



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

ERLÂNIA ALVES DE SIQUEIRA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA 1 α ,25-DIHIIDROXIVITAMINA D3 (VD3)
SOBRE A NEUROTOXICIDADE INDUZIDA PELA ROTENONA EM
CÉLULAS PC12: UM MODELO *in vitro* DE DOENÇA DE PARKINSON**

Fortaleza -CE

2021

ERLÂNIA ALVES DE SIQUEIRA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA 1 α ,25-DIHDROXIVITAMINA D3 (VD3) SOBRE
A NEUROTOXICIDADE INDUZIDA PELA ROTENONA EM CÉLULAS PC12: UM
MODELO *in vitro* DE DOENÇA DE PARKINSON**

Defesa de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de Doutorado em Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Glauce Socorro de B. Viana

Coorientadora: Profa. Dra Geanne M. de Andrade

FORTALEZA - CE

2021

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA 1 α ,25-DIHDROXIVITAMINA D3 (VD3) SOBRE
A NEUROTOXICIDADE INDUZIDA PELA ROTENONA EM CÉLULAS PC12: UM
MODELO *in vitro* DE DOENÇA DE PARKINSON

Defesa de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de Doutorado em Farmacologia.

Aprovada em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr^a. Glauce Socorro Viana (Orientadora)

Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. Dr. Claudio Marcos Queiroz

Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN

Prof. Dr^a. Emile Katarina Svahn Leão

Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN

Prof. Dr^a. Nylane Maria Nunes de Alencar

Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. Dr. Nuno Miguel de Jesus Machado

Universidade Federal do Ceará - UFC

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S629a Siqueira, Erlânia Alves.

Avaliação dos efeitos da 1-alfa,25-dihidroxitamina D3 (VD3) sobre a neurotoxicidade induzida pela rotenona em células PC12: um modelo in vitro de Doença de Parkinson / Erlânia Alves Siqueira. – 2021. 98 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2021.

Orientação: Profa. Dra. Glauce Socorro de Barros Viana.

Coorientação: Profa. Dra. Geanne Matos de Andrade.

1. Células PC12. 2. astrócitos. 3. doença de parkinson. 4. rotenona. 5. vitamina D. I. Título.

CDD 615.1

Aos meus Pais, Irmãos e ao meu esposo Genilson. Obrigada pelo carinho, incentivo, paciência, e amor incondicional,

dedico.

*“A realização profissional, os títulos acadêmicos
e o dinheiro só terão valor se houver harmonia
na família, afinidade entre os amigos, serenidade
no amor e paz de espírito”*

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a **Deus**, por toda força, por me iluminar e abençoar os meus caminhos durante esta e muitas outras caminhadas da vida, sem ti não seria nada, Senhor;

Aos meus queridos pais **Antonia e Manoel**, pelo incentivo infinito e por sempre acreditarem em mim e nos meus sonhos, eles sempre dizem “já deu certo, minha filha”;

Aos meus **11 irmãos e familiares de Bodocó-PE** que mesmo longe estão torcendo pelo meu sucesso e minhas conquistas e sentem-se orgulhosos de mim;

Ao meu esposo **Genilson Gomes**, pelo amor, dedicação, paciência e por sempre me incentivar a continuar, obrigada pela companhia sua e de nosso filho pet Spock nas noites longas de estudos, vocês sempre ao meu lado. São presentes de Deus na minha vida;

A minha orientadora **Dra Glauce Viana**, que acreditou e apostou em mim, por ter me recebido no Laboratório Neuropsicofarmacologia. Nessa “curta” e intensa jornada do Doutorado aprendi e amadureci muito, e parte disso devo a ela, que nunca mediu esforços para discutir sobre farmacologia, meus resultados e sobre novas ideias para o meu projeto de pesquisa. Agradeço por ser sempre presente, pela paciência e por todo incentivo, amizade e ensinamentos, um grande exemplo de pessoa e profissional. Sou muito grata por tudo.

Ao **Prof Tiago Sampaio**, pela orientação, amizade, confiança, paciência e incentivo de sempre. Obrigada por ter me acolhido e por todos os ensinamentos.

A minha coorientadora **profa Geanne Matos** e aos colegas que fazem parte do LNC por todo suporte inicial a minha pesquisa.

Aos colaboradores do LBFBC, **Prof Tiago, Profa Alice e Prof Ramon**, pelo apoio em todos os aspectos, sejam financeiros, estrutural e de aprendizagem. Obrigada por terem me acolhido.

Aos colegas e amigos do LBFBC, pelo companheirismo, convivência e amizade durante essa fase, em especial, obrigada **Emanuel Magalhães, Lívia, Nicole, Brenna e Dânya** por toda ajuda na execução dos meus experimentos.

Aos meus amigos e parceiros de pesquisa **Pedro Everson e Emanuel** por todo apoio.

A todos os meus amigos, em especial as minhas fies amigas **Katharine, Thais e Manoela** pela amizade e companheirismo dentro e fora do laboratório. Sou grata a Deus por ter vocês na minha vida.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**) pela bolsa de estudo concedida.

Ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia pela promoção do meu crescimento pessoal e intelectual.

A todos que contribuíram, torceram e acompanharam minha caminhada de alguma forma, **MUITO OBRIGADA!!**

RESUMO

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA 1 α ,25-DIHIIDROXIVITAMINA D3 (VD3) SOBRE A NEUROTOXICIDADE INDUZIDA PELA ROTENONA EM CÉLULAS PC12: UM MODELO *in vitro* DE DOENÇA DE PARKINSON

A doença de Parkinson (DP) é uma doença neurodegenerativa caracterizada pela perda de células dopaminérgicas na *substância nigra, pars compacta*. O cérebro de pacientes com DP também apresenta neuroinflamação, estresse oxidativo e disfunção mitocondrial. Dentre os agentes neuroprotetores testados atualmente, a vitamina D (VD3) aparece como um composto potencialmente eficaz na prevenção da neurodegeneração e morte celular. Assim, o presente estudo tem como objetivo avaliar a atividade neuroprotetora de VD3 em células PC12 (modelo *in vitro* de doença de Parkinson) e em astrócitos (diretamente envolvidos na neuroinflamação e assim na fisiopatologia da DP), após exposição à rotenona (ROT). Os parâmetros de viabilidade celular foram avaliados pelo teste de MTT e marcação com 7-AAD em células PC12 e astrócitos tratadas e não tratadas com VD3 (0,1; 0,5 e 1 ng/mL) e/ou ROT (10 μ g/mL ou 5 μ g/mL), sendo também, a produção citoplasmática de ROS e o perfil de morte celular mensurados por citometria de fluxo. Além disso, foram avaliados o potencial transmembrânico mitocondrial, medidas de redução do acúmulo de glutatona e superóxido e alterações ultraestruturais. Estudos *in silico* (docking molecular) e mensuração da expressão de Tirosina hidroxilase (TH) e Nf- κ B (por Western blot) nas células PC12 foram também realizadas. Os resultados mostraram que a VD3 melhorou a viabilidade das células previamente tratadas e em seguida expostas a ROT, reduzindo a ocorrência de possíveis eventos necróticos e apoptóticos. Além disso, as células expostas à ROT apresentaram aumento na produção de ROS e acúmulo de superóxido, que diminuíram significativamente com o tratamento prévio com VD3. Importante, a diminuição da ROT no potencial transmembrânico mitocondrial foi significativamente prevenida após o tratamento das células com VD3, especialmente na concentração de 1 ng/mL. Além disso, a VD3 demonstrou interagir fortemente com a enzima TH, conforme observado nos estudos de docking molecular realizados com células PC12. A expressão da TH nestas células tratadas com ROT diminuiu de forma significativa, enquanto o tratamento com VD3 e posterior exposição com ROT aumentou significativamente. A expressão do NF- κ B aumentou no tratamento com ROT, enquanto células tratadas com a VD3 nas concentrações avaliadas e em seguida expostas a ROT foi capaz de proteger contra esse estímulo inflamatório, reduzindo a expressão deste fator de transcrição. Portanto o tratamento com VD3 protege ambas linhagens celulares dos danos causados pela ROT, diminuindo o estresse oxidativo, melhorando a função mitocondrial, aumentando a expressão de TH (em células PC12) e causando diminuição de fatores pró-inflamatórios, como o NF- κ B, sugerindo seu papel citoprotetor neste modelo de DP. Um provável alvo parece ser a molécula de TH, uma etapa limitadora da taxa de síntese de dopamina. No entanto, uma investigação mais aprofundada é necessária em relação à participação e mecanismo de ação de VD3 neste modelo celular de DP.

Palavras-chave: Células PC12; astrócitos, doença de parkinson; rotenona; vitamina D; estresse oxidativo.

ABSTRACT

EVALUATION OF THE EFFECTS OF 1 α ,25-DIHYDROXIVITAMIN D3 (VD3) ON ROTENONE-INDUCED NEUROTOXICITY IN PC12 CELLS: AN IN VITRO MODEL OF PARKINSON'S DISEASE

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disease characterized by the loss of dopaminergic cells in the *substantia nigra, pars compacta*. The brains of PD patients also present neuroinflammation, oxidative stress and mitochondrial dysfunction. Among the neuroprotective agents currently tested, vitamin D (VD3) appears as a potentially compound in prevention of neurodegeneration and cell death. Thus, the aim of this study is evaluating the neuroprotective effect of VD3 in PC12 cells (*in vitro* model of Parkinson's disease) and in astrocytes (directly involved in neuroinflammation and in the pathophysiology of PD), after exposure to rotenone (ROT). Cell viability was assessed by MTT test and 7-AAD labeling in PC12 cells and astrocytes treated and untreated with VD3 (0.1; 0.5 and 1 ng / mL) and/or ROT (10 μ g/mL or 5 μ g/mL), and ROS production and cell death events measured by flow cytometry. Additionally, mitochondrial transmembrane potential, measures of glutathione and superoxide accumulation reduction and cell morphology were evaluated. *In silico* studies (molecular docking) and expression of tyrosine hydroxylase (TH) and NF- κ B (Western blot) in PC12 cells were also performed. The results showed that VD3 improved the viability of cells previously treated and then exposed to ROT, preventing the occurrence of possible necrotic and apoptotic events. In addition, cells exposed to ROT showed increasement in ROS production and superoxide accumulation, which significantly decreased with previous treatment with VD3. Importantly, ROT decreased the mitochondrial transmembrane potential, which was significantly prevented by VD3, especially at a concentration of 1 ng/mL. Moreover, VD3 has been shown to interact strongly with TH, as observed by molecular docking experiments performed with PC12 cells. TH expression in these cells treated with ROT significantly decreased, whereas treatment with VD3 and subsequent exposure with ROT significantly increased. The expression of NF- κ B increased in the treatment with ROT, while cells treated with VD3 at the concentrations evaluated and then exposed to ROT were able to protect against this inflammatory stimulus, reducing the expression of this transcription factor. Therefore, treatment with VD3 protects both cell lines from damage caused by ROT, decreasing oxidative stress, improving mitochondrial function, increasing TH expression (in PC12 cells) and causing a decrease in pro-inflammatory factors, such as NF- κ B, suggesting its role cytoprotective in this PD model. A likely target appears to be the TH molecule, a rate-limiting step in dopamine synthesis. However, further investigation is needed regarding the participation and mechanism of action of VD3 in this cellular model of PD.

Keywords: PC12 cells; astrocytes; parkinson's disease; rotenone; vitamin D; oxidative stress.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. INTERAÇÕES TEÓRICAS ENTRE 1 α , 25-DIHIIDROXIVITAMINA D3 (VD3) E O INIBIDOR DE TIROSINA HIDROXILASE, ALFA-METIL-PARA-TIROSINA (AMPT) COM TIROSINA HIDROXILASE (TH)	69
--	----

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1. ESTIMATIVA GLOBAL DA DP.	16
FIGURA 2. SÍNTESE DA DOPAMINA.	17
FIGURA 3. IMPORTÂNCIA DOS ASTRÓCITOS NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL (SNC) E NA PATOGÊNESE DA (DP).	21
FIGURA 4. AS VIAS DE ADMINISTRAÇÃO E OS MECANISMOS DE LESÃO DAS NEUROTOXINAS DOPAMINÉRGICAS.	22
FIGURA 5. MODELO QUE ILUSTRA OS MECANISMOS MOLECULARES IMPLICADOS NA NEUROTOXICIDADE INDUZIDA POR ROTENONA EM NEURÔNIOS DOPAMINÉRGICOS.	25
FIGURA 6. O METABOLISMO E A BIOATIVIDADE DA VITAMINA D.	27
FIGURA 7. FUNÇÕES CLÁSSICAS E NÃO CLÁSSICAS DA VD3.	28
FIGURA 8. DESENHO EXPERIMENTAL.	34
FIGURA 9. PRINCÍPIO DO TESTE DE REDUÇÃO DO MTT.	35
FIGURA 10. PRINCÍPIO DA ANÁLISE POR CITOMETRIA DE FLUXO.	37
FIGURA 11. PRINCÍPIO DA METODOLOGIA DE AVALIAÇÃO DO MECANISMO DE MORTE CELULAR.	38
FIGURA 12. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ANÁLISE DE ERO CITOPLASMÁTICAS USANDO DCFH-DA.	40
FIGURA 13. PRINCÍPIO DE FUNCIONAMENTO DO MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE VARREDURA.	42
FIGURA 14. INTERCONVERSÃO DA GLUTATIONA EM SUAS DUAS FORMAS: REDUZIDA (GSH) E OXIDADA (GSSG) PELA AÇÃO DAS ENZIMAS GLUTATIONA PEROXIDASE (GSH-Px), GLUTATIONA OXIDASE (GO) E GLUTATIONA REDUTASE (GR).	43
FIGURA 15. REPRESENTAÇÃO DA ANÁLISE DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT.	45
FIGURA 16. ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR DE REDUÇÃO DO MTT MOSTRANDO A VIABILIDADE DA VD3 EM CÉLULAS PC12.	50
FIGURA 17. ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR POR MTT MOSTRANDO A TOXICIDADE DA ROTENONA EM CÉLULAS PC12 EM A E ASTRÓCITOS EM B.	51
FIGURA 18. ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO COM O MARCADOR 7AAD E POR MTT MOSTRANDO A PROTEÇÃO DA VD3 FRENTE A TOXICIDADE DA ROTENONA EM CÉLULAS PC12 EM A E ASTRÓCITOS EM B RESPECTIVAMENTE.	52
FIGURA 19. REPRESENTAÇÃO DO ENSAIO DE AVALIAÇÃO DA VIA DE MORTE CELULAR EM CÉLULAS PC12 EM A E EM ASTRÓCITOS EM B. AS CÉLULAS NECRÓTICAS FORAM MARCADAS POR 7AAD, ENQUANTO AS CÉLULAS APOPTÓTICAS FORAM MARCADAS POR ANEXINA V.	54

FIGURA 20. GRÁFICOS DENSITY PLOT REPRESENTATIVOS DA DENSIDADE COMPARATIVA DA AVALIAÇÃO DA VIA DE MORTE CELULAR. AS CÉLULAS NECRÓTICAS FORAM MARCADAS POR 7AAD, ENQUANTO AS CÉLULAS APOPTÓTICAS FORAM MARCADAS POR ANEXINA V EM CÉLULAS PC12.	55
FIGURA 21. GRÁFICOS DENSITY PLOT REPRESENTATIVOS DA DENSIDADE COMPARATIVA DA AVALIAÇÃO DA VIA DE MORTE CELULAR. AS CÉLULAS NECRÓTICAS FORAM MARCADAS POR 7AAD, ENQUANTO AS CÉLULAS APOPTÓTICAS FORAM MARCADAS POR ANEXINA V EM CULTURA DE ASTRÓCITOS.	56
FIGURA 22. ANÁLISE DO ESTRESSE OXIDATIVO E PRODUÇÃO DE ERO CITOPLASMÁTICAS EM CÉLULAS DE PC12 EM A E EM ASTRÓCITOS EM B POR CITOMETRIA DE FLUXO ATRAVÉS DO ENSAIO UTILIZANDO O DCFH-DA.	58
FIGURA 23. HISTOGRAMA REPRESENTATIVO DO ENSAIO COM DCFH-DA, APRESENTADO EM CÉLULAS PC12.	59
FIGURA 24. HISTOGRAMA REPRESENTATIVO DO ENSAIO COM DCFH-DA, APRESENTADO EM ASTRÓCITOS.	60
FIGURA 25. ANÁLISE DO POTENCIAL TRANSMEMBRÂNICO MITOCONDRIAL EM CÉLULAS DE PC12 EM A E EM ASTRÓCITOS EM B POR CITOMETRIA DE FLUXO ATRAVÉS DO ENSAIO UTILIZANDO A RODAMINA 123.	61
FIGURA 26. HISTOGRAMA REPRESENTATIVO DO ENSAIO COM RODAMINA 123, APRESENTADOS EM CÉLULAS PC12.	62
FIGURA 27. HISTOGRAMA REPRESENTATIVO DO ENSAIO COM RODAMINA 123, APRESENTADOS EM ASTRÓCITOS.	63
FIGURA 28. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA EM CÉLULAS PC12.	65
FIGURA 29. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA EM ASTRÓCITOS.	66
FIGURA 30. AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO ATRAVÉS DA MENSURAÇÃO DOS NÍVEIS DE GLUTATIONA REDUZIDA (GSH) EM CÉLULAS PC12 EM A E EM ASTRÓCITOS EM B.	67
FIGURA 31. AVALIAÇÃO DO ACUMULO DE SUPERÓXIDO (SOD) EM CÉLULAS PC12.	68
FIGURA 32. INTERAÇÃO DA ENZIMA TIROSINA HIDROXILASE (TH), VD3 E AMPT.	70
FIGURA 33. FOTOGRAFIA REPRESENTATIVA DO ENSAIO DE WESTERN BLOT, REPRESENTANDO A EXPRESSÃO DE NF-KB EM CÉLULAS PC12 EM COMPARAÇÃO COM A EXPRESSÃO DE A-TUBULINA EM CÉLULAS EXPOSTAS À ROT.	72
FIGURA 34. EXPRESSÃO RELATIVA DE NF-KB EM CÉLULAS PC12 PRÉ-TRATADAS COM (VD3) E EM SEGUIDA ROT.	72
FIGURA 35. FOTOGRAFIA REPRESENTATIVA DO ENSAIO DE WESTERN BLOT, REPRESENTANDO A EXPRESSÃO DE TIROSINA HIDROXILASE (TH) EM CÉLULAS PC12 EM COMPARAÇÃO COM A EXPRESSÃO DE A-TUBULINA EM CÉLULAS EXPOSTAS À ROT.	73
FIGURA 36. EXPRESSÃO RELATIVA DE TH EM CÉLULAS PC12 PRÉ-TRATADAS COM (VD3) E EM SEGUIDA ROT.	73
FIGURA 37. FLUXOGRAMA COM A CORRELAÇÃO DOS ACHADOS DO PRESENTE TRABALHO.	81

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

VD3 – 1 α ,25-dihidroxitamina D3

7AAD – 7-amino-actinomycin.

Anx / PE - Annexin V-PE, kit de detecção de apoptose

DCFH-DA – Diacetato de Diclorofluoresceína.

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle's Medium.

DMSO – Dimethylsulfóxido.

ERO – Espécies reativas de oxigênio.

