. Neurokinin receptors differentially mediate endogenous acetylcholine release evoked by tachi tachykinins in the neostriatum. **J Neurosci.**, v. 11, p. 2332-8, 1991.
- AUBREY, J.M.; SCHULZ, M.F.; PAGLIUSI, S.; et al. Coexpression of dopamine D2 and substance P (neurokinin-1) receptor messenger RNAs by a subpopulation of cholinergic neurons in rat striatum. **Neuroscience**, v. 53, p. 417-424, 1993.
- ARAI, H.; EMSON, P. C. Regional distribution of neuropeptide K and other tachykinins (neurokinin A, neurokinin B and substance P) in rat central nervous system. **Brain Res**, v. 399, p. 240–249, 1986.
- BANNISTER, J.V.; CALABRESE, L. Assays for SOD. **Methods Biochem Anal.**, v. 32, p. 279-312, 1987.
- BARCIA, C.; SÁNCHEZ BAHILLO, A.; FERNÁNDEZ-VILLALBA, E.; et al. Evidence of active microglia in substantia nigra pars compacta of parkinsonian monkeys 1 year after MPTP exposure. **Glia**, v. 46, p. 402- 409, 2004.

BLUM, D.; TORCH, S.; LAMBERG, N.; et al. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. **Progress in Neurobiology**, v. 65, p. 135-172, 2001.

BRADFORD, M.M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRANCHI, I.; D'ANDREA, I.; ARMIDA, M.; et al. Striatal 6-OHDA lesion in mice: investigating early neurochemical changes underlying Parkinson's disease. **Behavioural Brain Research**, v. 208, p. 137-143, 2010.

BRANCHI, I.; D'ANDREA, I.; ARMIDA, M.; et al. Nonmotor symptoms in Parkinson's disease: investigating early-phase onset of behavioral dysfunction in the 6-hydroxidopaminelesioned rat model. **Journal of Neuroscience Research**, v. 86, p. 2050-2061, 2008.

BOLAM, J. P.; INGHAM, C. A.; IZZO, P. N.; et al. Substance P-containing terminals in synaptic contact with cholinergic neurons in the neostriatum and basal forebrain: A double immunocytochemical study in the rat. **Brain Res.**, v. 397, p. 279-89, 1986.

BONFOCO, E.; KRAINC, D.; ANKARCORONA, M.; et al. Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, p. 7162-7166, 1995.

CAMPOS, F. L.; CARVALHO, M. M.; CRISTOVÃO, A. C.; et al. Rodent models of Parkinson's disease: beyond the motor symptomatology. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 7. eCollection, 2013.

VENTURA, A.L.M.; ABREU, P.A.; FREITAS, R.C.C.; et al. Cholinergic system: revisiting receptors, regulation and the relationship with Alzheimer disease, schizophrenia, epilepsy and smoking. **Arch. Clin. Psychiatry (São Paulo)** v. 37, 2010.

CHAUHAN, V.S.; KLUTTZ, J.M.; BOST, K.L.; MARRIOTT, I. Prophylactic and therapeutic targeting of the neurokinin-1 receptor limits neuroinflammation in a murine model of pneumococcal meningitis. **J Immunol.**, v. 186, p. 7255-7263, 2011.

CHEN, L.W.; YUNG, K.K.; CHAN, Y.S. Neurokinin peptides and neurokinin receptors as potential therapeutic intervention targets of basal ganglia in the prevention and treatment of Parkinson's disease. **Curr Drug Targets.**, v. 5, p. 197-206, 2004.

CHU, J.M.; CHEN, L.W.; CHAN, Y.S.; YUNG, K.K. Neuroprotective effects of neurokinin receptor one in dopaminergic neurons are mediated through Akt/PKB cell signaling pathway. **Neuropharmacology**, v. 61, p. 1389-98, 2011.

COSTALL, B.; NAYLOR, R.J. On catalepsy and catatonia and the predictability of the catalepsy test for neuroleptic activity. **Psychopharmacologia**, v. 34, p. 233-241, 1974.

DA SILVA, T. P.; POLI, A.; HARA, D. B.; TAKAHASHI, R. N. Time course study of microglial and behavioral alterations induced by 6- hydroxydopamine in rats. **Neuroscience Letters**, v. 622, p. 83-87, 2016.

DABLEH, L.J.; YASHPAL, K.; ROCHFORD, J.; HENRY, J.L. Antidepressant-like effects of neurokinin receptor antagonists in the forced swim test in the rat. **Eur J Pharmacol.**, v. 507, p. 99-105, 2005.

DEL BEL, E.A.; SOUZA, A.S.; GUIMARAES, F.C.; et al. Motor effects of acute and chronic inhibition of nitric oxide synthesis in mice. **Psychopharmacology**, v.161, p. 32-7, 2002.

DEUMENS, R.; BLOKLAND, A.; PRICKAERTS, J. Modeling Parkinson's disease in rats: an evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. **Review. Exp. Neurol.**, v. 175, p. 303-317, 2002.

DUNHAM, N.W.; MIYA, T.S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. **J Am Pharm Assoc Am Pharm Assoc.**, v. 46, p. 208-209, 1957.

EHRINGER, H.; HORNYKIEWICZ, O. Verteilung von Noradrenalin und Dopamin (3-Hydroxytyramin) im Gehirn des Menschen und ihr Verhalten bei Erkrankungen des extrapyramidalen Systems. **Klin Wochenschr**, v. 38, p. 1236–1239, 1960.

ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K.H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. **Methods Enzymol.**, v. 186, p. 407-421,1990.

FADANNI, G.P. Efeitos comportamentais e neuroquímicos induzidos pela injeção bilateral de 6OHDA no estriado de ratos das linhagens SHR e SLA16. Defesa de mestrado em farmacologia, Florianópolis, 2018.

GAO, H.M.; JIANG, J.; WILSON, B.; et al. Microglial activation-mediated delayed and progressive degeneration of rat nigral dopaminergic neurons: Relevance to Parkinson's disease. **J. Neurochem.**, v.81, p. 1285-1297,2002.

GRAFTON, S.T.; MAZZIOTA, J.C.; PAHL, J.J.; et al. A comparison of neurological, metabolic, structural and genetic evaluations in persons at risk for Huntington's disease. **Annals of Neurology**, v. 28, p. 614-62, 1990.

GRAYBIEL, A.M. Neuropeptides in the basal ganglia. **Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis**, v. 64, p. 135–161, 1986.

GONZA'LEZ, H.; PACHECO, R. T-cell-mediated regulation of neuroinflammation involved in neurodegenerative diseases. **J Neuroinflammation.**, v. 11, p. 201, 2014.

GUZMAN, R. G.; KENDRICK, K. M.; EMSON, P. C. Effect of substance P on acetylcholine and dopamine release in the rat striatum: A microdialysis study. **Brain Res.**, v. 622, p. 147-154, 1993.

HALIMA, B.H.; SONIA, G.; SARRA, K.; et al. Apple cider vinegar attenuates oxidative stress and reduces the risk of obesity in high-fat-fed male Wistar rats. **J. Med. Food**, v. 21, p. 70–80, 2017.

HALL, E.D.; DETLOFF, M.R.; JOHNSON, K.; KUPINA, N.C. Peroxynitrite-mediated protein nitration and lipid peroxidation in a mouse model of traumatic brain injury. **J Neurotrauma**, v.21, p. 9–20, 2004.

HALLIWELL, B. The wanderings of a free radical. **Free Radic Biol Med**,v. 46, p.531-42, 2009.

HARRO, JAANUS. Animals, anxiety and anxiety disorders: How to measure anxiety in rodents and why. **Behavioural Brain Research**. Epub ahead of print, 2017.

HAUBER, W.; NEUSCHELER, P.; NAGEL, J.; MULLER, C.E. Catalepsy induced by a blockade of dopamine D1 or D2 receptors was reversed by a concomitant blockade of adenosine A (2A) receptors in the caudate-putamen of rats. **Eur J Neurosci**. v. 14, p. 1287-93, 2001.

HENZE, C.; EARL, C.; SAUTTER, J.; et al. Reactive oxidative and nitrogen species in the nigrostriatal system following striatal 6-hydroxydopamine lesion in rats. **Brain Res**, v. 1052, p. 97–104, 2005.

JOHNSON, M.B; YOUNG, A.D.; MARRIOTT, I. The Therapeutic Potential of Targeting Substance P/NK-1R Interactions in Inflammatory CNS Disorders. **Front. Cell. Neurosci.**, v. 10, p. 296, 2017.

KELLY, A.E. Locomotor activity and exploration. **In: Behavioural Neuroscience: a Practical Approach** vol. II. Oxford: Ed. A. Sahgal. p. 121, 1993.

KOZLOWSKI, D.A.; MILJAN, E.A.; BREMER, E.G.; et al. Quantitative analyses of GFRalpha-1 and GFRalpha-2 mRNAs and tyrosine hydroxylase protein in the nigrostriatal system reveal bilateral compensatory changes following unilateral 6-OHDA lesions in the rat. **Brain Res.**, v. 1016, p. 170-81, 2004.

KRAMER, M.S.; CUTLER, N.; FEIGHNER, J.; et.al. Distinct mechanism for antidepressant activity by blockade of central substance P receptors. **Science.**, v. 81, p.1640-5, 1998.

LEES, A.J. Unresolved issues relating to the shaking palsy on the celebration of James Parkinson's 250th birthday. **Mov Disord.**, v. 22, p. 327–34, 2007.

LI, Q.; WU, X.; YANG, Y.; et al. Tachykinin NK1 receptor antagonist L-733,060 and substance P deletion exert neuroprotection through inhibiting oxidative stress and cell death after traumatic brain injury in mice. **International journal of biochemistry and cell biology**, v. 107, p. 154-165, 2019.

LIPTON, S.A.; CHOI, V.B.; PAN, Z.H.; et al. A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitrosocompounds. **Nature**, v. 364, p. 626-632, 1993.

LORENC-KOCI, E.; WOLFARTH, S.; OSSOWSKA, K. Haloperidol-increased muscle tone in rats as a model of parkinsonian rigidity. **Exp. Brain Res.**, v. 109, p. 268-76, 1996.

MACHADO, A.B.M. Neuroanatomia Funcional. 2^a ed. São Paulo: Ed. Atheneu, 1988.

MARTINEZ, A. N.; PHILIPP, M. T. Substance P and Antagonists of the Neurokinin-1 Receptor in Neuroinflammation Associated with Infectious and Neurodegenerative Diseases of the Central Nervous System. **J Neurol Neuromedicine.**, v. 1, p. 29–36, 2016.

MANTYH, P. W.; GATES, T.; MANTYH, C. R.; MAGGIO, J. E. Autoradiographic localization and characterization of tachykinin receptor binding sites in the rat brain and peripheral tissues. **J. Neurosci.**, v. 9, p. 258-279, 1989.

MATHEUS, F. C.; RIAL, D.; REAL, J. I.; et al. Decreased synaptic plasticity in the medial prefrontal cortex underlies short-term memory deficits in 6- OHDA-lesioned rats. **Behavioural Brain Research**, v. 301, p. 43-54. 2016a.

MATHEUS, F. C.; RIAL, D.; REAL, J. I.; et al. Temporal dissociation of striatum and prefrontal cortex uncouples anhedonia and defense behaviors relevant to depression in 6-OHDA lesioned rats. **Molecular Neurobiology**, v. 53, p. 3891-3899, 2016b.

MELLO, L.E.; VILLARES, J. Neuroanatomy of the basal ganglia. **Psychiatr Clin North Am.**; v. 20, p. 691-704, 1997.

MILLER, D.B.; O'CALLAGHAN, J.P. Biomarkers of Parkinson's disease: present and future. **Metabolism**, v. 64, S40–6, 2015.

MIRANDA, K.M.; ESPEY M.G.; WINK D.A. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. **Nitric Oxide**, v. 5, p. 62-71, 2001.

OZAY, R.; TURKOGLU, E.; GURER, B.; DOLGUN, H.; et al. Does decorin protect neuronal tissue via its antioxidant and antiinflammatory activity from traumatic brain injury? An experimental study. **World Neurosurg**, v. 97, p. 407–415, 2017.

PAXINOS, G.; WATSON, C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. **Academic Press**, New York, 1986.

PENNISI, M.; CRUPI, R.; DI PAOLA, R.; et al. Inflammasomes, hormesis, and antioxidants in neuroinflammation: Role of NRLP3 in Alzheimer disease. **J Neurosci Res.**, v. 95, p. 1360-1372, 2017.

PETITET, F.; BEAUJOUAN, J.C.; SAFFROY, M.; et al. Further demonstration that [Pro9]-substance P is a potent and selective ligand of NK-1 tachykinin receptors. **J Neurochem.**, v. 56, p. 879-89, 1991.