ERN – Espécies reativas de nitrogênio

GSH – Glutathiona reduzida.

MTT - 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide.

NADPH – Nicotinamida e Adenina Dinucleotídeo Fosfato.

PBS – Phosphate Buffer Solution.

Rho123 – Rodamina 123.

RPMI - Roswell Park Memorial Institute

SDS – Dodecilsulfato de Sódio.

$\Delta\Psi_m$ –Potencial Transmembranico Mitochondrial.

PC12 – linhagem derivada de feocromocitoma de rato transplantável

SH-SY5Y - Linhagem celular de neuroblastoma humano

SOD - Superóxido dismutase

SEM - Microscopia eletrônica de varredura

AMPT - alfa-metil-p-tirosina

OS - Estresse oxidativo

FL1 - Intensidade de fluorescência relativa para medições de ROS

FL2 - Medições de fluorescência mitocondrial

TH - Tirosina hidroxilase

NF κ B - Fator de transcrição nuclear kappa B

BDNF – Fator neurotrófico derivado de células gliais

NGF – Fator de crescimento neuronal

Sumário

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. Doença de Parkinson: epidemiologia, fisiopatologia e etiologia	15
<i>1.1.1. Estresse oxidativo, inflamação e papel da glia na DP</i>	19
1.2. Modelos pré-clínicos para estudo da DP	21
<i>1.2.1. Neurotoxicidade da Rotenona (ROT)</i>	24
1.3. Vitamina D (VD3)	26
<i>1.3.1 Biossíntese e metabolismo da VD3</i>	26
<i>1.3.2. Vitamina D e Doença de Parkinson</i>	29
2. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA	31
3. OBJETIVOS	32
3.1 Objetivo Geral	32
3.2 Objetivos Específicos	32
4. MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1 Fonte da 1 α ,25-dihidroxitamina D3	33
4.2 Manutenção e Cultivo Celular	33
4.3 Ensaios de citotoxicidade – teste da MTT	34
4.4 Citometria de Fluxo	36
<i>4.4.1 Avaliação do mecanismo de morte celular.</i>	37
<i>4.4.2 Análises da produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) Citoplasmáticas</i>	39
4.5 Microscopia Eletrônica de Varredura	41
4.6 Avaliação do equilíbrio óxido-redutor em células PC12 e Astrócitos	42
<i>4.6.1 Determinação dos níveis de Glutathiona reduzida (GSH)</i>	42
<i>4.6.2 Superóxido dismutase (SOD) em células PC12</i>	43
4.7. Estudo <i>in silico</i>	44
<i>4.7.1. Docking molecular</i>	44
4.8. Western Blot em Células PC12	44
<i>4.8.1. Extração e quantificação de proteínas</i>	46
<i>4.8.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida e transferência</i>	47
4.9. Análise Estatística.....	49
5. RESULTADOS	50
5.1. Ensaios de viabilidade celular por MTT e citometria de fluxo	50
5.2. Avaliação do mecanismo de morte celular	53
5.3. Análise da produção de ERO citoplasmáticas	57

5.4. Avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial	60
5.5. Microscopia Eletrônica de Varredura de Células PC-12 e Astrócitos.....	64
5.6. Avaliação do equilíbrio óxido-redutor.....	66
5.7. Acumulação de superóxido em células PC12 avaliada por medições de atividade de superóxido dismutase (SOD).....	67
5.8. Ensaio de <i>Docking</i> molecular	68
5.9 Avaliação da expressão de TH e NF-kB células PC12 por Western Blot.....	70
5. DISCUSSÃO.....	74
6. CONCLUSÃO.....	82
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	83
REFERÊNCIAS.....	84

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doença de Parkinson: epidemiologia, fisiopatologia e etiologia

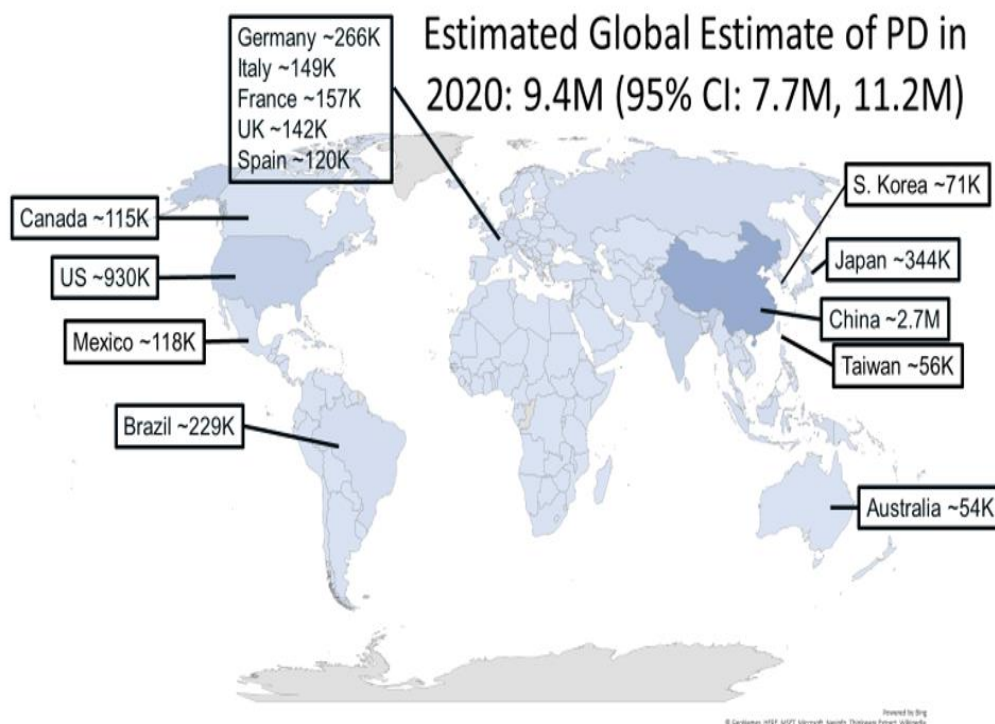
A Doença de Parkinson (DP) se caracteriza por distúrbios motores como rigidez muscular, tremor de repouso, bradicinesia e perda progressiva e tardia de reflexos posturais. O bloqueio motor e a postura fletida são particularidades que comumente aparecem no parkinsonismo. O diagnóstico da DP deve ser avaliado levando em consideração os sintomas motores e não motores de cada paciente, além de avaliar se o paciente faz uso de algum medicamento que possa gerar parkinsonismo medicamentoso, como antipsicóticos por exemplo (SAIKI; SATO; HATTORI, 2012; WHITE et al., 2009).

Os aspectos clínicos da DP apresentam uma interseção entre sintomas motores, mudanças cognitivas, mudanças comportamentais/neuropsiquiátricas e sintomas relacionados a falhas no sistema nervoso autônomo (SNA). Esses sintomas estão associados, principalmente, à deficiência de dopamina (DA) nos núcleos da base, (BENAZZOUZ et al., 2014).

Dentre as doenças neurodegenerativas mais comum, a DP está representando a segunda mais comum, ficando atrás apenas da doença de Alzheimer. Ela afeta a população idosa com mais de 60 anos, representando 1% (SPRENGER; POEWE, 2013).

Nos estudos de prevalência a estimativa para os próximos anos, do número de pessoas com DP nos cinco países mais populosos da Europa Ocidental e nos 10 países mais populosos do mundo, incluindo o Brasil. Estimou-se que o número de pessoas com DP acima de 50 anos que nesses países estava em torno de 4,1 e 4,6 milhões em 2005, irá dobrar para números entre 8,7 e 9,3 milhões de pessoas em 2030 (ER et al., 2007). Em estudos mais recente foi estimado que globalmente 9,4 milhões de casos de DP em 2020, sendo que no Brasil a estimativa foi de 220 mil pessoas com DP (figura 1). O aumento nas estimativas de prevalência de DP chama a atenção para o aumento da carga individual e social e a necessidade urgente de medidas de prevenção da doença (MASEREJIAN; VINIKOOR-IMLER; DILLEY, 2020).

Figura 1. Estimativa global da DP.



Fonte: (MASEREJIAN; VINIKOOR-IMLER; DILLEY, 2020)

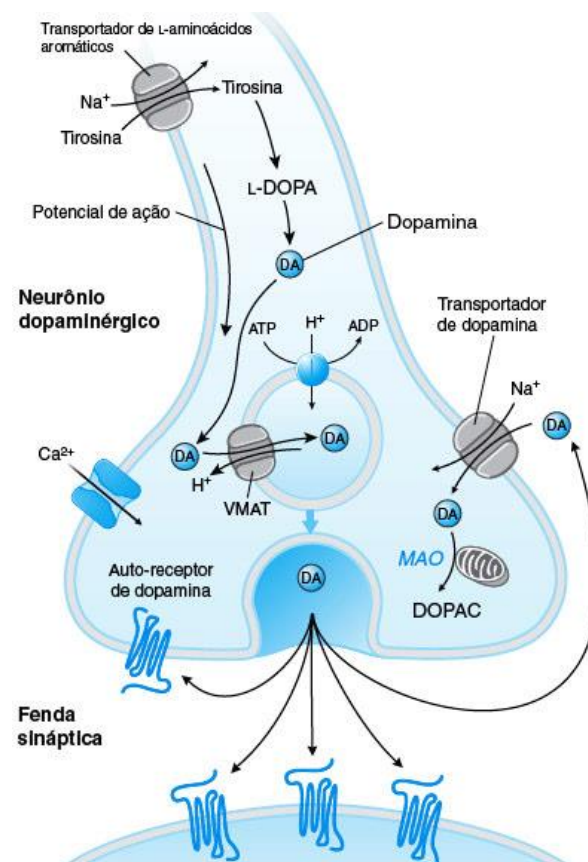
A DP é uma doença neurodegenerativa multissistêmica que prejudica várias vias neuronais e sistemas de neurotransmissores, é considerada uma doença crônica e progressiva. Quando os sintomas clínicos são detectados, ela já se encontra em um estado bem avançado, como também quase que a metade das células dopaminérgicas da substância negra perdidas e depleção de aproximadamente 80% da dopamina do estriado. Devido a mecanismos de compensação pré e pós-sinápticos, os sintomas clínicos demoram a aparecer, isso faz com que as características clínicas não se manifestem até que o sistema seja incapaz de compensá-las (POEWE et al., 2017; SIMON; TANNER; BRUNDIN, 2020).

A tirosina é um aminoácido essencial precursor de todas as catecolaminas. Sendo a maior parte da tirosina adquirida na dieta, e uma pequena proporção também pode ser sintetizada no fígado a partir da fenilalanina. Na síntese da dopamina (DA) a tirosina vem como etapa inicial e consiste na conversão da tirosina em L-DOPA (L-3,4-dihidroxifenilalanina) por oxidação da posição 3 no anel de benzeno. Essa reação é catalisada pela enzima tirosina hidroxilase (TH), uma ferro-enzima constituída de quatro subunidades idênticas. É importante salientar que a oxidação da tirosina a L-DOPA é a

etapa que limita a velocidade na produção não apenas da DA, mas também de todos os neurotransmissores da família das catecolaminas. Em seguida e última etapa da síntese é a conversão da L-DOPA em DA pela enzima aminoácido aromático descarboxilase (AADC). A AADC cliva o grupo carboxila do carbono da cadeia lateral de etilamina, liberando dióxido de carbono. A AADC requer o cofator fosfato de paradoxal (RANG et al., 2015).

A DA livre no citosol é rapidamente captada pelo transportador vesicular de monoaminas (VMAT) que utiliza um gradiente eletroquímico de prótons para transportá-la para o interior das vesículas, este apresenta duas isoformas: VMAT-1, localizados na periferia, e VMAT-2, presente em estruturas do SNC como mostrado na (figura 2) (GOLAN et al., 2009). As vesículas contendo o neurotransmissor fundem-se à membrana do neurônio pré-sináptico, após influxo de cálcio pelos canais de cálcio sensíveis a voltagem (STAAL; MOSHAROV; SULZER, 2004).

Figura 2. Síntese da dopamina.



Fonte: (GOLAN et al, 2009).

Os neurotransmissores são liberados e se ligam aos receptores devido à elevação na concentração do cálcio intracelular. A transmissão dopaminérgica termina através da captação do neurotransmissor para o terminal neuronal pelo transportador de dopamina (DAT). O neurotransmissor é bombeado novamente para a vesícula sináptica para ser reutilizado ou é degradado pela enzima monoamina-oxidase (MAO) (SIEGEL et al., 2005). Parte dessa dopamina que se difunde da fenda sináptica é liberada da forma não clássica, chamada transmissão por volume, ou sofre degradação pela enzima catecol-O-metiltransferase (RICE, 2000). Os efeitos dopaminérgicos são exercidos pela ligação com receptores pré e pós sinápticos. Os receptores dopaminérgicos pertencem às famílias D1 (englobando os tipos D1 e D5) e D2 (D2, D3 e D4). Todos estes receptores são metabotrópicos (atuam via proteína G), sendo que os D1 ativam a adenil ciclase, ativando a cascata de síntese do AMP cíclico, enquanto os D2 inibem a adenil ciclase (SIEGEL; ALBERS, 2006).

Ocorre mudanças conformacionais nos circuitos dos núcleos da base a medida que ocorre disfunção de dopamina. A principal característica fisiopatológica da DP é uma atividade de disparo neuronal aumentada nas vias de saída dos gânglios da base (formado pelo globo pálido interno (GPi) e SN reticulata (SNr)), levando a uma excessiva inibição dos sistemas motores tálamo-cortical e do tronco cerebral. Aparentemente esse fato é o resultado de uma menor inibição da via estriatal “direta” e de um aumento da atividade dos neurônios GABAérgicos estriato-palidais da via indireta, causando uma maior excitação dos neurônios subtalâmicos (GASH et al., 2008; ROMMELFANGER; WICHMANN, 2010).

A DP envolve não apenas a degeneração de neurônios dopaminérgicos no SNC, também tem como característica a presença de inclusões esféricas citoplasmáticas, os chamados corpos de Lewy, caracterizados como uma densa camada granular cercada por um halo que cresce em filamentos. Principalmente os agregados α -sinucleína e ubiquitina, que juntamente com outros fatores dentro dos corpos de Lewy existem principalmente, contribuem para a degeneração dos neurônios dopaminérgicos. O acúmulo de α -sinucleína leva a uma cascata de reações que resulta no bloqueio do sistema ubiquitina-proteossoma, levando ao dano mitocondrial e conseqüentemente à morte neuronal (ALARCÓN-ARÍS et al., 2020; MARIJA USENOVIC et al., 2012).

(VALKO et al., 2007) relatou que a redução nos níveis de dopamina estriatal parece ser a principal responsável pelos sintomas da DP. A perda destes neurônios que

normalmente são ricos em neuromelanina, resulta em despigmentação da SN (RAZA; ANJUM; SHAKEEL, 2019).

Apesar da DP ser bem caracterizada, a causa da doença ainda vem sendo estudada e não é completamente esclarecida até o momento. Vários fatores estão envolvidos com a etiologia da DP, dentre eles podemos citar os fatores genéticos, e ambientais (6-hidroxi-dopamina, 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetra-hidropiridina, paraquat e rotenona) (XIAN-SI; GENG; JIA, 2018).

1.1.1. Estresse oxidativo, inflamação e papel da glia na DP

O estresse oxidativo ocorre quando existe um desequilíbrio entre as substâncias pró-oxidantes e antioxidantes. Mostrou-se estar associado com espécies reativas de oxigênio (ERO), espécies reativas de nitrogênio (ERN) e vias de sinalização do óxido nítrico (NO), através das quais o NO biodisponível diminui e a produção de ERO e ERN aumenta. Todo este processo é induzido por respostas inflamatórias e processos metabólicos mitocondriais subsequentes que geram moléculas de radicais livres altamente reativas. O cérebro humano consome cerca de 20% do oxigênio produzido, sendo este o principal produtor de radicais livres. Maior parte da energia produzida é utilizada para retomar o potencial de repouso das células excitatórias. Nesse sentido, o SNC possui uma grande quantidade de mitocôndrias com o objetivo de suprir essa grande quantidade de energia, tornando-o altamente vulnerável a qualquer disfunção desta organela (BERRA; MENCK; DI MASCIO, 2006).

A disfunção mitocondrial está envolvida, principalmente, na via de inibição do complexo I, falhas bioenergéticas, mutações no DNA mitocondrial, mutações genéticas no DNA nuclear, síntese e liberação excessiva de EROs e ativação de mecanismos pró-apoptóticos (PERIER; VILA, 2012; HADDAD; NAKAMURA, 2015; BOSE; BEAL, 2016; HANAA HIBISHY GABALLAH et al., 2016)

Na DP, como em outras doenças neurológicas como epilepsia, doença de Alzheimer, esclerose e isquemia cerebral, há evidência de elevada quantidade de mediadores inflamatórios em tecidos cerebrais, mostrando a importância da inflamação na fisiopatologia destas doenças (STEPHENSON et al., 2018).

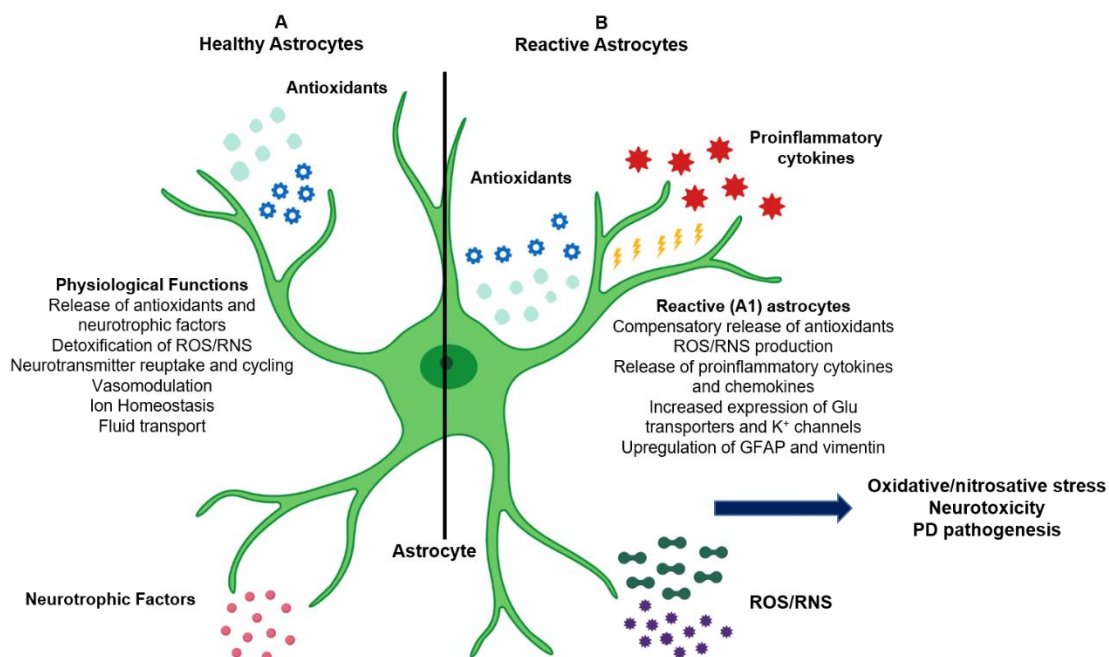
A neuroinflamação ocorre em regiões cerebrais lesionadas, o que pode ser devido a espécies reativas de oxigênio (ERO), óxido nítrico (NO), citocinas e quimiocinas produzidas por células da glia ativadas. A produção excessiva de moléculas neurotóxicas

causa mais danos neuronais (HUANG et al., 2015). O estresse oxidativo é considerado um dos mecanismos patológicos causadores da DP, o que tem levado à investigação de diversas moléculas antioxidantes como potencial tratamento terapêutico contra a doença (DUARTE-JURADO et al., 2021).