PHANI, S.; LOIKE, J.D.; PRZEDBORSKI, S. Neurodegeneration and Inflammation in Parkinson's disease. **Parkinsonism Relat. Disord**, v. 18, p. S207–S209, 2012.

REID, M.S.; HERRERA-MARCHITZ, M.; HO"KFELT, T.; et al. Striatonigral GABA, dynorphin, substance P and neurokinin A modulation of nigrostriatal dopamine release: evidence for direct regulatory mechanisms. **Exp Brain Res**, v. 82, p. 293–303, 1990.

RAMOS, A. Animal models of anxiety: do i need multiple tests? **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 29, p. 493-498, 2008.

ROBBINS, T. W.; WEINBERGER, D.; TAYLOR, J. G.; MORRIS, R. G. Dissociating executive functions of the prefrontal cortex. **Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.**, v. 351, p. 1463–1471, 1996.

ROS-BERNAL, F.; HUNOT, S.; TRINIDAD HERRERO, M.; et al. Microglial glucocorticoid receptors play a pivotal role in regulating dopaminergic neurodegeneration in parkinsonism. **PNAS.**, v. 108, p. 6632-6637, 2011.

RUPNIAK, N.M.; CARLSON, E.J.; WEBB, J.K.; et al. Comparison of the phenotype of NK1R-/- mice with pharmacological blockade of the substance P (NK1) receptor in assays for antidepressant and anxiolytic drugs. **Behav Pharmacol.**, v. 12, p. 497-508, 2001.

SAFFROY, M.; BEAUJOUAN, J.C.; TORRENS, Y.; et al. Localization of tachykinin binding sites (NK1, NK2, NK3 ligands) in the rat brain. **Peptides**, v. 9, p. 227-241, 1988.

SCHOBER, A. Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. **Cell Tissue Res.**, v. 318, p. 215-24, 2004.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R.H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Anal Biochem.**, v. 25, p. 192-205, 1968.

SMITH, M.P.; WAYNE, A. C. Oxidative stress and dopamine depletion in an intrastriatal 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. **Neuroscience.**, v. 144, p. 1057–1066, 2007.

SOSULINA, L.; STRIPPEL, C.; ROMO-PARRA, H.; et al. Substance P excites GABAergic neurons in the mouse central amygdala through neurokinin 1 receptor activation. **J Neurophysiol.**, v. 114, p. 2500-2508, 2015.

STANFORD, S. C. The open field test: reinventing the wheel. **Journal of Psychopharmacology**, v. 21, p. 134-135, 2007.

THORNTON, E.; VINK, R. Treatment with a substance P receptor antagonist is neuroprotective in the intrastriatal 6-hydroxydopamine model of early Parkinson's disease. **PLoS One**, v. 7, p. 34138, 2012.

TUPPO, E.E.; ARIAS, H.R. The role of inflammation in Alzheimer's disease. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 37, p. 289-305, 2005.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, p. 44–84, 2007.

WALSH, R.N.; CUMMINS, R.A. The Open-Field Test: a critical review. **Psychol Bull.**, v. 83, p. 482-504, 1976.

WANG, X. Q.; CHU, C.H.; QIAN, L.; et al. Substance P Exacerbates Dopaminergic Neurodegeneration through Neurokinin-1 Receptor-Independent Activation of Microglial NADPH Oxidase. **The Journal of Neuroscience**, v. 34, p. 12490–12503, 2014.

WU, J.; HUA, Y.; KEEP, R.F.; et al. Oxidative brain injury from extravasated erythrocytes after intracerebral hemorrhage. **Brain Res**, v. 953, p.45–52, 2002.

ZHAO, Y.Z.; JIN, R.R.; YANG, W.; et al. Using Gelatin Nanoparticle Mediated Intranasal Delivery of Neuropeptide Substance P to Enhance Neuro-Recovery in Hemiparkinsonian Rats. **PLoS One**. v. 11, p. e0148848, 2016.

6 CONCLUSÃO

Nossos resultados sugerem que o sistema neurocinérgico mediado pela SP e seus receptores NK₁ está envolvido nas alterações cognitivas e oxidativas induzidas pela administração central de ETZ em um modelo animal de DA esporádica, bem como nas alterações motoras observadas nos modelos experimentais de parkinsonismo induzido por haloperidol e de hemiparkinsonismo induzido pela 6-OHDA.

REFERÊNCIAS

- ABP, Associação Brasileira de Parkinson, 2015. Disponível em: <https://www.parkinson.org.br/>. Acesso em: 30 de janeiro de 2021.
- ABRAZ, Associação Brasileira de Alzheimer, 2020. Disponível em: <https://abraz.org.br/2020/sobre-alzheimer/o-que-e-alzheimer-2/>. Acesso em: 23 de março de 2021.
- AGRAWAL, R.; TYAGI, E.; SHUKLA, R.; NATH, C. Insulin receptor signaling in rat hippocampus: a study in STZ (ICV) induced memory deficit model. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 21, p. 261–273, 2011.
- AGRAWAL, R.; TYAGI, E.; SHUKLA, R.; NATH, C. A study of brain insulin receptors, AChE activity and oxidative stress in rat model of ICV STZ induced dementia. **Neuropharmacology**, v. 56, p. 779–787, 2009.
- AGRAWAL, R.; MISHRA, B.; TYAGI, E.; NATH, C.; SHUKLA, R. Effect of curcumin on brain insulin receptors and memory functions in STZ (ICV) induced dementia model of rat. **Pharmacol Res**, v. 61, p. 247-252, 2010.
- AKSENOV, M.Y.; AKSENOV, M.V.; BUTTERFIELD, D.A.; GEDDES, J.W.; MARKESBERY, W.R. Protein oxidation in the brain in Alzheimer's disease. **Neuroscience**, v. 3, p. 373- 83, 2001.
- AKIYAMA, H.; TETSUAKI, A.; HIROMI, K.; et al. Cell mediators of inflammation in the Alzheimer's disease. **Alzheimer Dis Assoc Disord**, v. 14, p. S47-53, 2000a.
- AKIYAMA, H.; BARGER, S.; BARNUM, S.; et al. Inflammation and Alzheimer's disease. **Neurobiol Aging**, v. 21, p. 383–421, 2000b.
- ALEGRE, F.; PELEGRIN, P.; FELDSTEIN, A.E. Inflammasomes in Liver Fibrosis. **Semin Liver Dis**, v. 37, p. 119-27, 2017.
- ALLADI, S.; XUEREB, J.; BAK, T.; NESTOR, P.; KNIBB, J.; PATTERSON, K.; HODGES, J.R. Focal cortical presentations of Alzheimer's disease. **Brain**, v. 130, p. 2636–2645, 2007.
- AUTERE, J.; MOILANEN, J.S.; FINNILA, S.; et al. Mitochondrial DNA polymorphisms as risk factors for Parkinson's disease and Parkinson's disease dementia. **Human Genetics**, v. 115, p. 29–35, 2004.
- AZIMI, S.; RAUL, A. On the involvement of copper binding to the N-terminus of the amyloid Beta Peptide of Alzheimer's disease: a computational study on model systems. **Int J Alzheimers Dis.**, v. 2011, p. 539762, 2011.
- BARBOSA, M.T.; CARAMELLI, P.; MAIA, D.P.; CUNNINGHAM, M.C.; GUERRA, H.L.; LIMA-COSTA, M.F.; CARDOSO, F. Parkinsonism and Parkinson's disease in the elderly: a community-based survey in Brazil (the Bambuí study). **Mov Disord.**, v. 21, p. 800-8, 2006.

- BARCIA, C.; SÁNCHEZ BAHILLO, A.; FERNÁNDEZ-VILLALBA, E.; BAUTISTA, V.; POZA Y POZA, M.; FERNÁNDEZ-BARREIRO, A.; HIRSCH, E.C.; HERRERO, M.T. Evidence of active microglia in substantia nigra pars compacta of parkinsonian monkeys 1 year after MPTP exposure. **Glia**, v. 46, p. 402-409, 2004.
- BARILAR, J.O.; KNEZOVIC, A.; GRUNBLATT, E.; et al. Nine-month followup of the insulin receptor signalling cascade in the brain of streptozotocin rat model of sporadic Alzheimer's disease. **J Neural Transm**, v. 122, p. 565–576, 2015.
- BARNHAM, K.J.; MASTERS, C.L.; BUSH, A.I. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. **Nat Rev Drug Discov.**, v. 3, p. 205–14, 2004.
- BARON, J.C.; CHETELAT, G.; DESGRANGES, B.; PERCHEY, G.; LANDEAU, B.; DE LA SAYETTE, V.; EUSTACHE, F. In vivo mapping of gray matter loss with voxel-based morphometry in mild Alzheimer's disease. **Neuroimage**, v. 14, p. 298–309, 2001.
- BARTUS, R.T.; DEAN, R.L.; BEER, B.; LIPPA, A.S. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. **Science**, v. 217, p. 408-14, 1982.
- BAUD, V.; KARIN, M. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. **Trends Cell Biol**, v. 11, p. 372-377, 2001.
- BERGSTROM, M.; HARGREAVES, R.J.; BURNS, H.D.; et al. Human positron emission tomography studies of brain neurokinin 1 receptor occupancy by aprepitant. **Biol. Psychiatry**, v. 55, p. 1007–1012, 2004.
- BERGER, B.; GASPAR, P.; VERNEY, C. Dopaminergic innervation of the cerebral cortex: unexpected differences between rodents and primates. **Trends Neurosci.**, v. 14, p. 21-7, 1991.
- BETARBET, R.; SHERER, T. B.; GREENAMYRE, J. T. Animal models of Parkinson's disease. **Bioessays**, v. 24, p. 308-318, 2002.
- BEYREUTHER, K.; MULTHAUP, G.; MASTERS, C.L. Alzheimer's disease: genesis of amyloid. **Ciba Found Symp.**, v. 199, p. 119-31, 1996.
- BIASIBETTI, R.; ALMEIDA DOS SANTOS, J.P.; RODRIGUES, L.; et al Hippocampal changes in STZ-model of Alzheimer's disease are dependent on sex. **Behav Brain Res**, v. 316, p. 205–214, 2017.
- BIESCHKE, J.; HERBST, M.; WIGLEND, T.; et al. Small-molecule conversion of toxic oligomers to nontoxic β -sheet-rich amyloid fibrils. **Nat Chem Biol.**, v. 8, p. 93-101, 2011.
- BIRKS, J.S.; HARVEY, R. Donepezil for dementia due to Alzheimer's disease. **Cochrane Database Syst Rev**, CD001190, 2003.
- BIRKS, J.S.; CHONG, L.Y.; GRIMLEY, E. J. Rivastigmine for Alzheimer's disease. **Cochrane Database Syst Rev**, CD001191, 2015.

BLANCO, M.; NETO, A.C. Nuclear factor kappa B: a new perspective for the study of antiinflammatory drugs. **Rev. Cienc. Med**, v. 12, p. 341–349, 2003.

BLANDINI, F. Neural and Immune Mechanisms in the Pathogenesis of Parkinson's Disease. **J Neuroimmune Pharmacol**, v. 8, p. 189-201, 2013.

BLENNOW, K.; DE LEON, M. J.; ZETTERBERG, H. Alzheimer's disease. **Lancet**, v. 368, p. 387-403, 2006.

BLOCK, M.L.; LI, G.; QIN, L.; WU, X.; PEI, Z.; WANG, T.; WILSON, B.; YANG, J.; HONG, J.S. Potent regulation of microglia-derived oxidative stress and dopaminergic neuron survival: substance P vs dynorphin. **FASEB J**, v. 20, p. 251– 258, 2006.

BLUM, D.; TORCH, S.; LAMBERG, N.; NISSOU, M.; BENABID, A.; SADOUL, R.; VERNA, J. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. **Progress in Neurobiology**, v. 65, p. 135-172. 2001.

BOST, K.L. Quantification of macrophage-derived substance P receptor mRNA using competitive polymerase chain reaction. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 373, p. 219–223, 1995.

BOVÉ, J.; PERIER, C. Neurotoxin-based models of Parkinson's disease. **Neuroscience**, v. 211, p. 51-76, 2012.

BOVOLENTA, T.M.; FELICIO, A.C. How do demographic transitions and public health policies affect patients with Parkinson's disease in Brazil? **Clin Interv Aging**. v. 12, p.197-205, 2017.

BRAAK, H.; BRAAK, E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. **Acta Neuropathol**, v. 82, p. 239–259, 1991.

BRAAK, H.; DEL TREDICI, K.; RUB, U.; DE VOS, R.A.; JANSEN STEUR, E.N.; BRAAK, E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. **Neurobiol Aging**, v. 24, p. 197– 211, 2003.

BRITO, M.C.C.; FREITAS, C.A.S.L.; MESQUITA, K.O.; LIMA, G.K. Envelhecimento populacional e os desafios para a saúde pública: análise da produção científica. **Kairós Gerontologia**, v. 16, p. 161-178, 2013.

BRITSCHGI, M.; WYSS-CORAY, T. Systemic and acquired immune responses in Alzheimer's disease. **Int Rev Neurobiol**, v. 82, p. 205-33, 2007.

BROCHARD, V.; COMBADIÈRE, B.; PRIGENT, A.; LAOUAR, Y.; et al. Infiltration of CD4+ lymphocytes into the brain contributes to neurodegeneration in a mouse model of Parkinson disease. **J Clin Invest**, v. 119, p. 182–192, 2009.

BROOKMEYER, R.; GRAY, S.; KAWAS, C. Projections of Alzheimer's disease in the United States and the public health impact of delaying disease onset. **Am J Public Health**, v. 88, p. 1337–1342, 1998.

BROOKS, D.J. The role of the basal ganglia in motor control: contributions from PET. **J Neurol Sci.**, v. 128, p. 1-13, 1995.

BROWNSTEIN, M.J.; MROZ, E.A.; KIZER, J.S.; PALKOVITS, M.; LEEMAN, S.E. Regional distribution of substance P in the brain of the rat. **Brain Res.**, v. 116, p. 299–305, 1976.

BUTTERFIELD, D.A. Amyloid β -peptide (1–42)-induced oxidative stress and neurotoxicity: implications for neurodegeneration in Alzheimer's disease brain. A review, **Free Radical Research**, v. 36, p. 1307–1313, 2002.

CARTA, A.R.; PISANU, A. Modulating microglia activity with ppar-?? agonists: A promising therapy for parkinson's disease? **Neurotox. Res.**, v. 23, p. 112-123, 2013.

CASADO, A.; ENCARNACION, M.L.F.; CONCEPCION CASADO, M.; DE LA TORRE, R. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in vascular and Alzheimer dementias. **Neurochem Res.**, v. 33, p. 450-8, 2008.

CHAUHAN, V.S.; KLUTTZ, J.M.; BOST, K.L.; MARRIOTT, I. Prophylactic and therapeutic targeting of the neurokinin-1 receptor limits neuroinflammation in a murine model of pneumococcal meningitis. **J Immunol.**, v. 186, p. 7255–7263, 2011.

CHAUHAN, V.S.; STERKA, D.G. Jr.; GRAY, D.L.; BOST, K.L.; MARRIOTT, I. Neurogenic exacerbation of microglial and astrocyte responses to *Neisseria meningitidis* and *Borrelia burgdorferi*. **J. Immunol.**, v. 180, p. 8241–8249, 2008.

CHEN-PLOTKIN, A.S.; HU, W.T.; SIDEROWF, A.; et al. Plasma epidermal growth factor levels predict cognitive decline in Parkinson disease. **Ann Neurol**, v. 69, p. 655–663, 2011.

CHEN, L.W.; GUAN, Z.L.; DING, Y.Q. Mesencephalic dopaminergic neurons expressing neuromedin K receptor (NK3): a double immunocytochemical study in rat brain. **Brain Res.**, v. 780, p. 150-154, 1998.

CHEN, L.W.; YUNG, K.K.; CHAN, Y.S. Neurokinin peptides and neurokinin receptors as potential therapeutic intervention targets of basal ganglia in the prevention and treatment of Parkinson's disease. **Curr Drug Targets.**, v. 5, p. 197-206, 2004.

CHEN, Z.; ZHONG, C. Decoding Alzheimer's disease from perturbed cerebral glucose metabolism: implications for diagnostic and therapeutic strategies. **Prog Neurobiol**, v. 108, p. 21–43, 2013.

CHEN, Y.; DENG, Y.; ZHANG, B.; GONG, C-X Deregulation of brain insulin signaling in Alzheimer's disease. **Neurosci Bull**, v. 30, p. 282–294, 2014a.

CHERNOVA, I.; LAI, J.P.; LI, H.; et al. Substance P (SP) enhances CCL5-induced chemotaxis and intracellular signaling in human monocytes, which express the truncated neurokinin-1 receptor (NK1R). **J. Leukoc. Biol.**, v. 85, p. 154–164, 2009.

CHOI, D.; SUK, K. Glial reaction in Parkinson's diseases: inflammatory activation signaling of glia as a potential therapeutic target. **Cur Sig Transd Ther**, v. 2, p. 77-90, 2007.

CHUNG, C.P.; SCHMIDT, D.; STEIN, C.M.; MORROW, J.D.; SALOMON, R.M. Increased oxidative stress in patients with depression and its relationship to treatment. **Psychiatry Res.**, v. 206, p. 213-6, 2013.

CIOFFI, F.; ADAM, R.H.I.; BROERSEN, K. Molecular Mechanisms and Genetics of Oxidative Stress in Alzheimer's Disease. **J Alzheimers Dis.**, v. 72, p. 981-1017, 2019.

COLLUCCI, C. Cirurgia cerebral beneficia memória de doente epiléptico. Equilíbrio e saúde. **FOLHA DE S. PAULO**, 2009.

CORRIGAN, F.; VINK, R.; TURNER, R.J. Inflammation in acute CNS injury: a focus on the role of substance P. **Br J Pharmacol**, v. 173, p. 703–15, 2016.

COUTURIER, J.; STANCU, I.C.; SCHAKAMN, O. et al. Activation of phagocytic activity in astrocytes by reduced expression of the inflammasome component ASC and its implication in a mouse model of Alzheimer disease. **J Neuroinflammation**, v.13, p. 20, 2016.

COYLE, J.T.; PRINCE, D.L.; DELONG, M.R. Alzheimer's disease: a disorder of cortical cholinergic innervation. **Science**, v. 219, p. 1184-90, 1983.

CRADDOCK, T.J.; TUSZYNSKI, J.A.; CHOPRA, D.; CASEY, N.; GOLDSTEIN, L.E.; HAMEROFF, S.R.; TANZI, R.E. The zinc dyshomeostasis hypothesis of Alzheimer's disease. **PLoS One.**, v. 7, e33552, 2012.

CUELLO, A. C.; KANAZAWA, I. The distribution of the substance P-immunoreactive fibres in the rat nervous system. **J. comp. Neurol.**, v. 178, p. 129-156, 1978.

DANYSZ, W.; PARSONS, C.G.; MOBIUS, H.J.; STOFFLER, A.; QUACK, G. Neuroprotective and symptomatological action of memantine relevant for Alzheimer's disease--a unified glutamatergic hypothesis on the mechanism of action. **Neurotox Res.**, v. 2, p. 85-97, 2000.

DECRESSAC, M.; MATTSSON, B.; LUNDBLAD, M.; et al. Progressive neurodegenerative and behavioural changes induced by AAV-mediated overexpression of α -synuclein in midbrain dopamine neurons. **Neurobiol Dis.**, v. 45, p. 939-53, 2012.

DE LAU, L.M.; BRETELER, M.M. Epidemiology of Parkinson's disease. **Lancet Neurol**, v. 5, p. 525–535, 2006.

DE FELICE, F.G.; LOURENCO, M.V.; FERREIRA, S.T. How does brain insulin resistance develop in Alzheimer's disease? **Alzheimers Dement**, v. 10, S26–S32, 2014.

DI CIERO MIRANDA, M.; DE BRUIN, V.M.; VALE, M.R.; VIANA, G.S. Lipid peroxidation and nitrite plus nitrate levels in brain tissue from patients with Alzheimer's disease. **Gerontology**, v.46, p. 179-84, 2000.

DI DOMENICO, F.; PUPO, G.; GIRALDO, E.; BADIA, M.C.; MONLLOR, P.; et al. Oxidative signature of cerebrospinal fluid from mild cognitive impairment and Alzheimer disease patients. **Free Radic Biol Med.**, v. 91, p. 1-9, 2016.

DI FABIO, R.; ALVARO, G.; BRAGGIO, S.; et al. Identification, biological characterization and pharmacophoric analysis of a new potent and selective NK1 receptor antagonist clinical candidate. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 21, p. 6264–6273, 2013.

DORSEY, E.R.; CONSTANTINESCU, R.; THOMPSON, J.P.; et. al. Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. **Neurology**, v. 6, p. 384-6, 2007.

DOUGLAS, S.D.; CNAAN, A.; LYNCH, K G.; et al. Elevated substance P levels in HIV-infected women in comparison to HIV-negative women. **AIDS Res. Hum. Retroviruses**, v. 24, p. 375–378, 2008a.

DOUGLAS, S.D.; HO, W.Z.; GETTES, D.R.; et al. Elevated substance P levels in HIV-infected men. **AIDS**, v. 15, p. 2043–2045, 2001.

DOUGLAS, S.D.; LAI, J.P.; TULUC, F.; et al. Neurokinin-1 receptor expression and function in human macrophages and brain: perspective on the role in HIV neuropathogenesis. **Ann. N Y Acad. Sci.**, v. 1144, p. 90–96, 2008b.

DUBOIS, B.; FELDMAN, H.H.; JACOVA, C.; et al. Advancing research diagnostic criteria for Alzheimer's disease: The IWG-2 criteria. **Lancet Neurol**, v. 13, p. 614 –629, 2014.

DUTY, S.; JENNER, P. Animal models of Parkinson's disease: a source of novel treatments and clues to the cause of the disease. **British Journal of Pharmacology**, v. 164, p. 1357-1391, 2011.

DUYCKAERTS, C.; DELATOUR, B.; POTIER, M.C. Classification and basic pathology of Alzheimer disease. **Acta Neuropathol**, v. 118, p. 5–36, 2009.

EBNER, K.; SINGEWALD, N. The role of substance P in stress and anxiety responses. **Amino Acids**, v. 31, p. 251–272, 2006.

EHRINGER, H.; HORNYKIEWICZ, O. Verteilung von Noradrenalin und Dopamin (3-Hydroxytyramin) im Gehirn des Menschen und ihr Verhalten bei Erkrankungen des extrapyramidalen Systems. **Klin Wochenschr**, v. 38, p. 1236–1239, 1960.

'EPISCOPO, F.L.; TIROLO, C.; TESTA, N.; CANIGLIA, S.; MORALE, M.C.; MARCHETTI, B. Reactive astrocytes are key players in nigrostriatal dopaminergic neurorepair in the MPTP mouse model of Parkinson's disease: focus on endogenous neurorestoration. **Curr. Aging Sci.**, v. 6, p. 45–55, 2013.

ERKKINEN, M.G.; KIM, M.O.; GESCHWIND, M.D. Clinical Neurology and Epidemiology of the Major Neurodegenerative Diseases. **Cold Spring Harb Perspect Biol.**, v. 10, a033118, 2018.

ETEMAD, S.; ZAMIN, R.M.; RUITENBERG, M.J.; FILGUEIRA, L. A novel in vitro human microglia model: Characterization of human monocyte-derived microglia. **J Neurosci Methods.**, v. 209, p. 79-89, 2012.

EVANS, D.A.; FUNKENSTEIN, H.H.; ALBERT, M.S.; SVHERR, P.A.; COOK, N.R.; CHOWN, M.J.; HEBERT, L.E.; HENNEKENS, C.H.; TAYLOR, J.O. Prevalence of Alzheimer's disease in a community population of older persons. Higher than previously reported. **JAMA**, v. 262, p. 2551–2556. 1989.

FALCO, A.; CUKIERMAN, D.S.; HAUSER-DAVIS, R.A.; REY, N.A. Alzheimer's disease hypotheses and treatment perspectives. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 39, 2016.

FANG, D.; ZHANG, Z.; LI, H.; YU, Q.; DOUGLAS, J.T.; BRATASZ, A.; KUPPUSAMY, P.; YAN, S.S. Increased Electron Paramagnetic Resonance Signal Correlates with Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in an Alzheimer's disease Mouse Brain. **J Alzheimers Dis.**, v. 51, p. 571-80, 2016.

FASANO, A.; DANIELE, A.; ALBANESE, A. Treatment of motor and non-motor features of Parkinson's disease with deep brain stimulation. **Lancet Neurol**, v. 11, p. 429–442, 2012.

FAVERO, G.; FRANCESCHETTI, L.; BONOMINI, F.; RODELLA, L.F. Melatonin as an AntiInflammatory Agent Modulating Inflammasome Activation. **Int J Endocrinol.**, p. 1835195, 2017.

FENINI, G.; CONTASSOT, E.; FRENCH, L.E. Potential of IL-1, IL-18 and Inflammasome Inhibition for the Treatment of Inflammatory Skin Diseases. **Front Pharmacol**, v. 8, p. 278, 2017.

FERREIRA, SH. Hiperalgesia inflamatórial, óxido nítrico y control periférico del dolor. **Rev Latino Americana de Dolor**, v. 12, p. 6-17, 1995.