Células da glia fazem parte do Sistema Nervoso e dentre suas diversas funções destacam-se o auxílio no suporte e as ações no funcionamento do sistema nervoso central. A micróglia por exemplo é a célula glial que desempenha o papel imunomodulador no SNC. Os astrócitos são as células gliais encontradas em maior quantidade no SNC, tendo importância no suporte trófico, metabólico e estrutural dos neurônios. A interação entre os astrócitos e os neurônios em situações fisiológicas é conhecida de longa data (KHURGEL; IVY, 1996; SOFRONĬEW, 2005).

Os astrócitos são células que tem como característica a hiperprodução de citocinas e fatores neurotróficos que podem interferir no metabolismo e na sobrevivência neuronal, isso porque estas moléculas regulam a sinalização sináptica e podem também apresentar influência sobre o desenvolvimento das células neuronais precursoras do SNC. Quando ocorre alguma lesão no SNC, os astrócitos tornam-se reativos, estado no qual a célula deflagra mecanismos de neuroproteção. A reatividade dos astrócitos é uma característica patológica de várias doenças neurodegenerativas, devido a expressão excessiva dessas citocinas pró- inflamatórias além provocar a ativação de outros mecanismos fisiológicos, ocasionando mais neurotoxicidade (figura 3) (DRINGEN; SCHEIBER; MERCER, 2013; RIZOR et al., 2019). A exposição a toxinas ambientais, como 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetra-hidropiridina (MPTP), rotenona e manganês (Mn), pode contribuir para a indução de astrogliose reativa e consequente estresse oxidativo / nitrosativo astrocítico (MASATOSHI INDEN et al., 2006; MIRZAEI et al., 2006; SENTHILKUMAR S KARUPPAGOUNDER et al., 2016).

Figura 3. Importância dos astrócitos no sistema nervoso central (SNC) e na patogênese da (DP).



Em (A) Os astrócitos fornecem suporte estrutural e metabólico aos neurônios, medeiam a neurotransmissão e o transporte de glutamato e mantêm a homeostase iônica e vascular. Os astrócitos também secretam antioxidantes endógenos (como glutatona (GSH) e superóxido dismutase (SODs)) e fatores neurotróficos no microambiente extracelular e são responsáveis pela desintoxicação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERO / ERN) produzidas como subprodutos do metabolismo. (B) Astrócitos reativos produzem antioxidantes adicionais, citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias ERO / ERN. A astrogliose reativa crônica leva ao estresse oxidativo / nitrosativo astrocítico, neuroinflamação, apoptose neuronal e patogênese da DP (RIZOR et al., 2019).

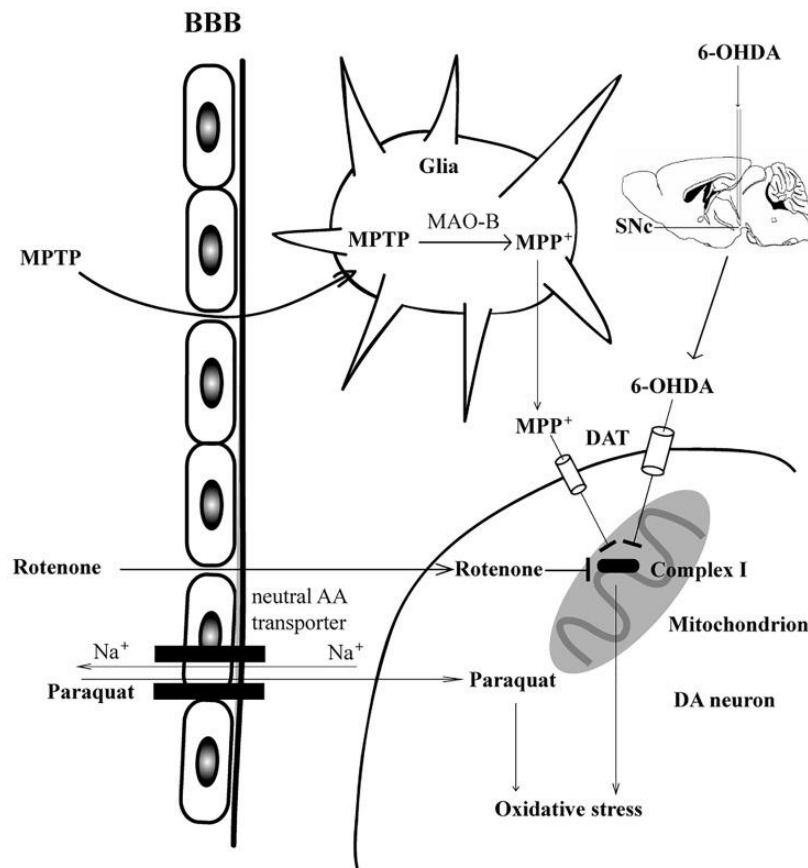
1.2. Modelos pré-clínicos para estudo da DP

Para melhor entender o mecanismo de morte neuronal, é importante conhecer mais da fisiopatologia da DP. Isso contribuirá para o desenvolvimento de modelos animais e de cultura de células desenvolvidos para identificar possíveis alvos para uma farmacoterapia cada vez mais seletiva e eficaz (HANROTT K et al, 2006; SHERER et al., 2002).

(JORDI BOVÉ et al., 2005) desenvolveram modelos experimentais de DP utilizando-se de neurotoxinas dopaminérgicas e modelos de linhagens genéticas com deleção genética para a doença. O uso de substâncias capazes de destruir seletivamente neurônios dopaminérgicos, principalmente, da indução de estresse oxidativo foi e tem sido muito útil no estudo da DP. MPTP, paraquat, rotenona e 6-OHDA são as toxinas

usadas para induzir a neurodegeneração dopaminérgica. Todas essas toxinas levam a formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, provocando estresse oxidativo e posterior dano neuronal (Figura 4) (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003; XIAN-SI; GENG; JIA, 2018).

Figura 4. As vias de administração e os mecanismos de lesão das neurotoxinas dopaminérgicas.



A 6-OHDA deve ser administrado por injeção intracerebral no SNc ou corpo estriado, onde é transportado para os neurônios dopaminérgicos por DAT. MPTP, rotenona e paraquat são administrados sistemicamente porque podem cruzar o BBB. O MPTP é metabolizado pela MAO-B nas células gliais em MPP⁺, que também é transportado para os neurônios dopaminérgicos pelo DAT. A rotenona entra diretamente nos neurônios dopaminérgicos devido à sua hidrofobicidade. 6-OHDA, MPP⁺ e rotenona inibem a atividade do complexo I e resultam em neurodegeneração dopaminérgica. O transportador neutro de aminoácidos medeia a entrada dependente de Na⁺ do paraquat nos neurônios dopaminérgicos, onde prejudica a reciclagem redox e induz estresse oxidativo, levando à morte neuronal. 6-OHDA = 6-hidroxi-dopamina; MPTP = 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetra-hidropiridina; MPP⁺ = íon 1-metil-4-fenilpiridínio (XIAN-SI; GENG; JIA, 2018).

Modelos celulares compostos de culturas neuronais primárias ou linhagens de células semelhantes a neurônios são comumente usados para estudar a morte de células neuronais e para testar as propriedades neuroprotetoras potenciais de novos medicamentos (GRAU; GREENE, 2012). Para estudos de neurodegeneração, um dos

modelos mais utilizados tem sido a linhagem celular PC12, derivada de feocromocitoma de rato transplantável. Essas células têm a maquinaria para sintetizar, liberar, captar e armazenar catecolaminas, das quais a principal é a dopamina. Assim, a linhagem celular PC12 é comumente usada na pesquisa neurocientífica para estudar neurotoxicidade, neuroproteção, neurosecreção, neuroinflamação e sinaptogênese também (BENITA WIATRAC et al., 2020).

O fator de crescimento neuronal (NGF) pode diferenciar a linhagem PC12, e elas podem adquirir características mais adrenérgicas. O (NGF) fazem as células adquirir uma morfologia semelhante a um neurônio simpático, expressarem neuritos e ficarem mais excitáveis. Aquelas células de PC12 não diferenciadas expressam tirosina hidroxilase (TH) e o transportador de dopamina (DAT) (GREENE; REIN, 1977; GREENE; TISCHLER, 1976).

Um outro modelo *in vitro* para estudo de DP é a linhagem de células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y) (LOPES et al., 2010). Essas células possuem características de neurônios dopaminérgicos, tem capacidade de sintetizar DA e noradrenalina (NA), além de expressarem tirosina e dopamina- β -hidroxilase, assim como DAT, uma proteína presente somente em neurônios dopaminérgicos do SNC (MEDEIROS et al., 2019). Elas também expressam receptores de DA, mesmo que em baixos níveis, podem ser diferenciadas morfológica e bioquimicamente na presença de substâncias específicas, como o ácido retinóico (AR), adquirindo assim, um fenótipo neuronal dopaminérgico ainda mais pronunciado (CHEUNG et al., 2009).

Outras linhas de pesquisas mais atuais incluem o estudo dos astrócitos como células que manifestam as marcas patológicas da DP. Os astrócitos são células gliais que, por muito tempo, pensou-se que funcionavam apenas como células de suporte para os neurônios, mas, hoje, são conhecidas por terem um papel muito mais extenso. Estudos *in vitro* mostram que astrócitos de indivíduos com DP manifestam disfunção na depuração da α -sinucleína, principal componente dos agregados citoplasmáticos neuronais chamados corpos de Lewy (DI DOMENICO et al., 2019; ERUSTES et al., 2018). Além disso, a resposta inflamatória manifestada por reações gliais e o aumento de citocinas inflamatórias e de outros mediadores derivados de células gliais ativadas são reconhecidos como características proeminentes da DP (TUFEKCI et al., 2012).

A grande capacidade de proliferação que as células possuem, mostram o quanto é vantajoso o uso de cultura de célula. Como são decorrentes de um único progenitor, a população de células é relativamente homogênea e por esse motivo elas se mostram como uma ótima opção para um *screening* de drogas que possam agir como neuroprotetoras em modelos de DP (COLLINS; NEAFSEY, 2002).

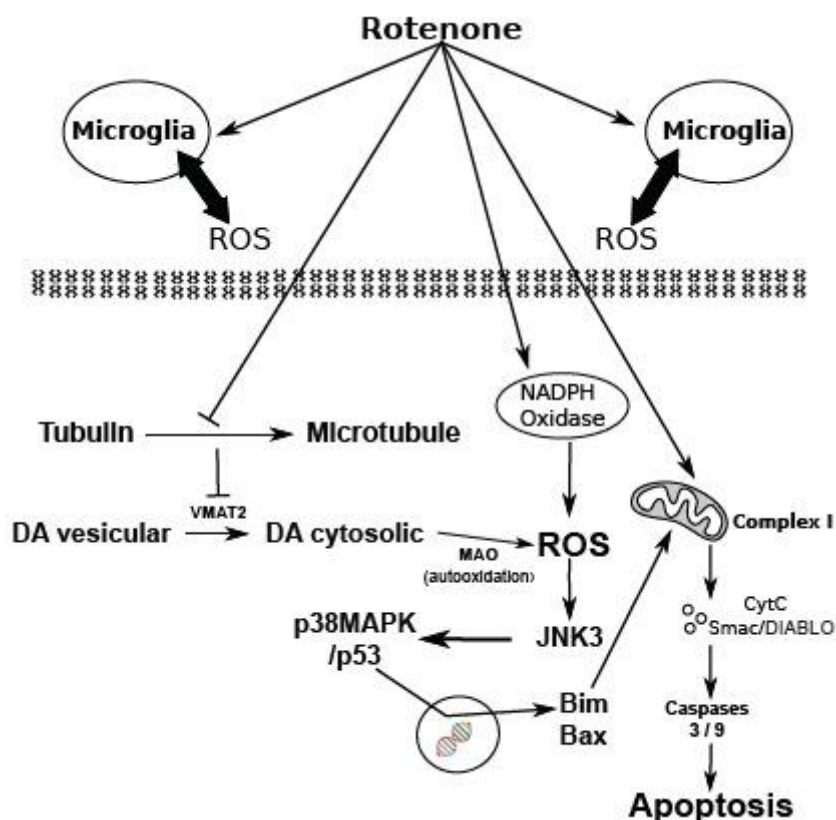
1.2.1. Neurotoxicidade da Rotenona (ROT).

A rotenona é um pesticida usado em todo o mundo que induz as características mais comuns da DP por inibição direta do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial. A disfunção do complexo I é traduzida em um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e em um menor suprimento de energia. No cérebro, os neurônios dopaminérgicos são uma das células mais suscetíveis (MATHIEU MARELLA et al., 2009; NISTICÒ et al., 2011). Numerosos estudos mostraram que a disfunção das mitocôndrias pode desempenhar papéis importantes na perda neuronal da Doença de Alzheimer. Os fatores genéticos e ambientais que estão associados à DP contribuem para a disfunção mitocondrial e a patogênese da DP. Além disso, a indução de DP por neurotoxinas que inibem o complexo mitocondrial I fornece evidências diretas ligando a disfunção mitocondrial à DP. Além disso, a diminuição da atividade do complexo mitocondrial I está presente no cérebro com DP e em modelos celulares e animais de DP induzida por neurotoxina ou fator genético (BOSE; BEAL, 2016a).

Os modelos de Parkinson induzidos por rotenona, bem como tecidos cerebrais de pacientes com DP, são caracterizados pela presença de marcadores de peroxidação lipídica e de oxidação de proteínas resultantes do aumento do nível de espécies de radicais livres (FRANCO-IBORRA; VILA; PÉRIER, 2016). Neurotoxicidade induzida por rotenona em células PC12 tem sido amplamente estudado para elucidar a patogênese da doença de Parkinson (CHANG-HWAN IM et al., 2013). A administração de rotenona pode interferir na distribuição e metabolismo da dopamina, levando ao acúmulo de dopamina no citoplasma das células PC12, o que pode contribuir para a formação de ROS e morte celular. Além disso, a administração de rotenona induz alterações bioquímicas, moleculares e histológicas semelhantes às da DP em ratos, levando à perda seletiva de neurônios dopaminérgicos no SNpc (YAN SAI et al., 2008). A (figura 5) mostra um

modelo que ilustra os mecanismos moleculares implicados na neurotoxicidade induzida por rotenona em neurônios dopaminérgicos.

Figura 5. Modelo que ilustra os mecanismos moleculares implicados na neurotoxicidade induzida por rotenona em neurônios dopaminérgicos.



A rotenona favorece a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) no citoplasma por três mecanismos diferentes que incluem: 1) Pela despolimerização dos microtúbulos. Quando os microtúbulos são despolimerizados, o transporte vesicular de dopamina (DA) é interrompido, o que resulta em aumento da concentração de DA citosólica e consequente aumento dos níveis de ROS devido à auto-oxidação da DA causada pelas monoamino oxidases (MAO). 2) Por inibição do complexo I da cadeia mitocondrial e 3) Por ativação de várias enzimas geradoras de ROS como a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) -oxidases. É importante notar que a rotenona pode induzir estresse oxidativo neuronal (OS) por meio da ativação da microglia. O acúmulo de ROS leva a OS devido à oxidação dos ácidos nucléicos, proteínas e lipídios que medeiam a ativação das cascatas de sinalização que levam à apoptose. VMAT2: Transportador vesicular de monoamina 2; p38MAPK: proteína quinases ativadas por mitogênio p38; JNK3: cinase 3 do terminal N de c-Jun; Bim: mediador que interage com Bcl-2; CytC: citocromo c; Smac: segundo ativador de caspases derivado da mitocôndria; DIABLO: proteína de ligação direta a IAP com baixo PI. (BISBAL; SANCHEZ, 2019).

1.3. Vitamina D (VD3)

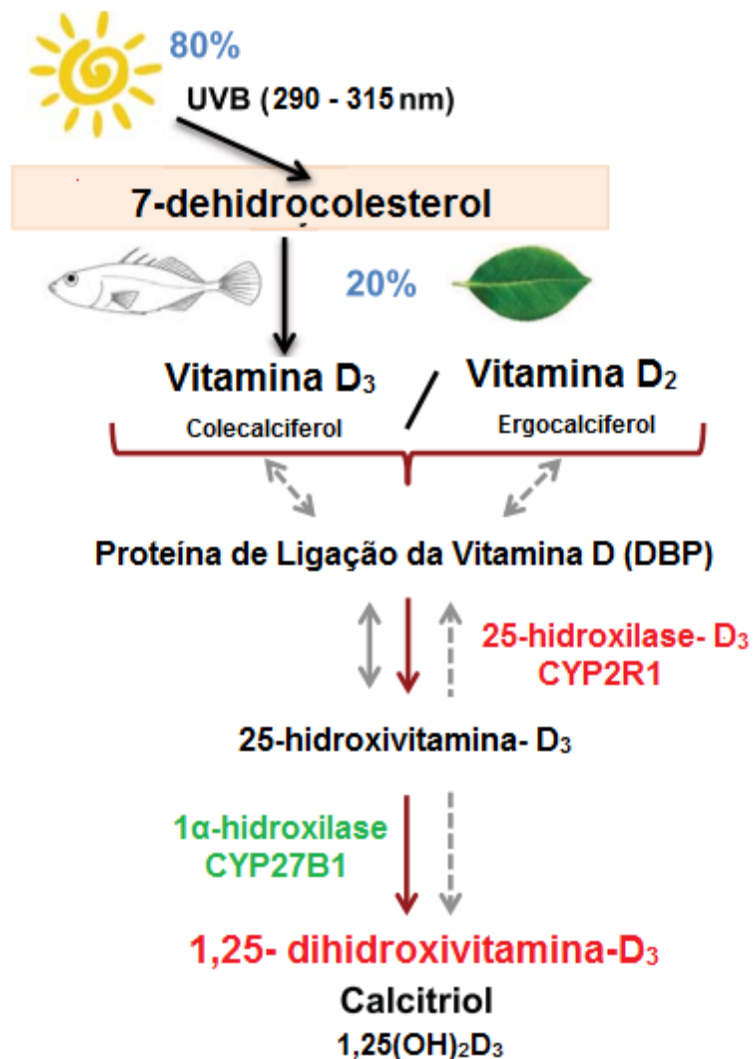
1.3.1 *Biossíntese e metabolismo da VD3*

O precursor semelhante ao colesterol (7-deidrocolesterol) nas células epidérmicas da pele pode ser convertido após a radiação UVB em pré-vitamina D, que também se isomeriza em vitamina D₃. Ambas as vitaminas D₃ e D₂ são biologicamente inativas. Para se tornarem em formas ativas, primeiro, ele sofre 25-hidroxilação no fígado para 25 (OH) D (calcidiol), a principal forma circulante de vitamina D. Em seguida, é convertido nos rins por meio de 1-alfa-hidroxilação em sua forma mais ativa, 1,25 (OH)₂ D₃ (calcitriol). Este processo é conduzido pelo hormônio da paratireóide (PTH) e outros mediadores, incluindo hipofosfatemia e hormônio do crescimento. A 1-alfa-hidroxilação também ocorre em locais não renais, como macrófagos alveolares, osteoblastos, linfonodos, placenta, cólon, mamas e queratinócitos, sugerindo possível papel autócrino-parácrino de 1,25 (OH)₂ D₃. O metabolismo e a bioatividade da vitamina D está apresentado na (figura 6).