FERREIRA, S.T.; CLARKE, J.R.; BOMFIM, T.R.; DE FELICE, F.G. Inflammation, defective insulin signaling, and neuronal dysfunction in Alzheimer's disease. **Alzheimers Dement.**, v. 10, S76-83, 2014.

FERRO, M. M.; BELLISSIMO, M. I.; ANSELMO-FRANCI, J. A.; ANGELLUCCI, M. E.; CANTERAS, N. S.; DA CUNHA, C. Comparison of bilaterally 6-OHDA and MPTP-lesioned rats as models of the early phase of Parkinson's disease: histological, neurochemical, motor and memory alterations. **J. Neurosci. Meth.**, v. 148, p. 78-87, 2005.

FOLLETT, K.A.; WEAVER, F.M.; STERN, M.; et al. Pallidal versus subthalamic deep-brain stimulation for Parkinson's disease. **N Engl J Med**, v. 362, p. 2077–2091, 2010.

FORBES, D.; FORBES, S.C.; BLAKE, C.M.; THIESSEN, E.J.; FORBES, S. Exercise programs for people with dementia. **Cochrane Database Syst Rev**, CD006489, 2015.

FRANCO, D.G. Nuclear transcription factor kappa B in central nervous system? From physiological to pathological. **Rev. Biologia.**, v. 4, p. 35-39, 2010.

FURUTA, T.; KOYANO, K.; TOMIAKO, R.; YANAGAWA, Y.; KANEKO, T. GABAergic basal forebrain neurons that express receptor for neurokinin B and send axons to the cerebral cortex. **J.Comp. Neurol.**, v. 473, p. 43-58, 2004.

- GADDUM, J.H.; SCHILD, H. Depressor substances in extracts of intestine. **The Journal of Physiology**, v. 83, p. 1–14, 1934.
- GALIMBERTI, D.; SCHOONENBOOM, N.; SCARPINI, E.; SCHELTENS, P. Dutch-Italian Alzheimer Research Group. Chemokines in serum and cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients. **Ann Neurol.**, v. 53, p. 547-8, 2003.
- GAO, H.M.; JIANG, J.; WILSON, B.; ZHANG, W.; HONG, J.S.; LIU, B. Microglial activation-mediated delayed and progressive degeneration of rat nigral dopaminergic neurons: Relevance to Parkinson's disease. **J. Neurochem.**, v.81, p. 1285-1297,2002.
- GASSER, T.; HARDY, J.; MIZUNO, Y. Milestones in PD genetics. **Mov Disord**, v. 26, p. 1042–1048, 2011.
- GERFEN, C.R. Basal ganglia. In: Paxinos, G. The rat nervous system. 3ª edição, Australia: **Academic press**, p. 455-508, 2004.
- GLINKA, Y.; GASSEN, M.; YOUDIM, M. B. Mechanism of 6- hydroxydopamine neurotoxicity. **Journal of Neural Transmission. Supplementum**, v. 50, p. 55-66. 1997.
- GONZA´LEZ, H.; PACHECO, R. T-cell-mediated regulation of neuroinflammation involved in neurodegenerative diseases. **J Neuroinflammation.**, v. 11, p. 201, 2014.
- GORNO-TEMPINI, M.L.; HILLIS, A.E.; WEINTRAUB, S.; et al. Classification of primary progressive aphasia and its variants. **Neurology**, v. 76, p. 1006–1014, 2011.
- GRAFF, M.J.; ADANG, E.M.; VERNOOIJ-DASSEN, M.J.; DEKKER, J.; JONSSON, L.; THIJSEN, M.; HOEFNAGELS, W.H.; RIKKERT, M.G. Community occupational therapy for older patients with dementia and their care givers: Cost effectiveness study. **BMJ**, v. 336, p. 134 –138, 2008.
- GRAYBIEL, A.M. Neuropeptides in the basal ganglia. **Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis**, v. 64, p. 135–161, 1986.
- GREENAMYRE, J.T.; MARAGOS, W.F.; ALBIN, R.L.; PENNEY, J.B.; YOUNG, A.B. Glutamate transmission and toxicity in Alzheimer's disease. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 12, p. 421-30, 1988.
- GREENAMYRE, J.T.; YOUNG, A.B. Excitatory amino acids and Alzheimer's disease. **Neurobiol Aging.**, v. 10, p. 593-602, 1989.
- GREENMAN, I.C.; GOMEZ, E.; MOORE, C.E.; HERBERT, T.P. Distinct glucose-dependent stress responses revealed by translational profiling in pancreatic beta-cells. **J Endocrinol.**, v.192, p. 179-87, 2007.
- GROSS, K.J.; POTHOUKAKIS, C. Role of neuropeptides in inflammatory bowel disease. **Inflamm. Bowel Dis.**, v. 13, p. 918–932, 2007.
- GRUNBLATT, E.; HOYER, S.; RIEDER, P. Gene expression profile in streptozotocin rat model for sporadic alzheimer's disease. **J Neural Transm**, v. 111, p. 367-386, 2004.

GRUNBLATT, E.; SALKOVIC-PETRISIC, M.; OSMANOVIC, J.; RIEDERER, P.; HOYER, S. Brain insulin system dysfunction in streptozotocin intracerebroventricularly treated rats generates hyperphosphorylated tau protein. **J Neurochem**, v. 101, p. 757-770, 2007.

GURIDI, J.; RODRIGUEZ-OROZ, M.C.; ALEGRE, M.; OBESO, J.A. Hardware complications in deep brain stimulation: Electrode impedance and loss of clinical benefit. **Parkinsonism Relat Disord**, v. 18, p. 765–769, 2012.

HAASS, C.; SCHOSSMACHER, M.G.; HUNG, A.Y.; et al. Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. **Nature**, v. 359, p. 322-5, 1992.

HAAXMA, C.A.; BLOEM, B.R.; BOM, G.F.; et al. Gender differences in Parkinson's disease. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 78, p. 819–824, 2007.

HAIM, L.; BEN SAUVAGE, M.C.; CEYZÉRIAT, K.; CURTIN, J.F. Elusive roles for reactive astrocytes in neurodegenerative diseases. **Frontier in Cell Neurosci.**, v. 9, p. 1-27, 2015.

HAGAN, R. M.; BERESFORD, I. J.; STABLES, J.; DUPERE, J.; STUBBS, C. M.; ELLIOTT, P. J.; SHELDRIK, R. L.; CHOLLET, A.; KAWASHIMA, E.; MCELROY, A. B.; WARD, P. Characterisation, CNS distribution and function of NK2 receptors studied using potent NK2 receptor antagonists. **Regul. Pept.**, v. 46, p. 9-19, 1993.

HALIMA, B.H.; SONIA, G.; SARRA, K.; HOUDA, B.J.; FETHI, B.S.; ABDALLAH, A. Apple cider vinegar attenuates oxidative stress and reduces the risk of obesity in high-fat-fed male Wistar rats. **J. Med. Food**, v. 21, p. 70–80, 2017.

HALLIWELL, B. Free radicals, proteins and DNA: oxidative damage versus redox regulation. **Biochem Soc Trans**, v. 24, p. 1023-7, 1996.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M. The definition and measurement of antioxidants in biological systems. **Free Radic Biol Med.**, v. 18, p. 125-6, 1995.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M. Lipid peroxidation in brain homogenates: the role of iron and hydroxyl radicals. **J Neurochem**, v. 69, p. 1330-1, 1997.

HARDY, J.A.; HIGGINS, G.A. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. **Science**, v. 256, p. 184-5, 1992.

HASSANZADEH, G.; HOSSEINI, A.; PASBAKHS, P.; AKBARI, M.; GHAFFARPOUR, M.; TAKZARE, N.; ZAHMATKESH, M. Trimetazidine prevents oxidative changes induced in a rat model of sporadic type of Alzheimer's disease. **Acta Med Iran**, v.53, p. 17-24, 2015.

HASTINGS, T.G.; LEWIS, D.A.; ZIGMOND, M.J. Reactive dopamine metabolites and neurotoxicity: implications for Parkinson's disease. **Adv Exp Med Biol**, v. 387, p. 97–106, 1996.

HASTINGS, T.G.; ZIGMOND, M.J. Loss of dopaminergic neurons in parkinsonism: possible role of reactive dopamine metabolites. **J Neural Transm.**, v. 49, p.103–110, 1997.

HEALY, D.G.; FALCHI, M.; O'SULLIVAN, S.S.; et al. Phenotype, genotype, and worldwide genetic penetrance of LRRK2-associated Parkinson's disease: A case-control study. **Lancet Neurol**, v. 7, p. 583–590, 2008.

HEEMELS, M.T. Neurodegenerative diseases. **Nature.**, v. 539, p.179, 2016.

HENEKA, M.T.; CARSON, M.J.; EL KHOURY, J.; et. al. Neuroinflammation in Alzheimer's disease. **Lancet Neurol.**, v.14, p. 388-405, 2015b.

HENEKA, M.T.; GOLENBOCK, D.T.; LATZ, E. Innate immunity in Alzheimer's disease. **Nat Immunol.**, v.16, p. 229-36, 2015a.

HENEKA, M.T.; O'BANION, M.K.J. **Neuroimmunol.**, v. 184, p. 69, 2007.

HENEKA, M.T.; WIESINGER, H.; DUMITRESCU-OZIMEK, L. Neuronal and glial coexpression of argininosuccinate synthetase and inducible nitric oxide synthase in Alzheimer disease. **J Neuropathol Exp Neurol.**, v.60, p. 906-16, 2001.

HENSLEY, K.; HALL, N.; SUBRAMANIAM, R.; et al. Brain regional correspondence between Alzheimer's disease histopathology and biomarkers of protein oxidation. **J Neurochem.**, v.65, p. 2146-56, 1995.

HIRSCH, E.C.; VYAS, S.; EPHANE HUNOT, S. Neuroinflammation in Parkinson's disease. **Park. Realt. Disord.**, v. 18, p. S210–S212, 2012.

HOLMES, A.; HEILIG, M.; RUPNIAK, N.M.; STECKLER, T.; GRIEBEL, G. Neuropeptide systems as novel therapeutic targets for depression and anxiety disorders. **TRENDS in pharmacological sciences**, v. 24, p. 580-588, 2003.

HONG, H.; KIM, B.S.; IM, H. Pathophysiological Role of Neuroinflammation in Neurodegenerative Diseases and Psychiatric Disorders. **Int. Neurorol. J.**, v. 1, p. 2– 7, 2016.

HORNYKIEWICZ, O., BERNHEIMER, H.; BIRKMAYER, W.; JELLINGER, K.; SEITELBERGER. Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington. Clinical, morphological and neurochemical correlations. **J Neurol Sci.**, v. 20, p. 415-55, 1973.

HOYER, S. Memory function and brain glucose metabolism. **Pharmacopsychiatry**, v. 36, S62-7, 2003.

HOWARD, R.; MCSHANE, R.; LINDESAY, J.; et al. Donepezil and memantine for moderate-to-severe Alzheimer's disease. **N Engl J Med**, v. 366, p. 893–903, 2012.

HUNOT, S.; BRUGG, B.; RICARD, D.; MICHEL, P.P.; MURIEL, M.P.; RUBERG, M.; FAUCHEUX, B.A.; AGID, Y.; HIRSCH, E.C. Nuclear translocation of NF-kappaB is increased in dopaminergic neurons of patients with parkinson disease. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 94, p. 7531–7536, 1997.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2018. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/>. Acesso em: 15 de fevereiro de 2021.