A vitamina D funciona por meio de um receptor de vitamina D (VDR) pertencente à família de receptores esteroides. O VDR é expresso em quase todas as células humana. Seu papel biológico mais relevante é promover a diferenciação de enterócitos e a absorção intestinal de cálcio, facilitando a homeostase do cálcio. No momento da hipocalcemia, o nível plasmático de cálcio ionizado cai e isso é detectado pelos receptores de cálcio da glândula paratireóide. O PTH é secretado pela glândula paratireoide, que estimula a 1-alfa-hidroxilação nos rins para produzir mais 1,25 (OH)₂ D₃ da 25 (OH) D circulante. A elevação de 1,25 (OH)₂ D₃ aumenta o transporte de cálcio dentro dos intestinos, ossos e rins e regula ainda mais a atividade dos osteoblastos e osteoclastos. À medida que o cálcio plasmático volta ao normal, a secreção adicional de PTH diminui. Esta alça fisiológica da homeostase da vitamina D e do cálcio demonstra que a 25 (OH) D circulante suficiente é essencial para manter a síntese de 1,25 (OH)₂ D₃ e o nível de cálcio plasmático adequados. Em situações de deficiência de vitamina D pode provocar circulação inadequada de 25 (OH) D, levando a uma diminuição da síntese de 1,25 (OH)₂ D₃ e a menos absorção de cálcio, elevando os níveis de PTH. Além disso, porque os VDRs são encontrados não apenas no intestino delgado, mas também no cólon, osteoblastos, linfócitos T e B ativados, células mononucleares, células das ilhotas beta e órgãos principais, como cérebro, coração, pele, gônadas, próstata e seios (CHUN et al.,

2014; JOHN S ADAMS; HEWISON, 2010; MARGOLIS; CHRISTAKOS, 2010; PEARCE; CHEETHAM, 2010).

Figura 6. O metabolismo e a bioatividade da vitamina D.

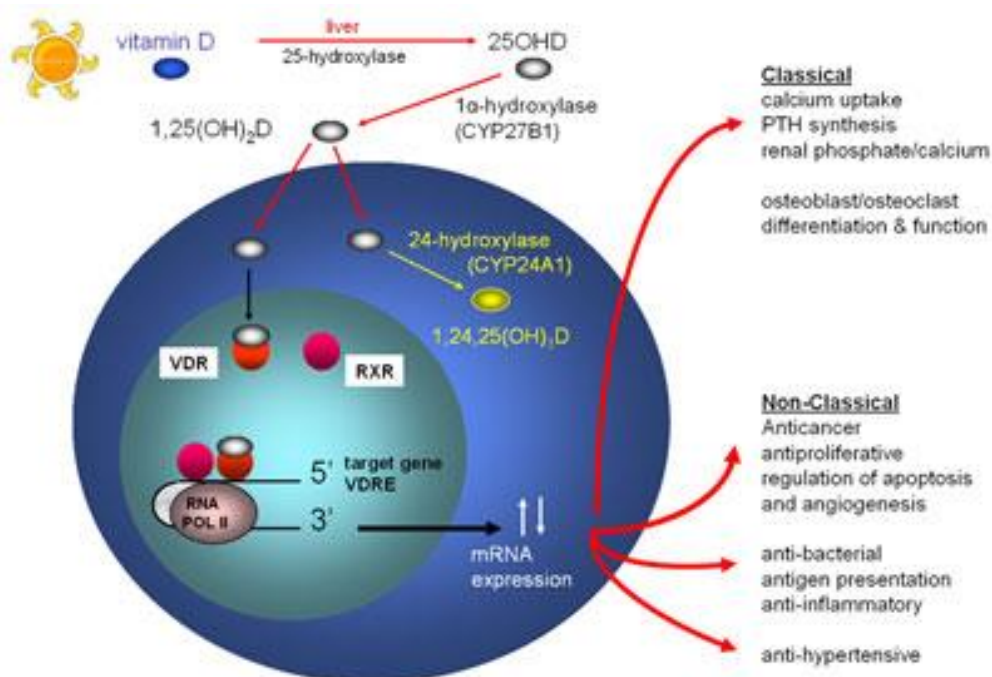


Fonte: (Landel et al. 2016 (Adaptado) por Lima, L. A. R, 2018).

Classicamente, a vitamina D tem sido implicada na saúde óssea por promover a absorção de cálcio no intestino e manutenção das concentrações séricas de cálcio e fosfato. Além disso, a vitamina D é importante para o crescimento e reorganização óssea por meio de sua ação sobre osteoblastos e osteoclastos. No entanto, nas últimas duas décadas, novas ações da vitamina D foram descobertas. O metabólito ativo da 1,25 (OH)

1,25 (OH)₂ D₃ vitamina D (VD₃), também conhecido como calcitriol, regula não apenas a homeostase do cálcio e do fósforo, mas também a proliferação e diferenciação celular, e tem um papel fundamental nas respostas dos sistemas imunológico e nervoso. Os efeitos atuais da vitamina D incluem desintoxicação xenobiótica, redução do estresse oxidativo, funções neuroprotetoras, defesa antimicrobiana, imunorregulação, ações anti-inflamatórias / anticâncer e benefícios cardiovasculares. Como já foi relatado, o mecanismo de ação do calcitriol é mediado pelo receptor da vitamina D, uma subfamília de receptores nucleares que atuam como fatores de transcrição nas células-alvo após formar um heterodímero com o receptor de retinóide X. Esse tipo de receptor foi encontrado em praticamente todos os tipos de células, o que pode explicar suas múltiplas ações em diferentes tecidos. Assim, além das ações clássicas relacionadas à homeostase mineral, a vitamina D tem novas ações na proliferação e diferenciação celular, regulação do sistema imune inato e adaptativo, efeitos preventivos em doenças cardiovasculares e neurodegenerativas e até efeitos antienvhecimento (figura 7) (GIL; PLAZA-DÍAZ; MESA, 2018).

Figura 7. Funções clássicas e não clássicas da VD₃.



Fonte: (Vitamin D Research Lab, UCLA (USA)).

1.3.2. Vitamina D e Doença de Parkinson

A vitamina D ao longo das últimas décadas, tornou-se cada vez mais estudada e vem sendo observado os seus efeitos biológicos não apenas na manutenção da homeostase de cálcio e fosfato. A $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ apresenta atividade pleitrópica estando relacionada com a regulação da expressão de vários genes, além de estar envolvido em múltiplos processos celulares, com efeitos sobre o crescimento e diferenciação de células normais e malignas, sobre a resposta imune e inflamatória, na resposta ao estresse oxidativo e disfunção mitocondrial e portanto controla o processo de envelhecimento em humano (WIMALAWANSA, 2019). Ainda, a hipovitaminose D está relacionada a maior incidência de diversos tipos de câncer, doença autoimune, doenças cardiovasculares, disfunção do TGI, diabetes tipo 1 e doenças neurodegenerativas como a DP (CHRISTAKOS et al., 2015; GATTO et al., 2015; JOSHI et al., 2011).

Devido a redução da ingestão de vitamina D, diminuição da síntese cutânea e aumento da adiposidade, foi observado que a ocorrência de hipovitaminose D é mais significativa em pessoas idosas. Dessa forma, evidencias indicam que a hipovitaminose D crônica desempenha um papel relevante na patogênese da DP. Levando em consideração o mecanismo biológico sugerido, o estado continuamente inadequado de vitamina D pode provocar a neurodegeneração dopaminérgica estando relacionada diretamente com a DP (K, 2012; LV et al., 2014; NEWMARK; NEWMARK, 2007; RIMMELZWAAN et al., 2016).

Dentre os agentes neuroprotetores testados atualmente, a vitamina D aparece como um potencial produto para impedir a neurodegeneração e morte celular. Embora a vitamina D tenha sido descoberta no início do século 20 como uma vitamina, ela é reconhecida como um pró-hormônio esteroide que precisa sofrer duas reações de hidroxilação para se transformar na sua forma ativa 1,25-dihidroxitamina D (MCCOLLUM et al., 1922; DELUCA, 2004). Recentemente, a vitamina D vem se destacando apresentando algumas ações não clássicas, como imunomodulação, efeito antioxidante, efeito antiapoptose, regulação da transição epitelial-mesenquimal e atividade anti-inflamatória (ALBERT J CZAJA; MONTANO-LOZA, 2019; ZHU-XIA TAN et al., 2016). Vários estudos mostraram que a vitamina D pode reprimir a inflamação através da interação entre o VDR e a subunidade p65 do NF-kB (ZHU-XIA TAN et al., 2016).

A 1,25-dihidroxitamina D₃ se liga ao receptor nuclear da vitamina D (VDR), amplamente distribuído pelo organismo. Os receptores VDR podem estar altamente expressos nos neurônios e nas células da glia, sendo distribuídos no sistema nervoso periférico e no central, o qual concentram-se em grande parte no hipotálamo e na substância negra (HOLICK, 2015; I et al., 1994; MILLET et al., 2014) (NEVEU et al., 1994; MILLET et al., 2014; HOLICK, 2015). O papel potencial da vitamina D no tratamento da doença de Parkinson tem sido discutida com base em estudos epidemiológicos, os quais mostraram que a hipovitaminose crônica da vitamina D indicaria um protagonismo na patogênese da DP, e, posteriormente, em mecanismos biológicos sugeridos, indicando que um estado contínuo de deficiência da vitamina D pode desencadear a neurodegeneração dopaminérgica associando-se, assim, diretamente com a DP (K, 2012; LV et al., 2014; NEWMARK; NEWMARK, 2007; RIMMELZWAAN et al., 2016).

A forma ativa da vitamina D calcitriol é um componente essencial para manter a atividade fisiológica da cadeia respiratória nas mitocôndrias, contribuindo para a geração de energia (CONSIGLIO et al., 2015; WYCKELSMA et al., 2017). Consequentemente, um baixo nível de cadeia de transporte de elétrons aumenta a formação de ERO e estresse oxidativo, fenômeno comum após a exposição aguda e crônica a toxinas e muitas doenças crônicas e visto no envelhecimento (BOSE; BEAL, 2016b).

Evidências indicam que pacientes com DP têm níveis mais baixos de vitamina D do que os controles saudáveis e que as concentrações de vitamina D estão negativamente correlacionadas com o risco e a gravidade da DP. Além disso, concentrações mais altas de vitamina D estão associadas a melhores funções cognitivas e humor em pacientes com DP (LV et al., 2020). Um dos achados mais relevante na literatura é a associação inversa entre o nível sérico de vitamina D e a gravidade dos sintomas motores em estudos transversais da DP. A relação entre vitamina D e sintomas não-motores é menos clara. Existem algumas evidências de que a vitamina D está associada à fluência verbal e à memória verbal. Estudos em pacientes com DP também mostraram associações entre os níveis de vitamina D e humor, hipotensão ortostática e prejuízo olfatório em pacientes DP (FULLARD; DUDA, 2020a).

2. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

Dados recentes mostram um aumento preocupante na incidência da DP no Brasil (36 mil casos surgem por ano no país) e a estimativa é que em 2030, mais de 600 mil brasileiros sejam diagnosticados com DP (PRINGSHEIM et al., 2014), por isso a necessidade de busca por novas terapias, não somente que reduzam a perda dopaminérgica, e os consequentes distúrbios motores, como também que vise diminuir as complicações associadas como a demência e a depressão, as quais agravam as complicações associadas à doença. Sabe-se que existe um forte componente inflamatório na DP sendo assim, novas substâncias neuroprotetoras estão sendo testadas, e compostos com atividade antioxidante/anti-inflamatório podem ser promissores no tratamento adjuvante, na prevenção e/ou na inibição da progressão da DP.

A vitamina D vem sendo estudada e tem sido demonstrado seu potencial para a neuroproteção, aumentando a expressão do fator neurotrófico derivado da glia (GDNF), a restauração dos níveis de tirosina hidroxilase (TH) e a inibição da ativação microglial, além de modular a concentração de dopamina (BEGOÑA SANCHEZ et al., 2009; PAUL KNEKT et al., 2010; PETERSON; MANCINI; HORAK, 2013; ROWAN P ORME; BHANGAL; FRICKER, 2013; SMITH et al., 2006; THACHER; CLARKE, 2011; WAYNE A CASS et al., 2014). É importante salientar que um recente trabalho mostrou que a Vitamina D reverte várias alterações observadas em modelo experimental de DP em ratos (LIMA et al., 2018). Entretanto, ainda se faz necessário mais pesquisas relacionadas à ação biológica da vitamina D em modelos experimentais de DP, mostra a importância do presente estudo para investigar o efeito neuroprotetor da VD3 em células PC12 e de astrócitos tratadas com rotenona e impulsionar estudos posteriores relacionadas ao uso da VD3 na DP.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade neuroprotetora da VD3 em modelo de toxicidade celular induzida pela Rotenona em células de feocromocitoma de rato (PC12) e em astrócitos murino, considerando-se a importância dessas células na fisiopatologia da neuroinflamação e da DP.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar os efeitos da VD3 sobre a citotoxicidade em modelo de morte celular induzido pela ROT em cultura de células PC12 e astrócitos;
- Avaliar o padrão de morte celular com marcação com as substâncias fluorescentes Anexina V-PE (Ax/PE) (conjugada com ficoeritrina) e 7-aminoactinomicina (7-AAD) em células PC12 e astrócitos expostas a ROT;
- Verificar a ação da VD3 sobre o estresse oxidativo (EO) induzido pela rotenona em células PC12 e em astrócitos, analisando os níveis de glutathiona reduzida (GSH) e a produção de espécie reativa de oxigênio (ERO) por citometria;
- Avaliar a ação da VD3 no aumento do potencial transmembranico mitocondrial induzido por ROT nas células PC12 e astrócitos;
- Investigar a influência da VD3 sobre a expressão de TH e do fator pró-inflamatória NF-kB em células PC12 e expostas a ROT.
- Avaliar a interação da VD3 com a enzima TH, enzima limitante na síntese da dopamina, através de simulações por docking molecular.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Fonte da 1 α ,25-dihidroxitamina D3

A 1 α ,25-dihidroxitamina D3 foi obtida da Sigma-Aldrich Brasil Ltda, armazenada respeitando as orientações do fabricante. Ela foi diluída na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ em isopropanol estéril visando a produção de uma solução-mãe. Em seguida, as soluções usadas no trabalho foram preparadas por diluição seriada em solução salina tampão fosfato estéril (PBS, constituído de NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; KH₂PO₄ 1,47 mM; Na₂HPO₄ 8,1 mM; pH 7,4) com o objetivo de obter as concentrações de 1 α ,25-dihidroxitamina D3 iguais a 10; 1,0; 0,5; 0,1 ng/mL nos experimentos.

4.2 Manutenção e Cultivo Celular

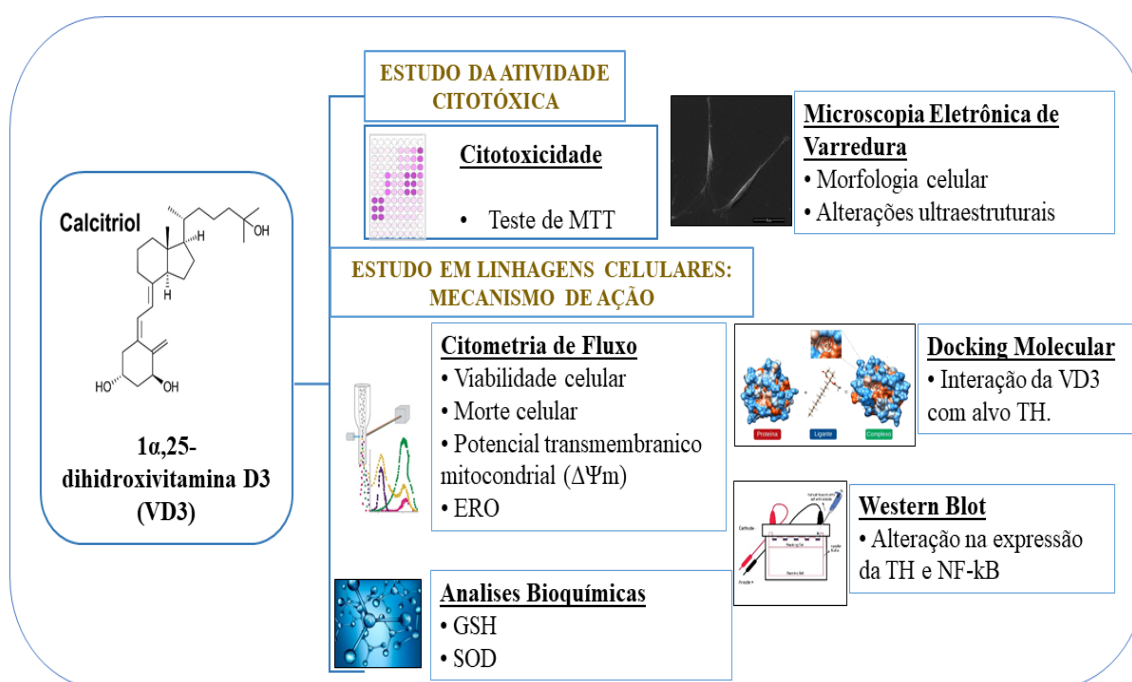
As linhagens de células utilizadas foram a linhagem de feocromocitoma de rato, PC12 (APABCAM, Rio de Janeiro, RJ, BRA) e a linhagem de astrócitos murinos, isolada e atribuída pelo grupo da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) seguindo os protocolos descritos anteriormente (ERUSTES et al., 2018). As células foram cultivadas em garrafas polietileno para cultura (75 cm^2 , volume de 250 mL) nos meios roswell park memorial institute (RPMI) e dulbecco modified eagles minimal essential medium (DMEM) respectivamente e suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% da mistura penicilina/estreptomicina, até confluência. As células foram incubadas em estufa a temperatura de 37°C numa atmosfera de 5% de CO₂ e o crescimento celular foi observado a cada 24 horas com a ajuda do microscópio de inversão.

Após 80% de confluência, as células foram deslocadas utilizando tripsina 0.05% em EDTA 0,53 mM. A suspensão de células foi contada em hemocítmetro do tipo câmara de Neubauer e sua a densidade celular avaliada com auxílio do corante de exclusão azul de Tripán e posteriormente sub-cultivada em placas multi-wells de 6, 24, 48 ou 96 poços (a variar de acordo com o procedimento em que foram submetidos), a uma concentração de 1×10^5 células/poço.

Em relação ao preparo da solução de rotenona, esta foi diluída em DMSO puro e preparada na hora da experimentação já que se trata de uma substância fotossensível. A concentração usada foi dissolvida em PBS. Foram realizadas curvas com várias concentrações de rotenona (0,5, 1, 5, 10 e 20 $\mu\text{g/mL}$) Com o objetivo de se obter a

concentração capaz de reduzir a viabilidade em 50% (IC_{50}) nas células PC12 e astrócitos, e de $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D3 (0,1, 0,5 e 1,0 ng/mL) para a escolha das concentrações a serem utilizadas nos experimentos. A rotenona foi utilizada sozinha ou 24h após a adição da $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D3. Posteriormente a aplicação das substâncias as células foram incubadas por 24h em estufa 5% de CO_2 , após esse período as células foram utilizadas nos experimentos. A (figura 8) resume o planejamento experimental adotado neste trabalho.

Figura 8. Desenho experimental.



Fonte: Elaborado pela autora.

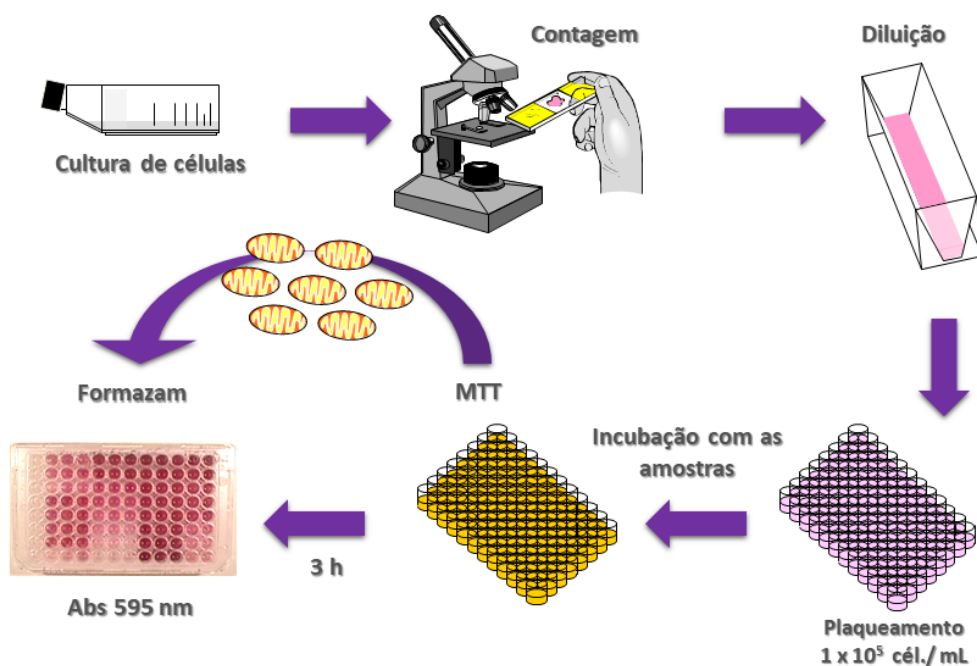
4.3 Ensaios de citotoxicidade – teste da MTT

Para avaliar a citotoxicidade foi usado o ensaio MTT (MOSMANN, 1983), que baseia-se na capacidade da succinato desidrogenase, uma enzima do Ciclo de Krebs ativa em mitocôndrias e no citosol de células viáveis, em converter o sal de tetrazólio (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, ou MTT), que é hidrossolúvel e de cor amarelada, em cristais de formazan, que são de cor púrpura. Essa técnica tem a capacidade

de analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula, sendo assim, bastante útil para avaliar a citotoxicidade (DENIZOT; LANG, 1986).

Nesse ensaio a $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D3 foi adicionado nas concentrações de 0,1, 0,5 e 1,0 ng/mL à cultura, 24h antes da rotenona (protocolo de prevenção). Decorridas 24h de incubação, as células foram incubadas, por 3 horas, com um novo meio (200 μ L) contendo 10% de MTT, na concentração de 5mg/mL em cada poço. Após este período, o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 150 μ L de DMSO puro, para a lise das células e solubilização do formazan. Logo após as placas foram colocadas em agitador de placas por 15 minutos. Após a agitação, a absorbância foi medida em leitor de microplacas a 595 nm (figura 9). A inibição da redução do MTT indica a diminuição da viabilidade celular. Os experimentos foram realizados em quadruplicata e repetidos em três diferentes dias.

Figura 9. Princípio do teste de redução do MTT.



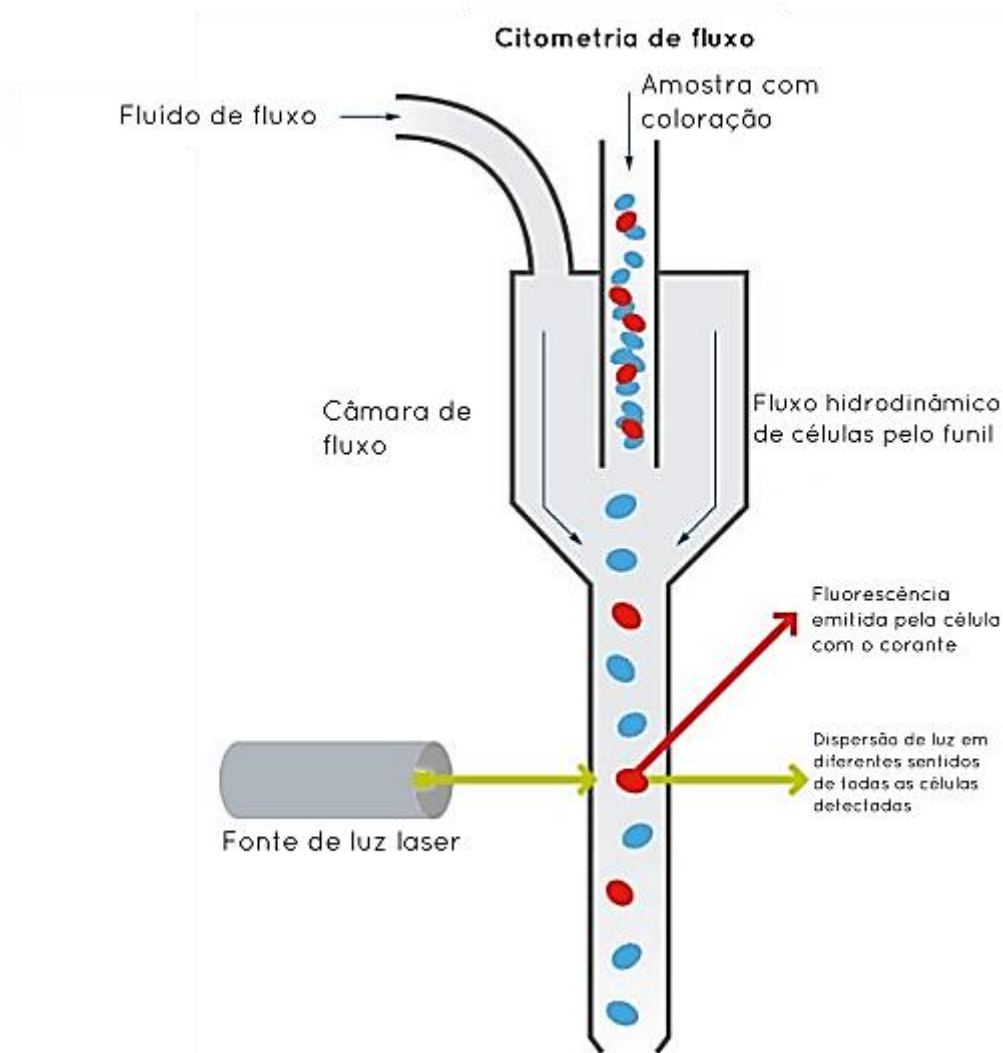
Fonte: Elaborado pela autora.

4.4 Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo possibilita investigar e classificar inúmeras alterações e características de eventos biológicos em células ou outras partículas microscópicas. O equipamento citômetro possui um feixe de luz (*laser*) que incide sobre as células, à medida que elas fluem individualmente sob um fluxo hidrodinâmico, permitindo a detecção dos sinais desviados por cada célula. Os detectores são capazes de registrar desvios na dispersão linear (FSC, *Forward Scatter*) ou lateral (SSC, *Side Scatter*) da luz, além de captar a fluorescência emitida pelos marcadores utilizados, classificando as células de partículas com cada evento (figura 10) (GIVAN, 2004).

As linhagens celulares foram plaqueadas em placas de 24 poços e incubadas com $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D3 por 24h e em seguida tratadas por 24h antes da realização da marcação com fluorocromo com a rotenona. Após soltura das células com tripsina, foram adquiridas dez mil células de cada grupo, detectadas pelo laser de argônio, analisadas no equipamento FACSCalibur (BD Biosciences, New Jersey, USA) utilizando o *CellQuest ProTM software*. No presente trabalho, três parâmetros foram avaliados através da citometria de fluxo: perfil de morte celular, acúmulo de espécies reativas de oxigênio citosólicas e potencial transmembrânico mitocondrial.

Figura 10. Princípio da análise por citometria de fluxo.



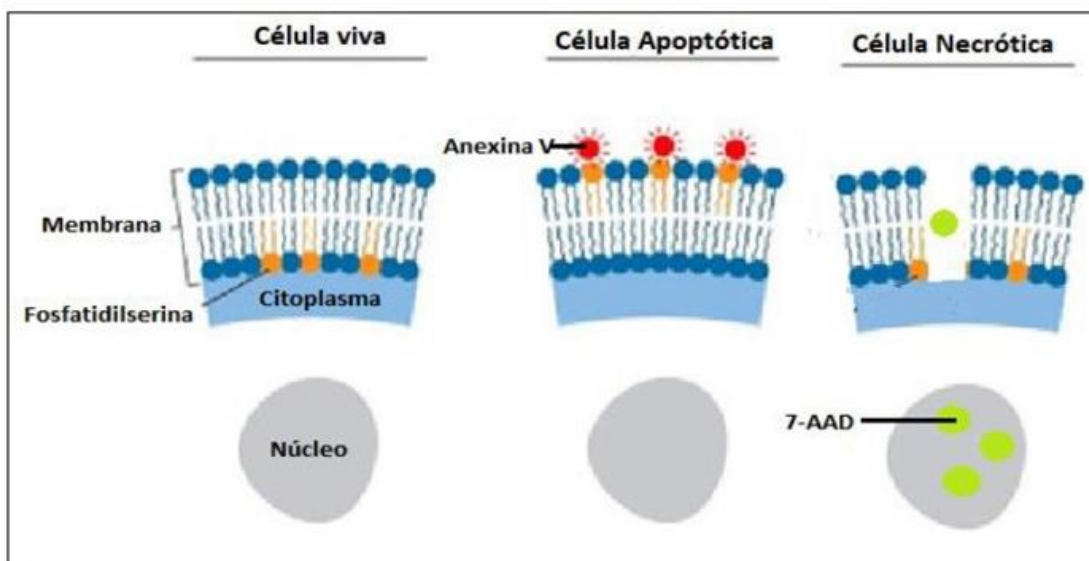
Fonte:(<https://bioemfoco.com.br/noticia/o-que-e-citometria-de-fluxo-e-qual-sua-aplicacao-para-a-saude/>).

4.4.1 Avaliação do mecanismo de morte celular.

A avaliação do mecanismo de morte celular foi realizada utilizando a marcação com as substâncias fluorescentes Anexina V-PE (Ax/PE) (conjugada com ficoeritrina) e 7-aminoactinomicina (7-AAD) conforme representado na (figura 11). O evento de externalização do fosfolípídeo de membrana denominado fosfatidilserina é um dos primeiros a ocorrer quando a célula inicia o processo apoptótico. Este ensaio permite diferenciar células viáveis, apoptóticas e necróticas pela coloração diferencial por

fluorescência. A detecção das células apoptóticas é feita pela ligação da anexina V conjugada a Ficoeritrina (PE) com a fosfatidilserina externalizada de fluorescência verde. As células necróticas são coradas pelo 7-AAD (emitem fluorescência de cor vermelha) que penetra as membranas celulares desintegradas e se ligam ao núcleo. Células sem marcação pelos corantes são viáveis, verdes são consideradas apoptóticas e positivas para os dois corantes são consideradas dupla marcação, (ROCHA et al., 2012).

Figura 11. Princípio da metodologia de avaliação do mecanismo de morte celular.



Fonte: (Sampaio, T. L., 2018).

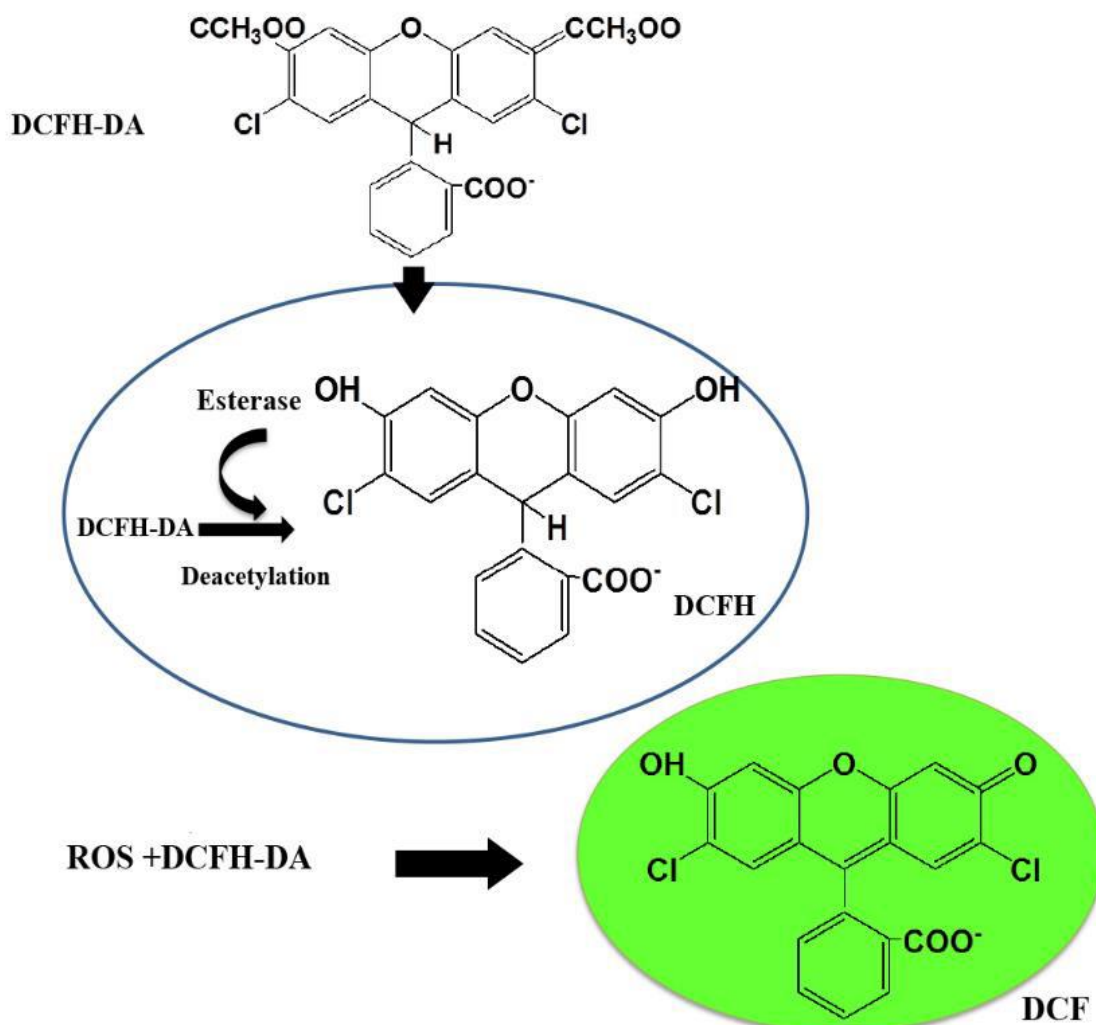
Para realização da análise, as células de cada poço foram suspensas em 100 μL de tampão de ligação; nos tubos foram adicionados 5 μL de 7AAD e 5 μL de Ax/PE (0,5 mg/mL cada). O procedimento foi realizado utilizando um kit comercial (Anexin V PE Apoptosis Detection Kit I, BD Biosciences) e respeitando as orientações do fabricante. Após 15 minutos de incubação no escuro, foi adicionado 400 μL de tampão de ligação em cada tubo e as células foram analisadas no FACSCalibur (BD Biosciences). Os resultados foram expressos em percentual de células não marcadas; células marcadas por 7-AAD, indicativo de necrose; células marcadas por Anexina V, indicativo de apoptose; e células duplamente marcadas, indicativo de apoptose tardia.

4.4.2 Análises da produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) Citoplasmáticas.

O ensaio baseia-se em uma sonda não-fluorescente 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) que atravessa livremente a membrana das células, provendo um substrato oxidável (DCFH). O DCFH-DA é um composto estável não-fluorescente lipofílico que facilmente atravessa a membrana das células. Dentro da célula, enzimas citosólicas (esterases) desacetilam o DCFH-DA para formar a 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH) a qual, devido a sua polaridade, fica confinada no citoplasma. Espécies reativas de oxigênio geradas durante a explosão respiratória oxidam o DCFH formando a 2',7'-diclorofluoresceína oxidada (DCFoxi), que possui fluorescência verde, com excitação em 488 nm e detecção em 515-545 nm pelo sensor FL1. A fluorescência verde produzida pela formação de DCFoxi é proporcional à capacidade oxidativa da célula. Desta forma a intensidade da fluorescência intracelular se torna uma medida dos metabólitos oxidativos produzidos pelas células (figura 12) (ARANDA et al., 2013).

Para a incorporação do DCFH no interior das células, 5µL (concentração final 20 µM) da solução estoque foram adicionados aos poços da placa de 24 poços contendo as células em cultivo 3 horas após o tratamento com a 1α,25-dihidroxitamina D3 e rotenona. Ao término das 24 horas do tratamento, as amostras foram lavadas com PBS, tripsinizadas e o pellet de células processado em citômetro de fluxo. Assim, a média de intensidade de fluorescência relativa produzida durante a explosão respiratória pela oxidação do DCFH foi coletada através do filtro de fluorescência verde.

Figura 12. Princípio do método de análise de ERO citoplasmáticas usando DCFH-DA.



Fonte: (Adaptado de ARANDA et al, 2013; SAMPAIO et al. 2018).

4.4.3. Determinação do potencial transmembrânico de mitocôndria por citometria de fluxo.

A mitocôndria é responsável pela iniciação da via intrínseca da apoptose. Esta via é ativada por estresse intra ou extracelular levando a formação de poros e efluxo de íons H^+ , induzindo uma alteração no potencial transmembrânico. A rodamina 123, um corante fluorescente lipossolúvel e nucleofílico, é seqüestrada para dentro da mitocôndria quando esta apresenta variação de potencial transmembrânico da mitocôndria inalterado. Assim, as células viáveis emitirão alta fluorescência verde devido à maior quantidade de rodamina 123 ligada às cargas positivas internas enquanto que as mitocôndrias com

polarização alterada terão menos afinidade pelo corante, gerando eventos que emitirão menor fluorescência (GORMAN et al., 1997; QIAO; WONG, 2009).

As células foram submetidas ao tratamento com $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D3 e Rotenona. Ao término das 24 horas do tratamento, as amostras foram lavadas com PBS, tripsinizadas e o pellet de células marcado com Rodamina 123 (concentração final de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por meia-hora para, em seguida, ser processado em citômetro de fluxo com excitação a 488 nm e detecção a 563-606 nm.