- ISHII, K.; KAWACHI, T.; SASAKI, H.; KONG, A.K.; FUKUDA, T.; KOJIMA, Y.; MORI, E. Voxel-based morphometric comparison between early- and late-onset mild Alzheimer's disease and assessment of diagnostic performance of Z score images. **AJNR Am J Neuroradiol**, v. 26, p. 333–340, 2005.
- ISLAM, M.T. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction-linked neurodegenerative disorders. **Neurol Res.**, v. 39, p. 73–82, 2017.
- ISOBE, C.; ABE, T.; TERAYAMA, Y. Levels of reduced and oxidized coenzyme Q-10 and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in the cerebrospinal fluid of patients with living Parkinson's disease demonstrate that mitochondrial oxidative damage and/or oxidative DNA damage contributes to the neurodegenerative process. **Neurosci Lett.**, v. 469, p. 159-63, 2010.
- JANKOVIC, J.; KAPADIA, A.S. Functional decline in Parkinson disease. **Arch Neurol**, v. 58, p. 1611–1615, 2001.
- JANKOVIC, J.; MCDERMOTT, M.; CARTER, J.; et. al. Variable expression of Parkinson's disease: A base-line analysis of the DATATOP cohort. The Parkinson Study Group. **Neurology**, v. 40, p.1529–1534, 1990.
- JANN, M.W.; SHIRLEY, K.R.; SMALL, G.W. **Clin. Pharmacokinet.**, v. 41, p. 719, 2002.
- JARVIK, G.; LARSON, E.B.; GODDARD, K.; SCHELLENBERG, G.D.; WIJSMAN, E.M. Influence of apolipoprotein E genotype on the transmission of Alzheimer disease in a community-based sample. **Am J Hum Genet**, v. 58, p. 191–200, 1996.
- JETTE, N.; MAXWELL, C.J.; FIEST, K.M.; HOGAN, D.B. Systematic reviews and meta-analyses of the incidence and prevalence of dementia and its commoner neurodegenerative causes. **Can J Neurol Sci.**, v. 43, p. S1–2, 2016.
- JOHNSON, M.B; YOUNG, A.D.; MARRIOTT, I. The Therapeutic Potential of Targeting Substance P/NK-1R Interactions in Inflammatory CNS Disorders. **Front. Cell. Neurosci.**, v. 10, p. 296, 2017.
- JORDAN-SCIUTTO, K.; BOWSER, R. Alzheimer's disease and brain development: common molecular pathways. **Front Biosci.**, v. 3, d100-d112, 1998.
- JORN, A.F.; JOLLEY, D. The incidence of dementia: A metaanalysis. **Neurology**, v. 51, p. 728 –733, 1998.
- JOVANOVIC, S.V.; CLEMENTS, D.; MACLEOD, K. Biomarkers of oxidative stress are significantly elevated in Down syndrome. **Free Radic Biol Med.**, v. 25, p. 1044-8, 1998.
- KANDEL, E.R. Principles of neural science. 4^a edição. London: **Appleton & Lange**, 2000.
- KALIA, L.V.; LANG, A.E. Parkinson disease in 2015: Evolving basic, pathological and clinical concepts in PD. **Nat Rev Neurol**, v. 12, p.65–66, 2016.

- KANG, J.H.; IRWIN, D.J.; CHEN-PLOTKIN, A.S.; et al. Association of cerebrospinal fluid b-amyloid 1–42, T-tau, P-tau181, and a-synuclein levels with clinical features of drug-naive patients with early Parkinson disease. **JAMA Neurol**, v. 70, p. 1277–1287, 2013.
- KANTARCI, K.; AVULA, R.; SENJEM, M.L.; SAMIKOGLU, A.R.; ZHANG, B.; et al. Dementia with Lewy bodies and Alzheimer disease: Neurodegenerative patterns characterized by DTI. **Neurology**, v. 74, p. 1814–1821, 2010.
- KÁSA, P.; RAKONCZAY, Z.; GULYA, K. The cholinergic system in Alzheimer's disease. **Prog Neurobiol.**, v. 52, p. 511-35, 1997.
- KATSNELSON, A.; DE STROOPER, B.; ZOGHBI, H.Y. Neurodegeneration: from cellular concepts to clinical applications. **Sci Transl Med.**, v. 8, p. 364ps18, 2016.
- KAWANAKA, N.; YAMAMURA, M.; AITA, T.; et al. CD14+, CD16+ blood monocytes and joint inflammation in rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 46, p. 2578- 2586, 2002.
- KENNEDY, P.G.; RODGERS, J.; JENNINGS, F.W.; MURRAY, M.; LEEMAN, S.E; BURKE, J.M. A substance P antagonist, RP-67,580, ameliorates a mouse meningoencephalitic response to *Trypanosoma brucei brucei*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 94, p. 4167–4170, 1997.
- KIM, W.G.; MOHNEY, R.P.; WILSON, B.; JEOHN, G.H.; LIU, B.; HONG, J.S. Regional difference in susceptibility to lipopolysaccharide-induced neurotoxicity in the rat brain: role of microglia. **J Neurosci**, v. 20, p. 6309 –6316, 2000.
- KNEZOVIC, A.; OSMANOVIC-BARILAR, J.; CURLIN, M.; et al. Staging of cognitive deficits and neuropathological and ultrastructural changes in streptozotocin-induced rat model of Alzheimer's disease. **J Neural Transm**, v. 122, p. 577–592, 2015.
- KOWALL, N.W.; QUIGLEY, B.J.Jr.; KRAUSE, J.E.; LU, F.; KOSOFISKY, B.E.; FERRANTE, R.J. Substance P and substance P receptor histochemistry in human neurodegenerative diseases. **Regul. Pept.**, v. 46, p.174–185, 1993.
- KRAMER, M.S.; CUTLER, N.; FEIGHNER, J.; et.al. Distinct mechanism for antidepressant activity by blockade of central substance P receptors. **Science.**, v. 81, p.1640-5, 1998.
- KRASKA, A.; SANTIN, M.D.; DORIEUX, O.; et al. In vivo cross-sectional characterization of cerebral alterations induced by intracerebroventricular administration of streptozotocin. **PLoS One**, v. 7, e46196, 2012.
- LAMBERT, M.P.; BARLOW, A.K.; CHROMY, B.A.; et al. Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. **Proc Natl Acad Sci**, v. 95, p. 6448-53, 1998.
- LANNERT, H.; HOYER, S. Intracerebroventricular administration of streptozotocin causes long-term diminutions in learning and memory abilities and in cerebral energy metabolism in adult rats. **Behav. Neurosci.**, v. 112, p. 1199–1208, 1998.

- LAPENNA, D.; DE GIOIA, S.; CIOFANI, G.; MEZZETTI, A.; UCCHINO, S.; CALAFIORE, A.M.; NAPOLITANO, A.M.; DI ILIO, C.; CUCCURULLO, F. Glutathione-related antioxidant defenses in human atherosclerotic plaques. **Circulation.**, v. 97, p. 1930-4, 1998.
- LEE, S.E.; RABINOVICI, G.D.; MAYO, M.C.; et al. Clinicopathological correlations in corticobasal degeneration. **Ann Neurol**, v. 70, p. 327–340, 2011.
- LEES, A.J. Unresolved issues relating to the shaking palsy on the celebration of James Parkinson's 250th birthday. **Mov Disord.**, v. 22, p. 327–34, 2007.
- LEIVA, J.D; TIRAPU-USTÁRROZ, J. Mental Disorders and Disconnection Syndromes: an Approach from Neuropsychology. Cuadernos de Neuropsicología/ **Panamerican Journal of Neuropsychology**, v.11, p. 42-55, 2017.
- LEONARD, A. V.; VINK, R. The effect of an NK1 receptor antagonist on blood spinal cord barrier permeability following balloon compression-induced spinal cord injury. **Acta Neurochir. Suppl.**, v. 118, p. 303-306, 2013.
- LESTER-COLL, N.; RIVERA, E.J.; SOSCIA, S.J.; DOIRON, K.; WANDS, J.R.; et al. Intracerebral streptozotocin model of type 3 diabetes: relevance to sporadic Alzheimer's disease. **J Alzheimers Dis**, v. 9, p. 13–33, 2006.
- LEWIS, K.M.; TURNER, R.J.; VINK, R. Blocking neurogenic inflammation for the treatment of acute disorders of the central nervous system. **Int J Inflamm.**, 2013:578480, 2013.
- LIAO, Y.; LIU, P.; GUO, F.; ZHANG, Z.Y.; ZHANG, Z. Oxidative burst of circulating neutrophils following traumatic brain injury in human. **PloS one**, v. 8, e68963, 2013.
- LIN, M.T.; BEAL, M.F. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. **Nature**. v. 443, p. 787–95, 2006.
- LIU, B.; HONG, J.S. Role of microglia in inflammation-mediated neurodegenerative diseases: mechanisms and strategies for therapeutic intervention. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 304, p. 1-7, 2003.
- LIU, H.; CAO, Y; BASBAUM, A.I.; MAZARATI, AM.; SANKAR, R.; WASTERLAIN, C.G. Resistance to excitotoxin induced seizures and neuronal death in mice lacking the preprotachykinin A gene. **Proceedings of the Nacional Academy Sciences USA**, v. 96, n.21, p. 12096-12101, 1999.
- LIU, L.; CHAN, C. The role of inflammasome in Alzheimer's disease. **Ageing Res Rev.**, v. 15, p. 6-15, 2014.
- LIU, Y.; NAKAHARA, T.; MIYAKOSHI, J.; HU, D.-L.; NAKANE, A.; ABE, Y. Nuclear Accumulation and Activation of Nuclear Factor κ B after Split-dose Irradiation in LS174T Cells. **J. Radiat. Res.**, v. 48, p. 13–20, 2007.
- LIMA-COSTA, M.F. Estudo de Coorte de Idosos de Bambuí (1997-2008). **Cad. Saúde Pública**, v. 27, S324-S325, 2011.

LI, R.; YANG, L.; LINDHOLM, K.; KONISHI, Y.; YUE, X.; HAMPEL, H.; ZHANG, D.; SHEN, Y. Tumor necrosis factor death receptor signaling cascade is required for amyloid-beta protein-induced neuron death. **J Neurosci**, v. 24, p. 1760-1771, 2004.

LI, S.; JIN, M.; KOEGLSPERGER, T.; SHEPARDSON, N. E.; SHANKAR, G.M.; SELKOE, D. J. Soluble Abeta oligomers inhibit long-term potentiation through a mechanism involving excessive activation of extrasynaptic NR2B-containing NMDA receptors. **J Neurosci**, v. 31, p. 6627-38, 2011.

LITVAN, I.; AARSLAND, D.; ADLER, C.H.; et. al. MDS Task Force on mild cognitive impairment in Parkinson's disease: Critical review of PD-MCI. **Mov Disord**, v. 26, p. 1814–1824, 2011.

LI, Q.; WU, X.; YANG, Y.; ZHANG, Y.; HE, F.; XU, X.; ZHANG, Z.; TAO, L.; LUO, C. Tachykinin NK1 receptor antagonist L-733,060 and substance P deletion exert neuroprotection through inhibiting oxidative stress and cell death after traumatic brain injury in mice. **International journal of biochemistry and cell biology**, v. 107, p. 154-165, 2019.

LORENC-KOCI, E.; WOLFARTH, S.; OSSOWSKA, K. Haloperidol-increased muscle tone in rats as a model of parkinsonian rigidity. **Exp. Brain Res.**, v. 109, p. 268-76, 1996.

LOURENCO, M.V.; FERREIRA, S.T.; DE FELICE, F.G. Neuronal stress signaling and eIF2 α phosphorylation as molecular links between Alzheimer's disease and diabetes. **Prog Neurobiol.**, v. 129, p. 37-57, 2015.

LU, X.; KIM-HAN, J.S.; HARMON, S.; SAKIYAMA-ELBERT, S.E.; O'MALLEY, K.L. The Parkinsonian mimetic, 6-OHDA, impairs axonal transport in dopaminergic axons. **Mol Neurodegener.**, v. 9, p. 17, 2014.

LYONS, K.E.; WILKINSON, S.B.; OVERMAN, J.; PAHWA, R. Surgical and hardware complications of subthalamic stimulation: A series of 160 procedures. **Neurology**, v. 63, p. 612–616, 2004.

MACHADO, A.P.R.; CARVALHO, I.O.; SOBRINHO, H.M.R. Neuroinflamação na doença de Alzheimer. **Revista Bras. Militar de Ciências**, v. 6, n.14, 2020.

MAGGI, C. A. The mammalian tachykinin receptors. **Gen. Pharmacol.**, v. 26, p. 911-944, 1995.

MAN, S.M.; KARKI, R.; KANNEGANTI, T.D. DNA-sensing inflammasomes: regulation of bacterial host defense and the gut microbiota. **Pathog Dis.**, v. 74, p. ftw028, 2016.

MARDER, K.; TANG, M.X.; MEJIA, H.; ALFARO, B.; COTE, L.; LOUIS, E.; GROVES, J.; MAYEUX, R. Risk of Parkinson's disease among first-degree relatives: A community-based study. **Neurology**, v. 47, p. 155–160, 1996.

MARTIM, A.C.; SANDERS, R.A.; WATKINS, J.B. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. **J Biochem Mol Toxicol.**, v. 17, p. 24–38, 2003.

MA, T.P. The Basal Ganglia. In: Haines, D.E. *Fundamental of Neuroscience*. **Churchill Livingstone**, New York. p.363-378, 1997.

MATTSON, M.P. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. **Nature**, v. 430, p. 631-639, 2004.

MATTSON, M.P. Cellular actions of beta-amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives. **Physiol Rev.**, v. 77, p. 1081-132, 1997.

MARCUS, D L.; THOMAS, C.; RODRIGUEZ, C.; SIMBERKOFF, K.; TSAI, J.S.; STRAFACI, J.A.; FREEDMAN, M.L. Increased peroxidation and reduced antioxidant enzyme activity in Alzheimer's disease. **Exp Neurol.**, v. 150, p. 40-4, 1998.

MARGALLO-LANA, M.; MORRIS, C.M.; GIBSON, A.M.; TAN, AL.; KAY, D.W.; TYRER, S.P.; MOORE, B.P.; BALLARD, C.G. Influence of the amyloid precursor protein locus on dementia in Down syndrome. **Neurology**, v. 62, p. 1996–1998, 2004.

MARKOWITSCH, H.J.; STANILOIU, A. Amnesic disorders. **Lancet**, v. 380, p. 1429–1440, 2012.

MARRIOTT, I.; BOST, K.L. Substance P diminishes lipopolysaccharide and interferon-gamma-induced TGF-beta 1 production by cultured murine macrophages. **Cell. Immunol.**, v. 183, p.113–120, 1998.

MARRIOTT, I.; BOST, K.L Substance P receptor mediated macrophage responses. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 493, p. 247–254, 2001.

MARRIOTT, I. The role of tachykinins in central nervous system inflammatory responses. **Front. Biosci.**, v. 9, p. 153–2165, 2004.

MARTINEZ, A. N.; PHILIPP, M. T. Substance P and Antagonists of the Neurokinin-1 Receptor in Neuroinflammation Associated with Infectious and Neurodegenerative Diseases of the Central Nervous System. **J Neurol Neuromedicine.**, v. 1, p. 29–36, 2016.

MAYEUX, R.; STERN, Y. Epidemiology of Alzheimer disease. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 2, a006239, 2012.

MAZZIO, E. A.; REAMS, R. R.; SOLIMAN, K. F. A. The role of oxidative stress, impaired glycolysis and mitochondrial respiratory redox failure in the cytotoxic effects of 6-hydroxidopamine in vitro. **Brain Research**, v. 1004, n. 1-2, p. 29-44. 2004.

MCGEER, P.L.; ITAGAKI, S.; BOYES, B.E.; MCGEER, E.G. Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. **Neurology**. v. 38, p. 1285–1291, 1988.

MC MONAGLE, P.; DEERING, F.; BERLINER, Y.; KERTESZ, A. The cognitive profile of posterior cortical atrophy. **Neurology**, v. 66, p. 331–338, 2006.

- MEDEIROS, R. A doença de Alzheimer como um processo neuroinflamatório. Tese (Doutorado em farmacologia). Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. p. 139, 2007.
- MELLO, L.E.; VILLARES, J. Neuroanatomy of the basal ganglia. **Psychiatr Clin North Am.**, v. 20, p. 691-704, 1997.
- MÉMET, S. NF- κ B functions in the nervous system: From development to disease. **Biochem. Pharmacol.**, v. 72, p. 1180–1195, 2006.
- MENEZES, M.S.; TEIVE, H.A.G. Doença de Parkinson. Rio de Janeiro: ed. **Guanabara Koogan**, 2003.
- METZ, G. A.; WHISHAW, I. Q. Drug-induced rotation intensity in unilateral dopamine-depleted rats is not correlated with end point or qualitative measures of forelimb or hindlimb motor performance. **Neuroscience**, v. 3, p. 325-336, 2002.
- MILLER, D.B.; O'CALLAGHAN, J.P. Biomarkers of Parkinson's disease: present and future. **Metabolism**, v. 64, S40–6, 2015.
- MIRANDA, G.M.D.; MENDES, A.C.G.; SILVA, A.L.A. O envelhecimento populacional brasileiro: desafios e consequências sociais atuais e futuras Population aging in Brazil: current and future social challenges and consequences. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, Rio de Janeiro, v. 19, p. 507-519, 2016.
- MOISAN, F.; KAB, S.; MOHAMED, F.; et al. Parkinson disease male-to-female ratios increase with age: French nationwide study and meta-analysis. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 87, p. 952– 957, 2016.
- MONTINE, T.J. Prevalence estimates for latent neurodegenerative disease. **Toxicol Pathol.**, v. 39, p. 99–102, 2011.
- MOSLEY, R.L.; BENNER, E.J.; KADIU, I.; THOMAS, M.; BOSKA, M.D.; HASAN, K.; LAURIE, C.; GENDELMAN, H.E. Neuroinflammation, oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease. **Clin Neurosci Res**, v. 6, p. 261–281, 2006.
- NESSLER, S.; STADELMANN, C.; BITTNER, A.; et al. Suppression of autoimmune encephalomyelitis by a neurokinin-1 receptor antagonist—a putative role for substance P in CNS inflammation. **J. Neuroimmunol.**, v. 179, p. 1–8, 2006.
- NUSSBAUM, R.L.; ELLIS, C.E. Alzheimer's disease and Parkinson's disease. **N Engl J Med**, v. 348, p.1356–1364, 2003.
- OBESO, J. A.; RODRIGUEZ-OROZ, M. C.; RODRÍGUEZ, M.; LANCIEGO, J. L.; ARTIEDA, J.; GONZALO, N.; OLANOW, C. W. Pathophysiology of the basal ganglia in Parkinson's disease. **Trends Neurosci.**, v. 23, p. s8-s19, 2000.
- O'CONNOR, T.M.; O'CONNELL, J.; O'BRIEN, D.I.; GOODE, T.; BREDIN, C.P.; SHANAHAN, F. The role of substance P in inflammatory disease. **J. Cell. Physiol.**, v. 201, p. 167–180, 2004.

ODEKERKEN, V.J.; BOEL, J.A.; SCHAMND, B.A.; DE HAAN, R.J.; FIGEE, M.; VAN DEN MUNCKHOF, P.; SCHUURMAN, P.R.; DE BIE, R.M.; NSTAPS Study Group. GPi vs STN deep brain stimulation for Parkinson disease: Three-year followup. **Neurology**, v. 86, p. 755–761, 2016.

OLIN, J.; SCHNEIDER, L. Galantamine for Alzheimer's disease. **Cochrane Database Syst Rev**, CD001747, 2001.

OSSENKOPPELE, R.; PIJNENBURG, Y.A.; PERRY, D.C.; et al. The behavioural/dysexecutive variant of Alzheimer's disease: Clinical, neuroimaging and pathological features. **Brain**, v. 138, p. 2732–2749, 2015b.

OTSUKA, M.; YOSHIOKA, K. Neurotransmitter functions of mammalian tachykinins. **Physiol Rev.** v. 73, p. 229-308, 1993.

OZAY, R.; TURKOGLU, E.; GURER, B.; DOLGUN, H.; EVIRGEN, O.; ERGUDER, B. İ.; HAYIRLI, N.; GURSES, L.; ŞEKERCI, Z.; YILMAZ, E. R. Does decorin protect neuronal tissue via its antioxidant and antiinflammatory activity from traumatic brain injury? An experimental study. **World Neurosurg**, v. 97, p. 407–415, 2017.

PADURARIU, M.; CIOBICA, A.; HRITCU, L.; STOICA, B.; BILD, W.; STEFANESCU, C. Changes of some oxidative stress markers in the serum of patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. **Neuroscience Letters**, v. 469, p. 6– 10, 2010.

PADURARIU, M.; CIOBICA, A.; LEFTER, R.; SERBAN, I. L.; STEDANESCU, C.; CHIRITA, R. The oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. **Psychiatria Danubina**, v. 25, p. 401–409, 2013.

PALLADINO, M.A.; BAHJAT, F.R.; THEODORAKIS, E.A.; MOLDAWER, L.L. Anti-TNFalpha therapies: the next generation. **Nat Rev Drug Discov**, v. 2, p. 736-46, 2003.

PALMER, A.M.; BURNS, M.A. Selective increase in lipid peroxidation in the inferior temporal cortex in Alzheimer's disease. **Brain Res.**, v. 645, p. 338-42, 1994.

PARENT, A.; HAZRATI, L.N. Functional anatomy of the basal ganglia.I. The corticobasal gangliathalamo-cortical loop. **Brain Res Brain Res Rev.**, v. 20, p. 91-127, 1995a.

PARENT, A.; HAZRATI, L.N. Functional anatomy of the basal ganglia. II. The place of subthalamic nucleus and external pallidum in basal ganglia circuitry. **Brain Res Brain Res Rev.**, v. 20, p. 128-54, 1995b.

PARSONS, C.G.; STOFFLER, A.; DANYSZ, W. Memantine: a NMDA receptor antagonist that improves memory by restoration of homeostasis in the glutamatergic system--too little activation is bad, too much is even worse. **Neuropharmacology**, v. 53, p. 699-723, 2007.

PEARCE, N.; KROMHOUT, H. Neurodegenerative disease: the next occupational disease epidemic? **Occup Environ Med.**, v. 71, p. 594–5, 2014.

PENNEFATHER, J.N.; LECCI, A.; CANDENAS M.L.; PATAK, E.; PINTO F.M.; MAGGI C.A. Tachykinins and tachykinin receptors, a growing Family. **Life Sci**, v. 74, p. 1445-63, 2004.

PENNISI M.; CRUPI, R.; DI PAOLA, R.; et al. Inflammasomes, hormesis, and antioxidants in neuroinflammation: Role of NRLP3 in Alzheimer disease. **J Neurosci Res.**, v. 95, p. 1360-1372, 2017.

PERUMAL, A. S.; TORDZRO, W. K.; KATZ, M.; JACKSON-LEWIS, V.; COOPER, T. B.; FAHN, S.; CADET, J. L. Regional effects of 6- hydroxydopamine on free radical scavengers in rat brain. **Brain Research**, v. 504, n. 1, p. 139-141. 1989.

PFRIEGER, F. W. Cholesterol homeostasis and function in neurons of the central nervous system. **Cell Mol Life Sci.**, v. 60, p. 1158-71, 2003.

PHANI, S.; LOIKE, J.D.; PRZEDBORSKI, S. Neurodegeneration and Inflammation in Parkinson's disease. **Parkinsonism Relat. Disord**, v. 18, p. S207–S209, 2012.

PLASCHKE, K.; KOPITZ, J.; SIEGELIN, M.; SCHIEBS, R.; SALKOVIC-PETRISIC, M; et al. Insulin-Resistant Brain State after Intracerebroventricular Streptozotocin Injection Deteriorates Alzheimer-like Changes in Tg2576 AbetaPP-Overexpressing Mice. **J Alzheimers Dis**, v. 19, p. 691–704, 2010.

POLYMEROPOULOS, M.H.; LAVEDAN, C.; LEROY, E.; et al. Mutation in the a-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. **Science**, v. 276, p. 2045– 2047, 1997.

POURATIAN, N.; THAKKAR, S.; KIM, W.; BRONSTEIN, J.M. Deep brain stimulation for the treatment of Parkinson's disease: Efficacy and safety. **Degener Neurol Neuromuscul Dis**, v. 2012, p. 107-117, 2012.

PRAKASH, A.; KALRA, J.K.; KUMAR, A. Neuroprotective effect of Nacetyl cysteine against streptozotocin-induced memory dysfunction and oxidative damage in rats. **J Basic Clin Physiol Pharmacol**, v. 26, p. 13–23, 2015.

PRANSKI, E.; SANFORD, C.D.; VAN DALAL, N.; ORR, A.L.; KARMALI, D.; COOPER, D.S.; GEARING, M.; LAH, J.J.; LEVEY, A.I.; BETARBET, R.; EDU, E. NF-κB activity is inversely correlated to RNF11 expression in Parkinson's disease. **Neurosci. Lett.**, v. 547, p. 16-20, 2014.

PRESTON, Z.; RICHARDSON, P.J.; PINNOCK, R.D.; LEE, K. NK-3 receptors are expressed on mouse striatal gamma-aminobutyric acid-ergic interneurons and evoke [(3)H] gamma-aminobutyric acid release. **Neurosci. Lett.**,v. 284, p. 89-92, 2000.

PRINCE, M.; COMAS HERRERA A.; KNAPP, M.; KARAGIANNIDOU, M.; GUERCHET, M. World Alzheimer Report 2016: Improving Healthcare for People with Dementia. **Coverage, Quality and Costs Now and in the Future**. London: Alzheimer's Disease International (ADI), 2016.

PRZEDBORSKI, S.; LEVIVIER, M.; JIANG, H.; FERREIRA, M.; JACKSON-LEWIS, V.; DONALDSON, D.; TOGASAKI, D.M. Dose-dependent lesions of the dopaminergic nigrostriatal pathway induced by intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine. **Neuroscience.**, v. 67, p. 631-47, 1995.