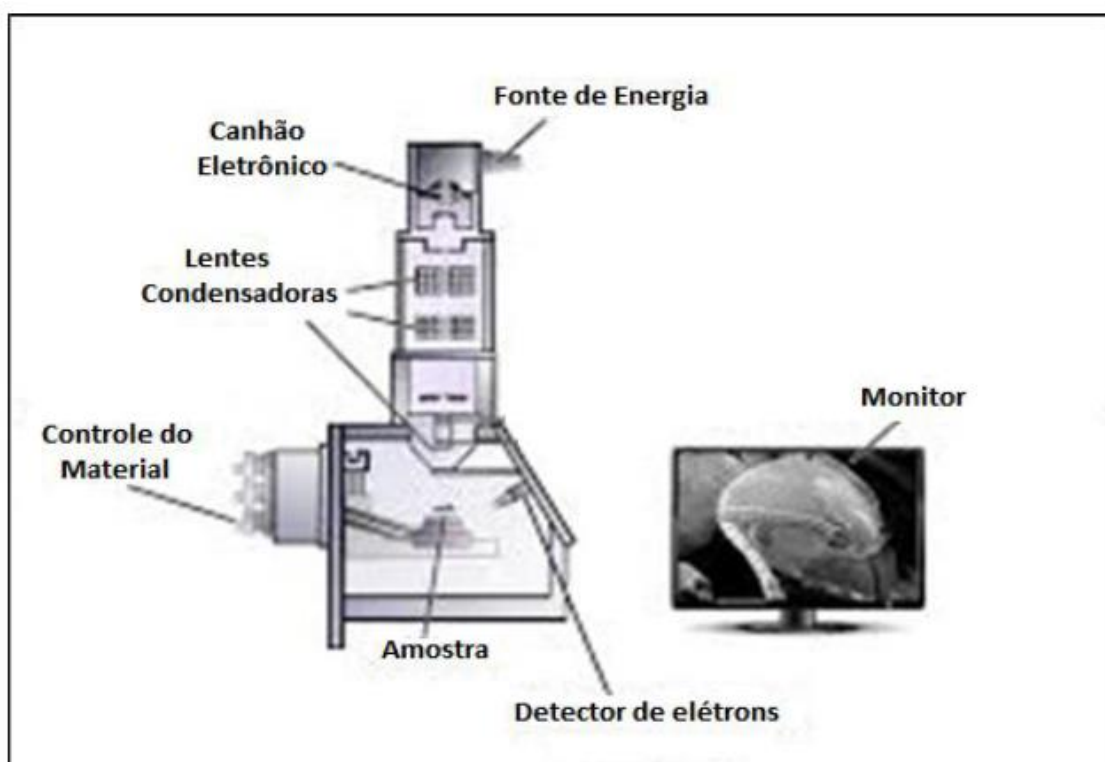
Os resultados do ensaio do DCFH-DA e da Rodamina foram expressos como intensidade relativa de fluorescência, a qual foi obtida a partir dos valores absolutos de intensidade de fluorescência dos quais foi calculada uma média geométrica e atribuído valor 1,0 para o controle, as médias dos demais grupos receberam valores proporcionais calculados por regra de três simples, conforme previamente descrito (POKORNÝ et al., 2014).

4. 5 Microscopia Eletrônica de Varredura

A microscopia eletrônica possibilita a visualização de alterações ultraestruturais causadas nas células. Para verificação do dano causado pela rotenona e visando confirmar os efeitos preventivos da $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D3, realizou-se a análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV), a qual é capaz de gerar imagens tridimensionais em alta resolução da superfície de amostras. Essa microscopia não utiliza fótons, e sim um feixe de elétrons que incide a partir de um cátodo e é condensado sobre a amostra. Quando o feixe primário interage com as amostras, os elétrons perdem energia por dispersão e os elétrons dispersos são captados por um detector, o qual cria uma imagem virtual com o auxílio de um *software* (figura 13) (CHIHANGA et al., 2018).

Para a realização da MEV, células PC12 e de astrócitos foram cultivadas em lamínulas de vidro circulares estéreis. As amostras foram fixadas com glutaraldeído a 2,5% em 0,1 M (pH 7,2 à temperatura ambiente, durante 2 horas) e desidratadas com concentrações crescentes de etanol, revestidas com uma camada de 20 nm de ouro em um dispositivo de pulverização de íons QT150 ES-Quorum e avaliadas com um microscópio eletrônico de varredura Quanta 450 FEG-FEI (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA).

Figura 13. Princípio de funcionamento do microscópio eletrônico de varredura.



Fonte: (Adaptado CHIHANGA et al., 2018; SAMPAIO, T. L., 2018).

4.6 Avaliação do equilíbrio óxido-redutor em células PC12 e Astrócitos

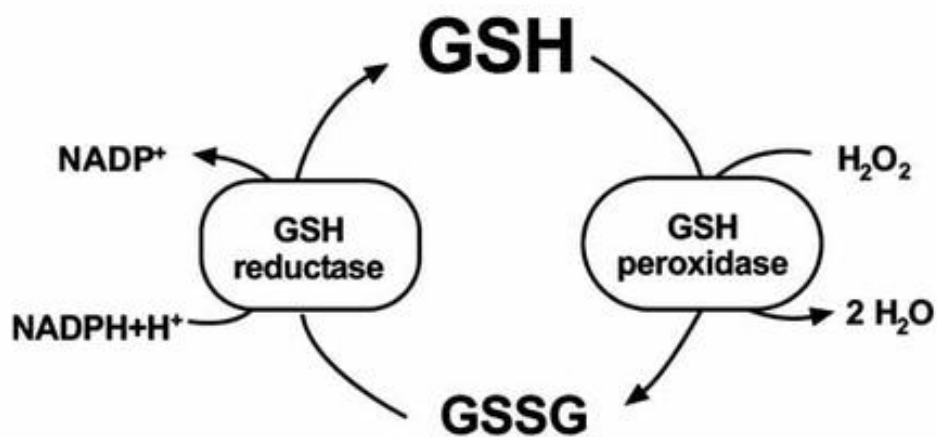
4.6.1 Determinação dos níveis de Glutathiona reduzida (GSH)

Com o objetivo de avaliar o potencial efeito da $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D3 sobre o metabolismo oxido-redutor no modelo de rotenona utilizado, foi realizado ensaio bioquímico: para determinação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH).

Sob condições oxidantes, duas moléculas de GSH doam um elétron para cada GSSG, que pode ser reduzido novamente para GSH pela ação da enzima GSSG redutase (GR) (figura 14). Um decréscimo das concentrações de GSH e/ou alta concentração de GSSG e uma baixa relação das concentrações dessas duas moléculas (razão GSH/GSSG), são interpretadas como prova de desequilíbrio redox (GIUSTARINI et al., 2011). A diminuição de GSH/GSSG é uma manifestação bem estabelecida do processo de envelhecimento e de uma variedade de estados de doença humana, incluindo a diabetes, insuficiência renal, pneumonia, malignidade, esclerose lateral amiotrófica, doença de Parkinson, doença de Alzheimer e catarata (BALLATORI et al., 2009).

Para a determinação da glutatona reduzida (γ -glutamil-L-cisteinilglicina, GSH), 400 μ L das amostras da suspensão de lisado celular foram adicionados a 800 μ L de tampão Tris-HCl (0,4 M, pH 8,9) e 20 μ L do cromógeno DTNB (5,5'-ditiobis- (ácido 2-nitrobenzóico)), também chamado reagente de Ellman. Por fim, a absorbância foi medida por espectrofotometria a 412 nm (UV ASYS 340, Biochrom, Cambridge, Reino Unido), usando como curva de calibração um padrão de GSH. Os resultados foram expressos em nmol GSH/ mg de proteínas (SHARMA et al., 1997).

Figura 14. Interconversão da glutatona em suas duas formas: reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) pela ação das enzimas glutatona peroxidase (GSH-Px), glutatona oxidase (GO) e glutatona redutase (GR).



Fonte: (RUSSELL; ANJANEYULU; BERENT-SPILLSON, 2008).

4.6.2 Superóxido dismutase (SOD) em células PC12

A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) foi expressa como acumulação de superóxido e determinada pela adaptação do método MARKLUND (MARKLUND e MARKLUND, 1974). O método tem como princípio a formação de hidroxibenzoquinona pela auto-oxidação do pirogalol e a inibição da redução do corante brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio (MTT). Para o ensaio, 30 μ L de amostra / tampão de fosfato, 99 μ L de tampão de fosfato (PBS), 6 μ L de 1,25 mmol / L de MTT e 15 μ L de 100 μ mol / L de pirogalóis foram pipetados para uma microplaca

de 96 poços. O poço com o branco da reação continha apenas 144 μL de tampão fosfato e 6 μL de MTT. A placa foi incubada a 37 ° C durante 10 min e, em seguida, 150 μL de dimetilsulfóxido foram adicionados a todos os poços da placa para parar a reação. As leituras de absorvância foram realizadas em um leitor de microplaca no comprimento de onda de 570 nm. Para calcular a atividade de acúmulo de superóxido, o resultado obtido da amostra é subtraído do valor encontrado para o branco e, a seguir, esse valor é dividido pelo valor encontrado na diferença de controle. A partir da correção para a concentração de proteínas totais no sobrenadante (LOWRY; ROSEBROUGH; RANDALL, 1951), a avaliação do acúmulo de superóxido foi expressa em nmol / mg de proteína.

4.7. Estudo *in silico*

4.7.1. Docking molecular

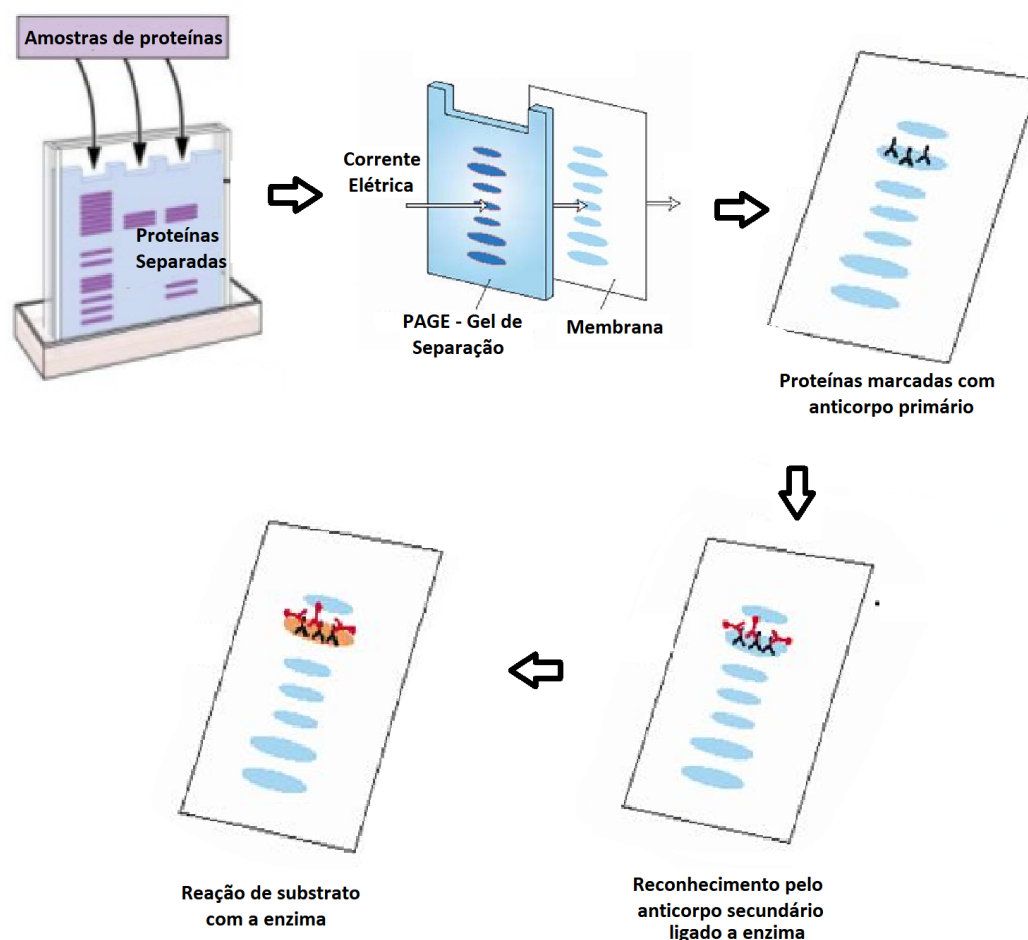
Para prever o efeito de 1 α , 25-Diidroxivitamina D3 no metabolismo da dopamina e comparar com inibidor da TH α -metil-p-tirosina (AMPT), a estrutura da enzima Tirosina Hidroxilase (TH) foi obtida no Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>) como “Estrutura Cristalina do domínio catalítico da Tirosina Hidroxilase Humana” (PDB 2XSN), obtida pelo método de difração de raios-X com resolução de 2,68Å. As simulações foram realizadas no AutoDock Vina (versão 1.1.2) (Trott e Olson, 2009), com multithreading de três vias e Algoritmo Genético Lamarckiano (Fuhrmann et al., 2012). As coordenadas da caixa de grade foram definidas como 118Å x 126Å x 72Å, (x, y, z) dimensões = (63,364, 38,356, 28,12). BIOVIA Discovery Studio Visualizer e UCSF Chimera (PETTERSEN et al., 2004) foram usados para análise.

4.8. Western Blot em Células PC12

A identificação de proteínas em amostras é, com frequência, realizada através da técnica do Western blot. A técnica se baseia em duas etapas, cuja primeira é a separação dos diferentes tipos de proteínas em uma cuba eletroforética, de acordo com seus pesos moleculares. A segunda etapa se caracteriza pela transferência das proteínas para uma membrana, permitindo a identificação destas utilizando-se um anticorpo que reconheça o epítopo da proteína de interesse, sendo, portanto, este um imunoenensaio (figura 15). Dessa

forma, o presente trabalho utilizou a técnica do Western Blot a fim de analisar alterações na expressão TH e NF- κ B em células de PC12 em condições normais e após passarem pelo modelo de rotenona *in vitro*. Foi avaliado também se o tratamento com a 1 α ,25-dihidroxitamina D3 foi capaz de gerar alguma interferência no nível de expressão desses marcadores.

Figura 15. Representação da análise de proteínas por Western blot.



Fonte: SAMPAIO, T. L. (2018).

4.8.1. Extração e quantificação de proteínas

Visando a extração das proteínas das amostras, células PC12 em cultivo que foram submetidas ao tratamento com $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D3 nas concentrações de 0,5 e 1,0 ng/mL e em seguida com a IC_{50} da rotenona, após 24h de tratamento foram lavadas duas vezes com PBS gelado e, em seguida, adicionaram-se 300 μ L de tampão RIPA (TrisHCl 50 mM; pH 7,4; NaCl 150 mM; deoxicolato de sódio 0,25%; NaF 10 μ g/mL e EDTA 1 mM) gelado adicionado coquetel inibidor de protease (1:100 de fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) a 2mM e o ortovanadato de sódio, um inibidor de fosfatase, a 1 mM). Em seguida, o material contido em placas de seis poços foi deslocado mecanicamente com um cell lifter nesta e transferiu-se o conteúdo para tubos tipo eppendorf. As amostras ficaram em gelo e em seguida 10 min em banho seco, visando garantir a lise completa das células. Ao final, o material foi centrifugado a 15000 x g por 10 min a 25°C e o sobrenadante foi separado e conservado a -20°C para posterior quantificação das proteínas totais.

A quantificação de proteínas totais foi realizada por método colorimétrico (LOWRY; ROSEBROUGH; RANDALL, 1951) segundo metodologia do fabricante do kit comercial (*BioRad Laboratories*). Para calibração do método foi realizada uma curva padrão de proteína utilizando a albumina sérica bovina (BSA) em diluições que iam de 25 a 2000 μ g/mL, diluída em água destilada. Em seguida, 10 μ L de cada amostra ou BSA diluída, foram colocados em duplicata na placa de 96 poços. Adicionou-se, então, 4,9 mL da solução A e 100 μ L do reagente B, ambos contidos no kit comercial, dessa solução adicionar 200uL em cada poço. A placa foi incubada a 37°C por 30 min e a leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro no comprimento de onda de 562 nm. A concentração de proteína em cada amostra foi determinada por meio de regressão linear da curva gerada pelo BSA, ao ser plotado o gráfico da absorbância versus quantidade de proteínas.

Precedendo os experimentos, os volumes das amostras foram ajustados à concentração de 1 mg de proteína/ml e desnaturadas em banho a 90°C em tampão de amostra contendo SDS (dodecilsulfato de sódio) por 5 minutos.

4.8.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida e transferência

Para a separação das proteínas por peso molecular, foi realizada a eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) em sistema vertical BioRad Laboratories mini-PROTEAN® Tetra Cell, conforme padronizado anteriormente (TOWBIN et al., 1979). Foi utilizado um gel composto por 10% de poliacrilamida em tampão Tris-HCl 1,5M, pH 8,8 (BioRad Laboratories). Foi adicionado acima deste gel, um “*stacking gel*”, ou gel de empacotamento com 5% de poliacrilamida em tampão Tris-HCl 0,5M, pH 6,8.

Precedendo o início da corrida eletroforética, em um dos poços do gel foi adicionado um marcador de peso molecular (Full-Range Rainbow Marker: 12 – 225 kDa; GE Healthcare) e nos demais poços foram adicionados 20 µL da proteína extraída desnaturada de cada amostra (correspondente a 40 µg de proteína total por poço). Foi realizada a separação utilizando um potencial elétrico gerado por uma voltagem constante de 180 V e amperagem livre (Fonte elétrica modelo PowerPac™, modelo HCPower Supply) à temperatura ambiente por aproximadamente 1 hora e meia, até o marcador de peso molecular se mostrar completamente separado no gel.

As proteínas separadas foram transferidas para uma membrana nitrocelulose (BioRad Laboratories). A membrana foi previamente molhada em metanol e colocada em contato com o gel em suporte apropriado para a eletrotransferência pelo método de imersão (BioRad Laboratories, modelo MiniTrans Plot Modulo), contendo papéis de filtro e esponjas molhados com tampão de transferência gelado (Tris-HCl 25 mM; pH 8,3; glicina 192 mM e metanol 20%). A eletrotransferência foi realizada sob diferença de potencial elétrico gerado por amperagem constante de 400 mA, voltagem livre e temperatura de 4 °C durante 2 h.

4.8.3. Imunodeteção

Com o término da transferência, as membranas ficaram incubadas *overnight* com solução de BSA 5% em tampão Tris salina contendo 0,1% de Tween 20 (TBST, pH 8,0) e com os anticorpos primários de reconhecimento TH (~85 a 48 kDa) diluído (1:500, Sigma-Aldrich) em BSA 5% em TBST e NF-kB (~50 kDa) diluído (1:200, Santa Cruz, Biotechnology) em BSA 5% em TBST o visando bloqueio de interações inespecíficas do anticorpo com a membrana. O anticorpo primário anti α - tubulina (Santa Cruz, Biotechnology) foi utilizado como padrão endógeno de proteína constitutiva.