- QUARTARA, L.; ALTAMURA, M.; EVANGELISTA, S.; MAGGI, C.A. Tachykinin receptor antagonists in clinical trials. **Expert. Opin. Investig. Drugs**, v. 18, p. 1843–1864, 2009.
- QUARTARA, L.; ALTAMURA, M. Tachykinin receptors antagonists: from research to clinic. **Curr. Drug Targets**, v. 7, p. 975–992, 2006.
- QUERFURTH, H.W.; LAFERLA, F.M. Alzheimer's disease. **N Engl J Med.**, v. 362, p. 329–344, 2010.
- QUIGLEY, B.J.Jr.; KOWALL, N.W. Substance P-like immunoreactive neurons are depleted in Alzheimer's disease cerebral cortex. **Neuroscience**, v. 41, p. 41–60, 1991.
- RADI, E.; FORMICHI, P.; BATTISTI, C.; FEDERICO, A. Apoptosis and oxidative stress in neurodegenerative diseases. **J Alzheimers Dis.**, v. 42, S125-52, 2014.
- RAFFA, R.B. Possible role(s) of neurokinins in CNS development and neurodegenerative or other disorders. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 22, p. 789-813, 1998.
- RASLEY, A.; MARRIOTT, I.; HALBERSTADT, C.R.; BOST, K.L.; ANGUITA, J. Substance P augments *Borrelia burgdorferi*-induced prostaglandin E2 production by murine microglia. **J. Immunol.**, v. 172, p. 5707–5713, 2004.
- REED-HAGEN, A.E.; TSUCHIYA, M.; SHIMADA, K.; WENTLAND, J.A.; OBACH, R.S. Pharmacokinetics of ezlopitant, a novel non-peptidic neurokinin-1 receptor antagonist in preclinical species and metabolite kinetics of the pharmacologically active metabolites. **Biopharm. Drug Dispos.**, v. 20, p. 429–439, 1999.
- REGOLI, D.; BOUDON, A.; FAUCHÉRE J.L. Receptors and antagonists for substance P and related peptides. **Pharmacol Rev.**, v. 46, p. 551-99, 1994.
- REID, M.S.; HERRERA-MARCHITZ, M.; HO"KFELT, T.; LINDEFORS, N.; PERSSON, H.; UGERSTEDT, U. Striatonigral GABA, dynorphin, substance P and neurokinin A modulation of nigrostriatal dopamine release: evidence for direct regulatory mechanisms. **Exp Brain Res**, v. 82, p. 293–303, 1990.
- REINKE, E.K.; JOHNSON, M.J.; LING, C.; et al. Substance P receptor mediated maintenance of chronic inflammation in EAE. **J. Neuroimmunol.**, v. 180, p. 117–125, 2006.
- REISBERG, B.; DOODY, R.; STOFFLER, A.; SCHMITT, F.; FERRIS, S.; MOBIUS, H.J. Memantine Study Group. Memantine in moderate-to-severe Alzheimer's disease. **N Engl J Med**, v. 348, p. 1333–1341, 2003.
- REITZ, C.; BRAYNE, C.; MAYEUX, R. Epidemiology of Alzheimer disease. **Nat Rev Neurol**, v. 7, p. 137 –152, 2011.
- REKATSINA, M.; PALADINI, A.; PIROLI, A.; et al. Pathophysiology and Therapeutic Perspectives of Oxidative Stress and Neurodegenerative Diseases: A Narrative Review. **Adv Ther**, v. 37, p. 113–139, 2020.

REYNOLDS, A.; LAURIE, C.; MOSLEY, R.L.; GRENDelman, H.E. Oxidative stress and the pathogenesis of neurodegenerative disorders. **Int Rev Neurobiol**, v. 82, p. 297–325, 2007.

RIBEIRO DA SILVA, A.; HOKFELT, T. Neuroanatomical localization of substance P in the CNS and sensory neurons. **Neuropeptides**, v. 34, p. 256-271, 2000.

RICCIARELLI, R.; ARGELLATI, F.; PRONZATO, M.A.; DOMENICOTTI, C. Vitamin E and neurodegenerative diseases. **Mol Aspects Med.**, v. 28, p. 591-606, 2007.

RIVERA, E.J.; GOLDIN, A.; FULMER, N.; TAVARES, R.; WANDS, J.R.; DE LA MONTE, S.M. Insulin and insulin-like growth factor expression and function deteriorate with progression of Alzheimer's disease: link to brain reductions in acetylcholine. **J Alzheimers Dis.**, v. 8, p. 247-68, 2005.

RIZEK, P.; KUMAR, N.; JOG, M.S. An update on the diagnosis and treatment of Parkinson disease. **CMAJ.**, v. 188, p. 1157-1165, 2016.

ROBINSON, P.; GARZA, A.; WEINSTOCK, J.; SERPA, J.A.; GOODMAN, J.C.; ECKOLS, K.T.; et al. Substance P causes seizures in neurocysticercosis. **PLoS Pathog.**, v. 8, e1002489, 2012.

ROBINSON, P.; WHITE, A.C.; LEWIS, D.E.; THORNBY, J.; DAVID, E.; WEINSTOCK, J. Sequential expression of the neuropeptides substance P and somatostatin in granulomas associated with murine cysticercosis. **Infect. Immun.**, v. 70, p. 4534–4538, 2002.

ROCHA, M.S.G. Doença de Parkinson: aspectos neuropsicológicos. In: Andrade VM, Santos FH, Bueno OFA, organizadores. **Neuropsicologia hoje**. São Paulo: Artes Médicas; p. 349-70, 2004.

RODRIGUEZ-OROZ, M.C.; JAHANSHAHI, M.; KRACK, P.; LITVAN, I.; MACIAS, R.; BEZARD, E.; et al. Initial clinical manifestations of Parkinson's disease: features and pathophysiological mechanisms. **Lancet Neurol.**, v. 8, p. 1128–1139, 2009.

ROS-BERNAL, F.; HUNOT, S.; TRINIDAD HERRERO, M.; PARNADEAU, S.; CORVOL, J.C.; LU, L.; ALVAREZ-FISCHER, D.; CARRILLO-DE SAUVAGE, M.A.; SAURINI, F.; COUSSIEU, C.; KINUGAWA, K.; PRIGENT, A.; HÖGLINGER, G.; HAMON, M.; TRONCHE, F.; HIRSCH, E.C.; VYAS, S. Microglial glucocorticoid receptors play a pivotal role in regulating dopaminergic neurodegeneration in parkinsonism. **PNAS.**, v. 108, p. 6632-6637, 2011.

ROSSO, M.; MUNOZ, M.; BERGER, M. The Role of Neurokinin-1 Receptor in the Microenvironment of Inflammation and Cancer. **Sci World J.**, 2012:381434, 2012.

RUHLMANN, C.; HERRSTEDT, J. Casopitant: a novel NK(1)-receptor antagonist in the prevention of chemotherapy-induced nausea and vomiting. **Ther. Clin. Risk Manag.**, v. 5, p. 375–384, 2009.

RYMAN, D.C.; ACOSTA-BAENA, N.; AISEN, P.S.; BIRD, T.; DANEK, A.; et al. Symptom onset in autosomal dominant Alzheimer disease: A systematic review and meta-analysis. **Neurology**, v. 83, p. 253 –260, 2014.

SAFFROY, M.; TORRENS, Y.; GLOWINSKI, J.; BEAUJOUAN, J. C.; Presence of NK2 binding sites in the rat brain; **J. Neurochemistry**, v. 79, p. 985-996, 2001.

SALKOVIC-PETRISIC, M.; HOYER, S. Central insulin resistance as a trigger for sporadic Alzheimer-like pathology: an experimental approach. **J Neural Transm Suppl**, v. 72, p. 217–233, 2007.

SALKOVIC-PETRISIC, M; TRIBL, F.; SCHMIDT, M.; HOYER, S.; RIEDERER, P. Alzheimer-like changes in protein kinase B and glycogen synthase kinase-3 in rat frontal cortex and hippocampus after damage to the insulin signalling pathway. **J Neurochem.**, v. 96, p. 1005-15, 2006.

SANTOS, R.; BULTEAU, A.L.; GOMES, C.M. Neurodegeneration, neurogenesis, and oxidative stress. **Oxid Med Cell Longev.**, 7632025, 2016.

SAXENA, G.; SINGH, S.P.; AGRAWAL, R.; NATH, C. Effect of donepezil and tacrine on oxidative stress in intracerebral streptozotocin-induced model of dementia in mice. **Eur J Pharmacol**, v. 581, p. 283–289, 2008.

SAXENA, G.; PATRO, I.K.; NATH, C. ICV STZ induced impairment in memory and neuronal mitochondrial function: A protective role of nicotinic receptor. **Behav Brain Res**, v. 224, p. 50-57, 2011.

SCHAPIRA, A.H.; JENNER, P. Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. **Movement Disorders**, v. 26, p. 1049–1055, 2011.

SCHAPIRA, A.H.V.; COOPER, J.M.; DEXTER, D.; CLARK, J.B.; JENNER, P.; MARSDEN, C.D. Mitochondrial Complex I deficiency in Parkinson's disease. **Journal of Neurochemistry**, v. 54, p. 823–827, 1990.

SCHÖBER, A. Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. **Cell Tissue Res.**, v. 318, p. 215-24, 2004.

SEITZ, D.P.; ADUNURI, N.; GILL, S.S.; GRUNEIR, A.; HERMANN, N.; ROCHON, P. Antidepressants for agitation and psychosis in dementia. **Cochrane Database Syst Rev**, CD008191, 2011.

SELEK, S.; BULUT, M.; OCAK, A.R.; KALENDEROGLU, A.; SAVAS, H.Á. Evaluation of total oxidative status in adult attention deficit hyperactivity disorder and its diagnostic implications. **J Psychiatr Res.**, v. 46, p. 451-5, 2012.

SELKOE, D.J. Alzheimer's disease results from the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid beta-protein. **J Alzheimers Dis**, v. 3, p.75-80, 2001.

SELKOE, D.J. Amyloid beta-protein and the genetics of Alzheimer's disease. **J Biol Chem.**, v. 271, p. 18295-8, 1996.

SELKOE, D.; MANDELKOW, E.; HOLTZMAN, D. Deciphering Alzheimer Disease. **Cold Spring Harbor Perspect. Med.**, v. 2, a011460, 2012.

SHA, S.; RABINOVICI, G. Atypical Alzheimer's disease. In Non-Alzheimer's and atypical dementia. Ed. Geshwind M, Belkoura C. p. 17. Wiley-Blackwell, West Sussex, United Kingdom, 2016.

SHARMA, M.; GUPTA, Y.K. Intracerebroventricular injection of streptozotocin in rats produces both oxidative stress in the brain and cognitive impairment. **Life Sci.**, v. 68, p. 1021-9, 2001.

SHI, J.Q.; ZHANG, C.C.; SUN, X.L.; CHENG, X.X.; WANG, J.B.; ZHANG, Y.D.; XU, J.; ZOU, H.Q. Antimalarial drug artemisinin attenuates amyloidogenesis and neuroinflammation in APP^{swe}/PS1^{dE9} transgenic mice via inhibition of nuclear factor-kappaB and NLRP3 inflammasome activation. **CNS Neurosci Ther.**, v. 19, p. 262-8, 2013.

SHIMOHAMA, S.; SAWADA, H.; KITAMURA, Y.; TANIGUCHI, T. Disease model: Parkinson's disease. **Trends Mol Med.**, v. 9, p.360-5, 2003.

SHOHAM, S.; BEJAR, C.; KOVALEV, E.; SCHORER-APELBAUM, D.; WEINSTOCK, M. Ladostigil prevents gliosis, oxidative-nitrative stress and memory deficits induced by intracerebroventricular injection of streptozotocin in rats. **Neuropharmacology**, v. 52, p. 836–843, 2007.

SHUGHURE, P.J.; LANE, M.V.; MERCHENTHALER, I. In situ hybridization analysis of the distribution of neurokinin-3 mRNA in the rat central nervous system. **J.Comp. Neurol.**, v. 372, p. 395-414, 1996.

SHULTS, C. W.; QUIRION, R.; CHRONWAL, B.; CHASE, T. N.; O'DONOHUE, T. L. A comparison of substance P and substance P receptors in the rat central nervous system. **Peptides**, v. 5, p. 1097-1128, 1984.

SCHULZ, J.B.; LINDENAU, J.; SEYFRIED, J.; DICHGANS, J. Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. **Eur J Biochem.**, v. 267, p. 4904–11, 2000.

SIEGEL, G.J. Basic Neurochemistry. Molecular, Cellular and Medical Aspects. 7^a edição. London: ed Elsevier, 2006.

SILBERT, L.C.; QUINN, J.F.; MOORE, M.M.; CORBRIDGE, E.; et. al. Changes in premonitory brain volume predict Alzheimer's disease pathology. **Neurology**, v. 61, p. 487–492, 2003.

SIMOLA, N.; MORELLI, M.; CARTA, A. R. The 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. **Neurotoxicity Research**, v. 11, n. 3-4, p. 151-167. 2007.

SINGLETON, A.B.; FARRER, M.J.; BONIFATI, V. The genetics of Parkinson's disease: Progress and therapeutic implications. **Mov Disord**, v. 28, p. 14–23, 2013.

SINK, K.M.; HOLDEN, K.F.; YAFFE, K. Pharmacological treatment of neuropsychiatric symptoms of dementia: A review of the evidence. **JAMA**, v. 293, p. 596–608, 2005.

SNIJDELAAR, D.G.; DIRKSEN, R.; SLAPPENDEL, R.; CRUL, B.J. Substance P. **Eur J Pain**, v. 4, p. 121-135, 2000.

SOLLEIRO-VILLAVICENCIO, H.; RIVAS-ARANCIBIA, S. Effect of chronic oxidative stress on neuroinflammatory response mediated by CD4⁺ T cells in neurodegenerative diseases. **Front Cell Neurosci.**, v. 12, p. 114, 2018.

SOTO-OTERO, R.; MÉNDEZ-ÁLVAREZ, E.; HERMIDAAMEIJEIRAS, Á.; MUÑOZ-PATIÑO, A. M.; LABANDEIRAGARCIA, J. L. Autoxidation and Neurotoxicity of 6-hydroxydopamine in the presence of some antioxidants: potential implication in relation to the pathogenesis of Parkinson's disease. **Journal of Neurochemistry**, v. 74, n. 4, p. 1605-1612. 2000.

SOUSA, A.A.; BRAGA, S.A.; SOBRINH, H.M.R. Neuroinflamação na doença de Parkinson. **Revista EVS - Revista de Ciências Ambientais e Saúde**, v. 43, p. 79, 2016.

SPIRES, T. L.; HYMAN, B. T. Transgenic models of Alzheimer's disease: learning from animals. **Neurox**, v. 2, p. 423-37, 2005.

STEFANONI, G.; SALA, G.; TREMOLIZZO, L.; BRIGHINA, L.; FERRARESE, C. Alpha-Synuclein, Oxidative Stress and Autophagy Failure: Dangerous Liaisons in Dopaminergic Neurodegeneration, **In Tech**, 2011.

STEEN, E.; TERRY, B.M.; RIVERA, E.J.; et. al. Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease--is this type 3 diabetes? **J Alzheimers Dis.**, v. 7, p. 63-80, 2005.

STRITTMATTER, M.; ISENBERG, E.; GRAUER, M.T.; HAMANN, G.; SCHIMRIGK, K. CFS substance P somatostatin and monoaminergic transmitter metabolites in patients with narcolepsy. **Neuroscience Letters**, v.218, p.99-102, 1996.

SWARDFAGER, W.; LANCTOT, K.; ROTHENBURG, L.; WONG, A.; CAPPELL, J.; HERMANN, N. A metaanalysis of cytokines in Alzheimer's disease. **Biol Psychiatry.**, v .68, p. 930-4, 2010.

SZKUDELSKI, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. **Physiol Res**, v. 50, p. 537-46, 2001.

TANIMUKAI, H.; KUDO, T.; TANAKA, T.; GRUNDKE-IQBAL, I.; IQBAL, K.; TAKEDA, M. Novel therapeutic strategies for neurodegenerative disease. **Psychogeriatrics**, v. 9, p. 103-109, 2009.

TARKOWSKI, E. Cytokines in dementias. **Curr Drug Targets Inflamm Allergy**, v. 1, p. 193-200, 2002.

THAKUR, P.; NEHRU, B. Anti-inflammatory properties rather than anti-oxidant capability is the major mechanism of neuroprotection by sodium salicylate in a chronic rotenone model of Parkinson's disease. **Neuroscience**. v. 213, p. 420-431, 2013.

The EU Joint Programme-Neurodegenerative Disease Research (JPND), 2017. <http://www.neurodegenerationresearch.eu/>. Acessado em 21 de Fevereiro de 2019.

THENGANATT, M.A.; JANKOVIC, J. Parkinson disease subtypes. **JAMA Neurol**, v. 71, p. 499 –504, 2014.

THORNTON, E.; VINK, R. Treatment with a substance P receptor antagonist is neuroprotective in the intrastriatal 6-hydroxydopamine model of early Parkinson's disease. **PLoS One**, v. 7, p. 34138, 2012.

THORNTON, E.; VINK, R. Substance P and its tachykinin NK1 receptor: a novel neuroprotective target for Parkinson's disease. **Neural Regen Res.**, v. 10, p. 1403-1405, 2015.

TÕUGU, V.; KARAFIN, A.; PALUMAA, P. Binding of zinc(II) and copper(II) to the full-length Alzheimer's amyloid-beta peptide. **J Neurochem.**, v. 104, p. 1249-59, 2008.

TRUDLER, D.; FARFARA, D.; FRENKEL, D. Toll-like receptors expression and signaling in glia cells in neuro-amyloidogenic diseases: towards future therapeutic application. **Mediators Inflamm**, 2010:497987, 2010.

TUPPO, E.E.; ARIAS, H.R. The role of inflammation in Alzheimer's disease. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 37, p. 289-305, 2005.

US Food and Drug Administration. FDA grants accelerated approval for Alzheimer's drug. <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-grants-accelerated-approval-alzheimers-drug> . Acessado em 07 de Junho de 2021.

VARCIN, M.; BENTEA, E.; MICHOTTE, Y.; SARRE, S. Oxidative stress in genetic mouse models of Parkinson's disease. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2012, 624925, 2012.

VASCONCELOS, A.M.N.; GOMES, M.M.F. Transição demográfica: a experiência brasileira. **Epidemiol Serv Saúde**, v. 21, p. 539-48, 2012.

VIEGAS, F.P.D.; SIMÕES, M.C.R.; ROCHA, M.D.; CASTELLI, M.R.; MOREIRA, M.S.; VIEGAS JUNIOR, C. Doença de Alzheimer: Caracterização, Evolução e Implicações do Processo Neuroinflamatório. **Rev. Virtual Quim.**, v. 3, p. 286-306, 2011.

VILISAAR, J.; KAWABE, K.; BRAITCH, M.; ARAM, J.; et al. Reciprocal Regulation of Substance P and IL-12/IL-23 and the Associated Cytokines, IFN γ /IL-17: A Perspective on the Relevance of This Interaction to Multiple Sclerosis. **J Neuroimmune Pharmacol.**, v. 10, p. 457-67, 2015.

VINET-OLIPHANT, H.; ALVAREZ, X.; BUZA, E.; et al. Neurokinin-1 receptor (NK1-R) expression in the brains of SIV-infected rhesus macaques: implications for substance P in NK1-R immune cell trafficking into the CNS. **Am. J. Pathol.**, v. 177, p. 1286-1297, 2010.

VINISH, M.; ANAND, A.; PRABHAKAR, S. Altered oxidative stress levels in Indian Parkinson's disease patients with PARK2 mutations. **Acta Biochimica Polonica**, v. 58, p. 165-169, 2011.

VOLT, H.; GARCIA, J.A.; DOERRIER, C.; et al. Same molecule but different expression: aging and sepsis trigger NLRP3 inflammasome activation, a target of melatonin. **J Pineal Res.**, v. 60, p. 193-205, 2016.

VON EULER, U.S. On the specific vaso-dilating and plain muscle stimulating substances from accessory genital glands in man and certain animals (prostaglandin and vesiglandin. **The Journal of Physiology**, v. 88, p. 213–234, 1936.

VON EULER, U.S.; GADDUM, J.H. An unidentified depressor substance in certain tissue extracts. **J. Physiol**, v. 72, p. 74–81, 1931.

VON EULER, U.S.; PERNOW, B. (Eds). Substance P. Nobel Symposium, 37. Raven Press, New York, 1977.

WANG, X. Q.; CHU, C.H.; QIAN, L.; CHEN, S.H.; WILSON, B.; OYARZABAL, E.; JIANG, L.; ALI, S.; ROBINSON, B.; KIM, H.C.; HONG, J.S. Substance P Exacerbates Dopaminergic Neurodegeneration through Neurokinin-1 Receptor-Independent Activation of Microglial NADPH Oxidase. **The Journal of Neuroscience**, v. 34, p. 12490–12503, 2014.

WANG, Q.; WU, J.; ROWAN, M.J.; ANWYL, R. Beta-amyloid inhibition of longterm potentiation is mediated via tumor necrosis factor. **Eur J Neurosci**, v. 22, p. 2827-2832, 2005.

WAJANT H, PFIZENMAIER K, SCHEURICH P (2003) Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ* 10:45-65.

WEINER, M.W.; VEITCH, D.P.; AISEN, P.S.; BECKETT, L.A.; et al. Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. **Alzheimers Dement.**, v. 8, S1-68, 2012.

WHITWELL, J.L.; JOSEPHS, K.A.; MURRAY, M.E.; et al. MRI correlates of neurofibrillary tangle pathology at autopsy: Avoxel-based morphometry study. **Neurology**, v. 71, p. 743–749, 2008.

WHITWELL, J.L.; DICKSON, D.W.; MURRAY, M.E.; WEIGAND, S.D.; et al. Neuroimaging correlates of pathologically defined subtypes of Alzheimer's disease: A case-control study. **Lancet Neurol**, v. 11, p. 868–877, 2012.

WONG, K.L.; YEAP, W.H.; TAI, J.J.; ONG, S.M.; DANG, T.M.; WONG, S.C; The three human monocyte subsets: implications for health and disease. **Immunol Res**, v. 53, p. 41-57, 2012.

WOODS, B.; AGUIRRE, E.; SPECTOR, A.E.; ORRELL, M. Cognitive stimulation to improve cognitive functioning in people with dementia. **Cochrane Database Syst Rev**, CD005562, 2012.

YADAY, S.; MANSOORI, A.N.; SISODIYA, J.S. Current pathologic determinants of complex neurodegenerative diseases: a review. **Int J Pharm Technol.**, v. 5, p. 2607–21, 2013.

YANKNER, B.A. Mechanisms of neuronal degeneration in Alzheimer's disease. **Neuron**, v. 16, p. 921-32, 1996.

YARIBEYGI, H.; PANAHI, Y.; JAVADI, B.; SAHEBKAR, A. The underlying role of oxidative stress in neurodegeneration: a mechanistic review. **CNS Neurol Disorders Drug Targets**, v. 17, p. 207–15, 2018.

YU, Z.; CHENG, G.; HUANG, X.; LI, K.; CAO, X. Neurokinin-1 receptor antagonist SR140333: a novel type of drug to treat cerebral ischemia. **Neuroreport**, v. 8, p. 2117-2119, 1997.

ZHANG, T.M.; YU, S.Y.; GUO, P.; et al. Nonmotor symptoms in patients with Parkinson disease: A cross-sectional observational study. **Medicine (Baltimore)**, v. 95, e5400, 2016.

ZHENG, L.; ROBERG, K.; JERHAMMAR, F.; MARCUSSON, J.; TERMAN, A. Oxidative stress induces intralysosomal accumulation of alzheimer amyloid β -protein in cultured neuroblastoma cells. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1067, p. 248–251, 2006.

ZHENG, W.H.; BASTIANETTO, S.; MENNICKEN, F.; MA, W.; KAR, S. Amyloid beta peptide induces tau phosphorylation and loss of cholinergic neurons in rat primary septal cultures. **Neuroscience.**, v. 115, p. 201-11, 2002.

ZIEGLER-HEITBROCK, L.; ANCUTA, P.; CROWE, S.; et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. **Blood**, v. 116, p. e74-e80, 2010.

ZIS, P.; MCHUGH, P.C.; MANCA, M.; SARRIGIANNIS, P.G.; RAO, D.G.; HADJJVASSILIOU, M. Increased oxidative stress as a risk factor in chronic idiopathic axonal polyneuropathy. **J Mol Neurosci**, v. 66, p. 547–51, 2018.

ANEXO A - CÓPIA DO PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (CEUA-UFPE).



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
Fones 2126 8840 | 2126 8351
www.ccb.ufpe.br

Ofício nº 54/18

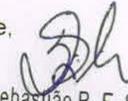
Recife, 04 de julho de 2018.

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: **Prof. Filipe Silveira Duarte**
Centro de Biociências
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº **0014/2018**

Certificamos que a proposta intitulada "**Participação da via de transdução de sinal mediada pela substância P (SP) e receptores NK1 na Neurodegeneração induzida experimentalmente em modelos animais de Parkinson e Alzheimer.**", Registrada com o nº **0014/2018** sob a responsabilidade de **Prof. Felipe Silveira Duarte** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 04/07/2018.

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência da autorização	04/06/2018 a 31 /07/2021
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogenico
Nº de animais	216
Peso/Idade	300g/3 meses
Sexo	Macho (216)
Origem	Bioterio do Departamento de Fisiologia e Farmacologia - UFPE

Atenciosamente,


 Prof. Sebastião R. F. Silva
 Vice-Presidente CEUA/UFPE
 SIAPE 2345691