As membranas foram novamente submetidas a 3 lavagens com TBST 1x sob agitação moderada (10 minutos/lavagem) e incubadas com o anticorpo secundário anti-rabbit IgG conjugado com enzima peroxidase (Abcam, Cambridge, UK), diluído na proporção de 1:3000 em BSA 5% em TBST e anti-mouse diluído na proporção de 1:5000 em BSA 5% em TBST. Para detecção por quimioluminescência, foi utilizado o reagente Clarity™ ECL (BioRad Laboratories). O reagente foi incubado com as membranas no escuro por 5 minutos e a aquisição de imagens foi realizada no equipamento ChemiDoc™ MP Imaging System (BioRad Laboratories). Para análise das imagens foi utilizado o Software Image Lab™ Software versão 5.1 (BioRad Laboratories). Após a normalização com a expressão da proteína constitutiva α -tubulina, foi atribuída à média do grupo controle um score de valor 1,0 e os resultados dos demais grupos foram expressos como unidades arbitrárias de expressão relativa.

4.9. Análise Estatística

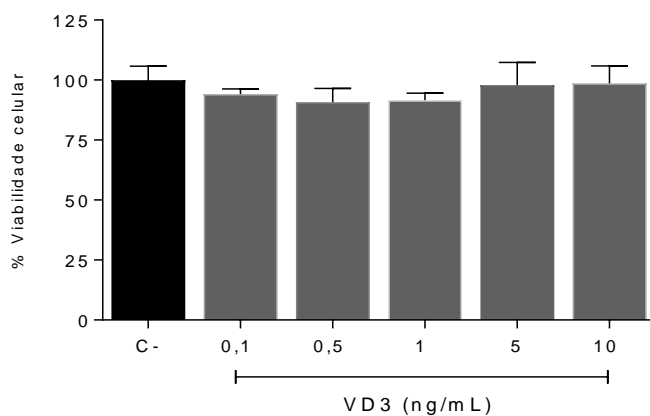
Todos os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (SEM). Para comparação estatística entre os grupos experimentais, foi utilizado one-way ANOVA seguido pelo post-test de Bonferroni. Como critério de significância foi aceito $p < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas usando o software GraphPad Prism 7.03 (EUA).

5. RESULTADOS

5.1. Ensaios de viabilidade celular por MTT e citometria de fluxo

Com o objetivo de avaliar a viabilidade da $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D3 (VD3) nas células PC12 e astrócitos, realizou-se o ensaio de citometria com o marcador 7AAD e o ensaio de MTT respectivamente para identificar uma faixa de concentrações adequadas para trabalho, ou seja, concentrações que não fossem tóxicas. Foi observado que em todas as concentrações testadas (Figura 16) em células PC12, a VD3 não mostrou diminuição da viabilidade celular, logo depois os experimentos seguiram com três concentrações de VD3 (0,1; 0,5 e 1 ng/mL) sendo avaliadas em células PC12 e astrócitos. Através de uma curva de concentração da ROT, a IC_{50} foi definida aquela que causa danos a 50% da população de células, foi visto morte em células PC12 (10 μ g/mL) (Figura 17A) e astrócitos (5 μ g/mL) (Figura 17B) após indução com rotenona.

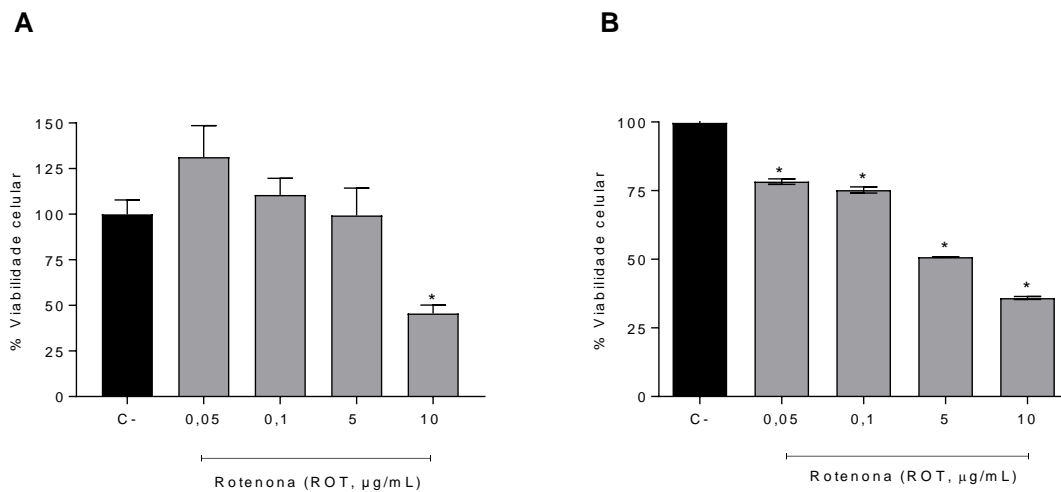
Figura 16. Ensaio de viabilidade celular de redução do MTT mostrando a viabilidade da VD3 em células PC12.



Os resultados são mostrados como média \pm SEM, $p < 0,05$, comparado aos grupos de controle de veículo. Para análise estatística, foi utilizado ANOVA, seguido de pós-teste de Bonferroni, C- = Controle negativo; * $p < 0,05$.

Fonte: Elaborado pela autora.

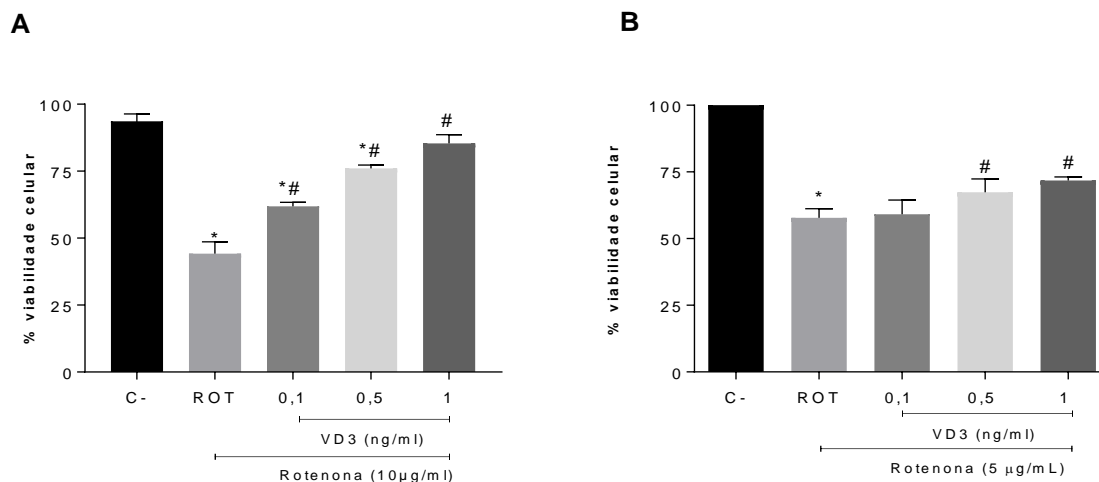
Figura 17. Ensaio de viabilidade celular por MTT mostrando a toxicidade da rotenona em células PC12 em A e astrócitos em B.



Os resultados são mostrados como média \pm SEM, $p < 0,05$, comparado aos grupos de controle de veículo. Para análise estatística, foi utilizado ANOVA, seguido de pós-teste de Bonferroni, C- = Controle negativo; * $p < 0,05$.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 18. Ensaio de viabilidade celular por citometria de fluxo com o marcador 7AAD e por MTT mostrando a proteção da VD3 frente a toxicidade da rotenona em células PC12 em A e astrócitos em B respectivamente.



Os dados foram expressos em média da porcentagem de distribuição de eventos (células) \pm SEM, * $p < 0,05$ vs. grupo controle; # $p < 0,05$ vs. Rotenona (ROT). Para análise estatística, foi utilizado ANOVA, seguido de pós-teste de Bonferroni.

Fonte: Elaborado pela autora.

Na (figura 18A) Tratamento em células PC12 é possível observar que a rotenona (10 $\mu\text{g/mL}$) foi capaz de reduzir a viabilidade celular para 54,5% quando comparado ao controle. Além disso, células que foram tratadas com vitamina D (VD3) e subsequentemente submetidas a rotenona mostraram um efeito protetor, indicado pelo aumento ou manutenção da viabilidade, apresentaram diferença significativa especialmente a concentração de 1 ng/mL , que após 24 horas de tratamento mostrou uma viabilidade de 91,2% em relação ao grupo controle, sendo considerada a concentração a apresentar efeito protetor melhor. Na concentração de 0,5 ng/mL a viabilidade foi de 81,2% e na concentração de 0,1 ng a viabilidade foi 66,1%.

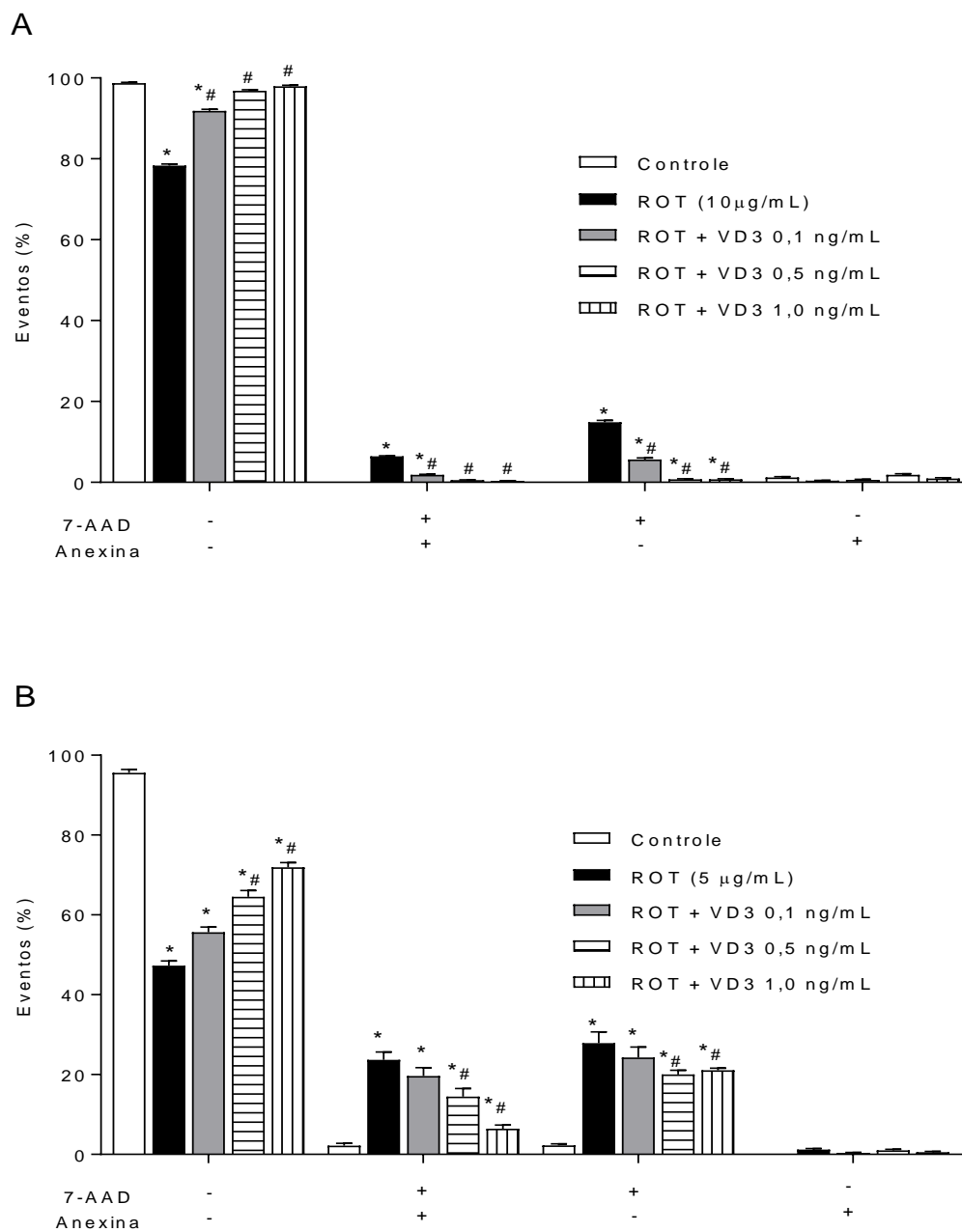
Na (Figura 18B) em astrócitos observamos que a rotenona reduziu a viabilidade celular em 43,3% comparado ao controle. Células tratadas com VD3 e posterior exposição a rotenona (5 $\mu\text{g/mL}$) por 24h mostrou um efeito protetor, apresentando diferença significativa principalmente nas concentrações de 0,5 e 1 ng/mL , mantendo a viabilidade celular em 67,6 e 77,8% respectivamente.

5.2. Avaliação do mecanismo de morte celular

Através do uso de citometria de fluxo, utilizando marcação com 7-AAD/Anexina V-PE, foi possível avaliar o mecanismo de morte celular envolvido no modelo de rotenona, apresentado na (figura 19).

As células submetidas a rotenona mostraram marcação significativa com 7-AAD (7-AAD+/Anx-) 78,3% dos eventos em PC12 (figura 19A) e 47,2% dos eventos em astrócitos quando comparadas ao controle, uma vez que o 7AAD não é capaz de penetrar em células com a membrana íntegra, portanto as células marcadas com esse marcador são consideradas necróticas, por perda de integridade de membrana. Além disso, uma população de células duplamente marcadas (7-AAD+/Anx+) estava presente no grupo rotenona, indicando apoptose tardia ou necrose secundária (6,4% dos eventos) em PC12 e (23,6% dos eventos) em astrócitos. Nas concentrações utilizadas, a VD3 foi capaz de reduzir a morte celular, pois o grupo tratado com 0,1 ng de VD3 reduziu a população marcada com 7-AAD em 5,6% e 24,2% dos eventos e a população de células duplamente marcadas em 1,8% e 19,6% em células PC12 e astrócitos respectivamente. Adicionalmente, os grupos tratados com VD3 0,5 e 1 ng/mL apresentaram uma redução da população marcada com 7-AAD para 100% e a população duplamente marcada para 100% em células PC12. Em astrócitos os grupos tratados com VD3 0,5 e 1 ng/mL apresentaram uma redução da população marcada com 7-AAD em 20% e 21% e a população duplamente marcada para 14,4% e 6,4% respectivamente (Figura 19B). Os gráficos de *density plot* dos tratamentos nas células PC12 e astrócitos estão apresentados nas (figuras 20) e (figura 21), respectivamente.

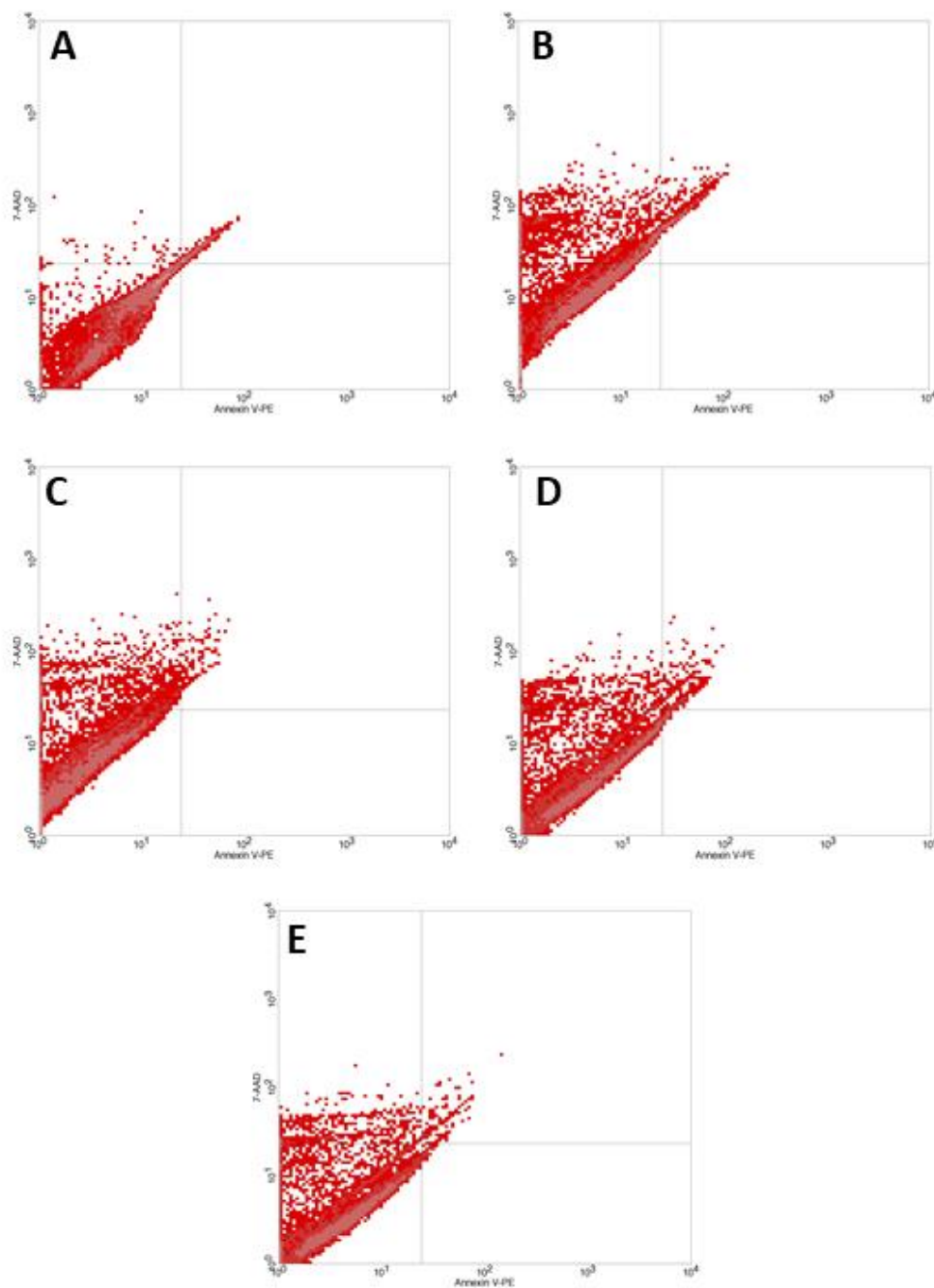
Figura 19. Representação do ensaio de avaliação da via de morte celular em células PC12 em A e em Astrócitos em B. As células necróticas foram marcadas por 7AAD, enquanto as células apoptóticas foram marcadas por anexina V.



Os dados foram expressos em média da porcentagem de distribuição de eventos (células) \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. grupo controle; # $p < 0,05$ vs. Rotenona (ROT). Para análise estatística, foi utilizado ANOVA, seguido de pós-teste de Bonferroni.

Fonte: Elaborado pela autora.

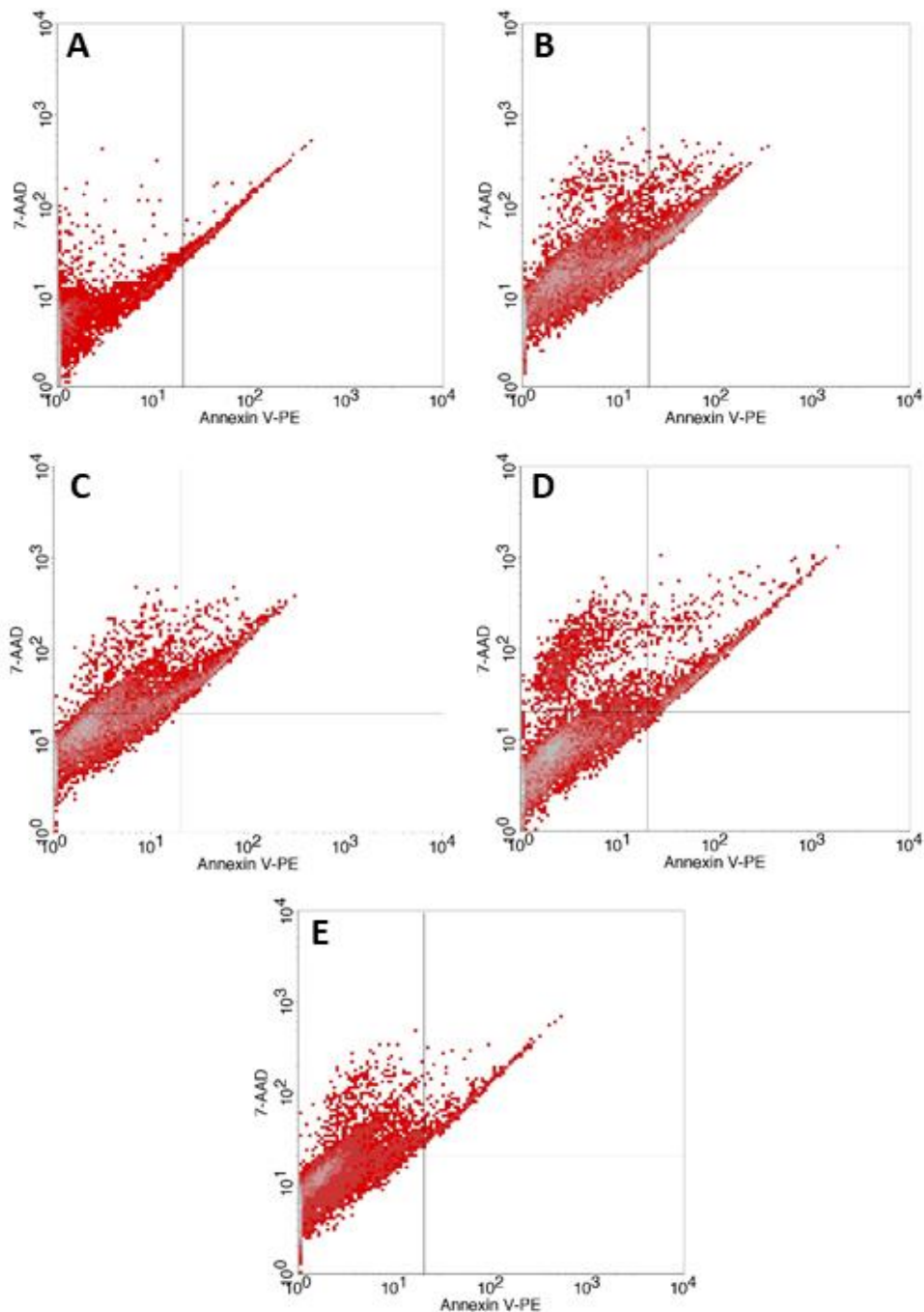
Figura 20. Gráficos density plot representativos da densidade comparativa da avaliação da via de morte celular. As células necróticas foram marcadas por 7AAD, enquanto as células apoptóticas foram marcadas por anexina V em células PC12.



(A) Grupo controle; (B) grupo Rotenona (ROT, 10 $\mu\text{g/mL}$); (C) células tratadas com VD3 0,1 ng/mL + ROT; (D) células tratadas com VD3 0,5 ng/mL + ROT e em (E) células tratadas com VD3 1 ng/mL + ROT.

Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 21. Gráficos density plot representativos da densidade comparativa da avaliação da via de morte celular. As células necróticas foram marcadas por 7AAD, enquanto as células apoptóticas foram marcadas por anexina V em cultura de astrócitos.



(A) Grupo controle; (B) grupo Rotenona (ROT, 5 µg/mL); (C) células tratadas com VD3 0,1 ng/mL + ROT; (D) células tratadas com VD3 0,5 ng/mL + ROT e em (E) células tratadas com VD3 1 ng/mL + ROT.

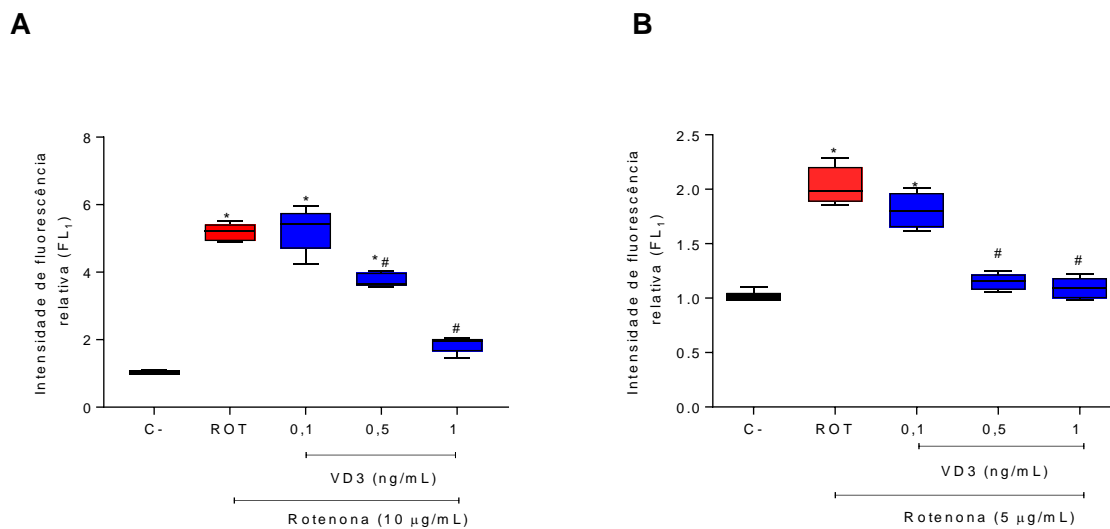
Fonte: Elaborado pela autora.

5.3. Análise da produção de ERO citoplasmáticas

Objetivando analisar a acumulação de ERO intracitoplasmáticas na PC12 e em astrócitos, foi realizado o ensaio por citometria de fluxo através da utilização do DCFH-DA (Figura 22). Os resultados da intensidade de fluorescência relativa (FL1) mostraram que a rotenona (ROT) foi capaz de aumentar o acúmulo de ERO em 5 vezes nas células PC12 em comparação com o controle e resultados semelhantes foram observados nas células tratadas com VD3 na concentração de 0,1 ng/mL e em seguida expostas a ROT. Além disso, a VD3 0,5 ng/mL reduziu o acúmulo de ERO para 3,7 vezes em comparação com o controle, enquanto os valores de acúmulo de ERO foram próximos aos do controle na concentração de 1 ng/mL (Figura 22A). Histogramas representativos das populações celulares são mostrados na (Figura 23).

Em astrócitos a intensidade de fluorescência relativa em razão com a média do controle, demonstrou que a rotenona foi capaz de aumentar em 2,1 vezes o acúmulo de ERO em comparação com o controle. O tratamento com VD3 na concentração de 0,1 ng/mL reduziu esse acúmulo de ERO para 1,8 vezes em comparação com o controle. Mostrou diferença significativa nas concentrações de 0,5 e 1 ng/mL onde o acúmulo de ERO foram próximos aos do controle (Figura 22B). Histogramas representativos das populações celulares são mostrados nas (Figura 24).

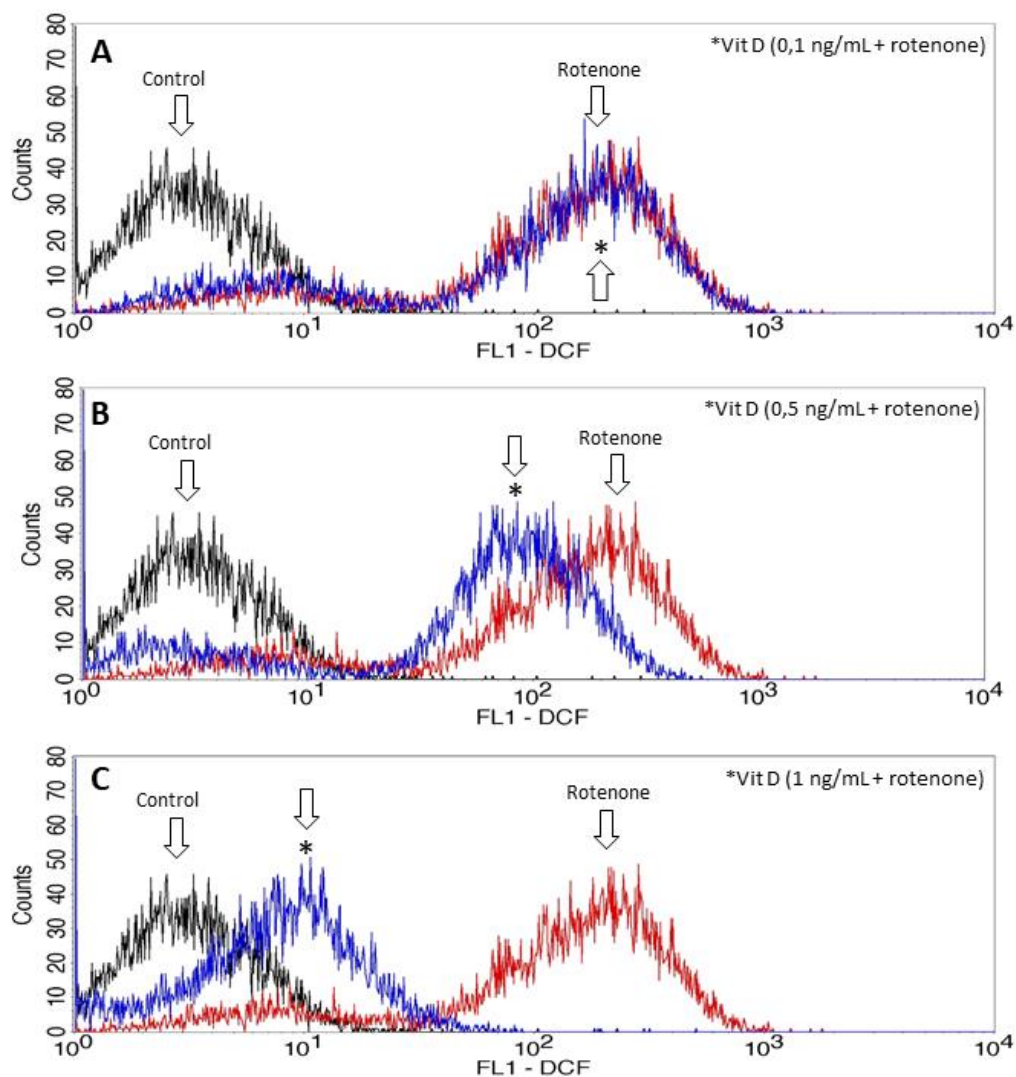
Figura 22. Análise do estresse oxidativo e produção de ERO citoplasmáticas em células de PC12 em A e em Astrócitos em B por citometria de fluxo através do ensaio utilizando o DCFH-DA.



Os dados são expressos como fluorescência relativa ao controle \pm SEM. $p < 0,05$. Os dados foram analisados por one-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ vs. controle; # $p < 0,05$ vs. Rotenona (ROT).

Fonte: Elaborado pelo autor.

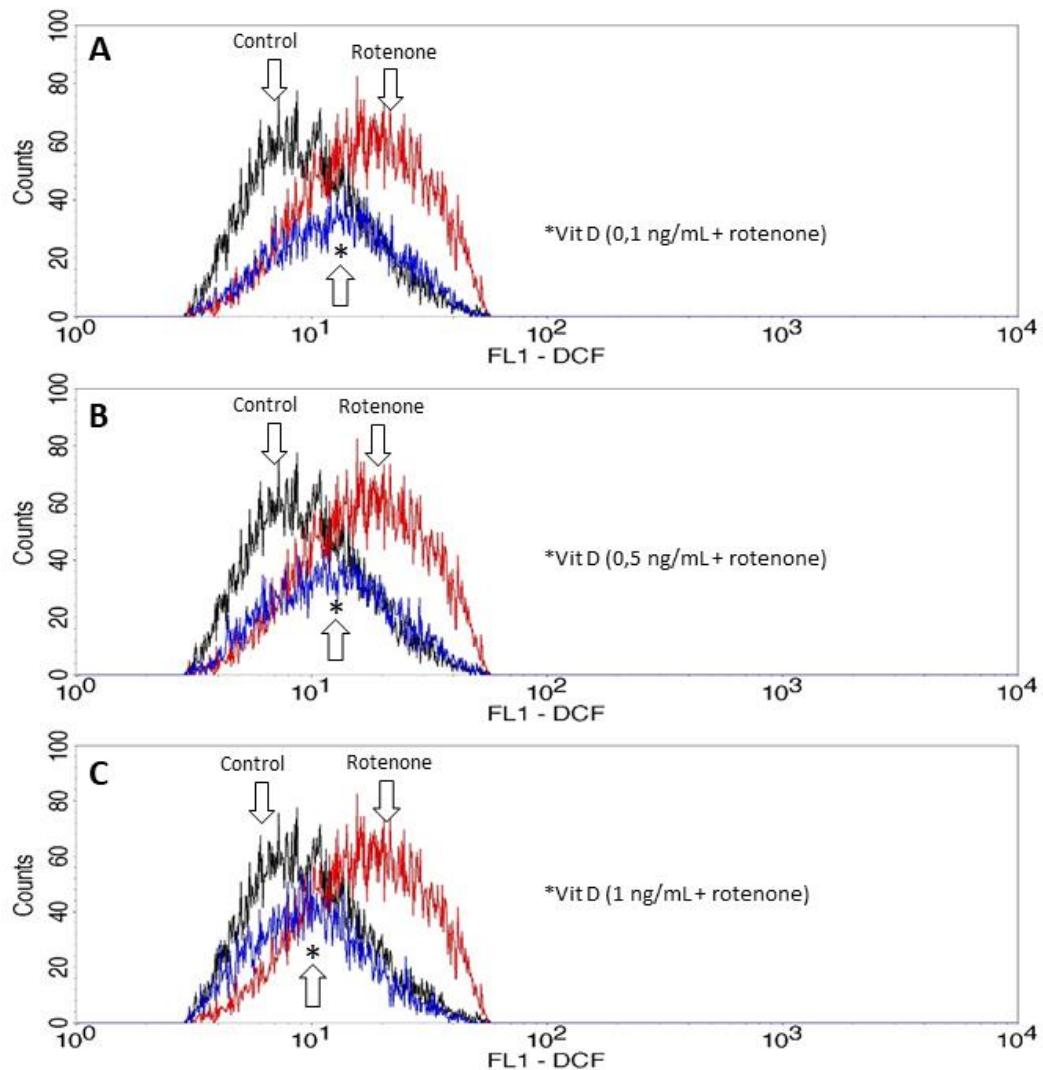
Figura 23. Histograma representativo do ensaio com DCFH-DA, apresentado em células PC12.



Em A, B e C estão apresentados o grupo controle em preto, rotenona em vermelho e tratado com VD3 0,1 ng/mL em A; 0,5 ng/mL em B; 1 ng/mL em C e em seguida rotenona em azul. Os picos representam a contagem de eventos (células) que apresentam a respectiva fluorescência.

Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 24. Histograma representativo do ensaio com DCFH-DA, apresentado em Astrócitos.



Em A, B e C estão apresentados o grupo controle em preto, rotenona em vermelho e tratado com VD3 0,1 ng/mL em A; 0,5 ng/mL em B; 1 ng/mL em C e em seguida rotenona em azul. Os picos representam a contagem de eventos (células) que apresentam a respectiva fluorescência.

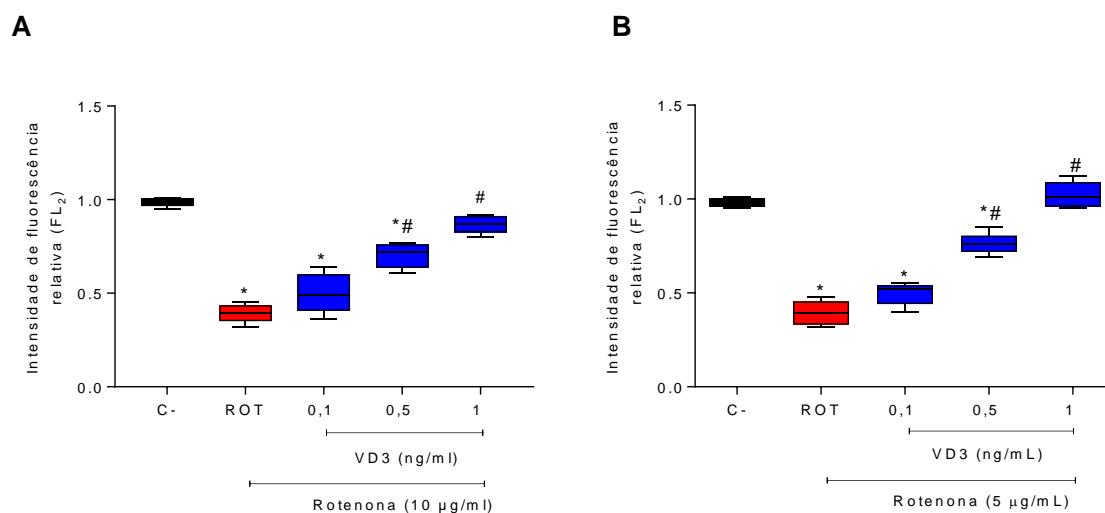
Fonte: Elaborado pela autora.

5.4. Avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial

No sentido de avaliar a alteração do potencial transmembrânico mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) ocasionado pela rotenona e, conseqüentemente pelo estresse oxidativo intracelular, foi realizado o ensaio por citometria de fluxo utilizando a Rodamina 123, os resultados estão ilustrados na (figura 25). É possível observar que tanto nas células PC12

na (figura 25A) como nos astrócitos (figura 25B) o grupo exposto à rotenona reduziu a fluorescência mitocondrial em aproximadamente 40% em comparação com o controle, reduzindo a intensidade de fluorescência em razão com o controle para 0,9. O tratamento com a VD3 aproximou o $\Delta\Psi_m$ dos grupos tratados com o do grupo controle. O grupo tratado com VD3 0,1 ng/mL aumentou a intensidade relativa de fluorescência em 50,7% em comparação com o grupo exposto à rotenona, elevando a intensidade de fluorescência relativa (IFR) para 0,5. Já os grupos tratados com VD3 0,5 e 1 ng/mL apresentaram IFR de 0,7 e 0,8, respectivamente em células PC12 (figura 25A). O grupo tratado com 1 ng/mL de VD3 em astrócitos (figura 25B) apresentou IFR de 1,0 significando uma normalização do $\Delta\Psi_m$ aos mesmos níveis do controle (IFR = 1.0). Histogramas representativos das populações celulares são mostrados nas (Figuras 26 e 27).

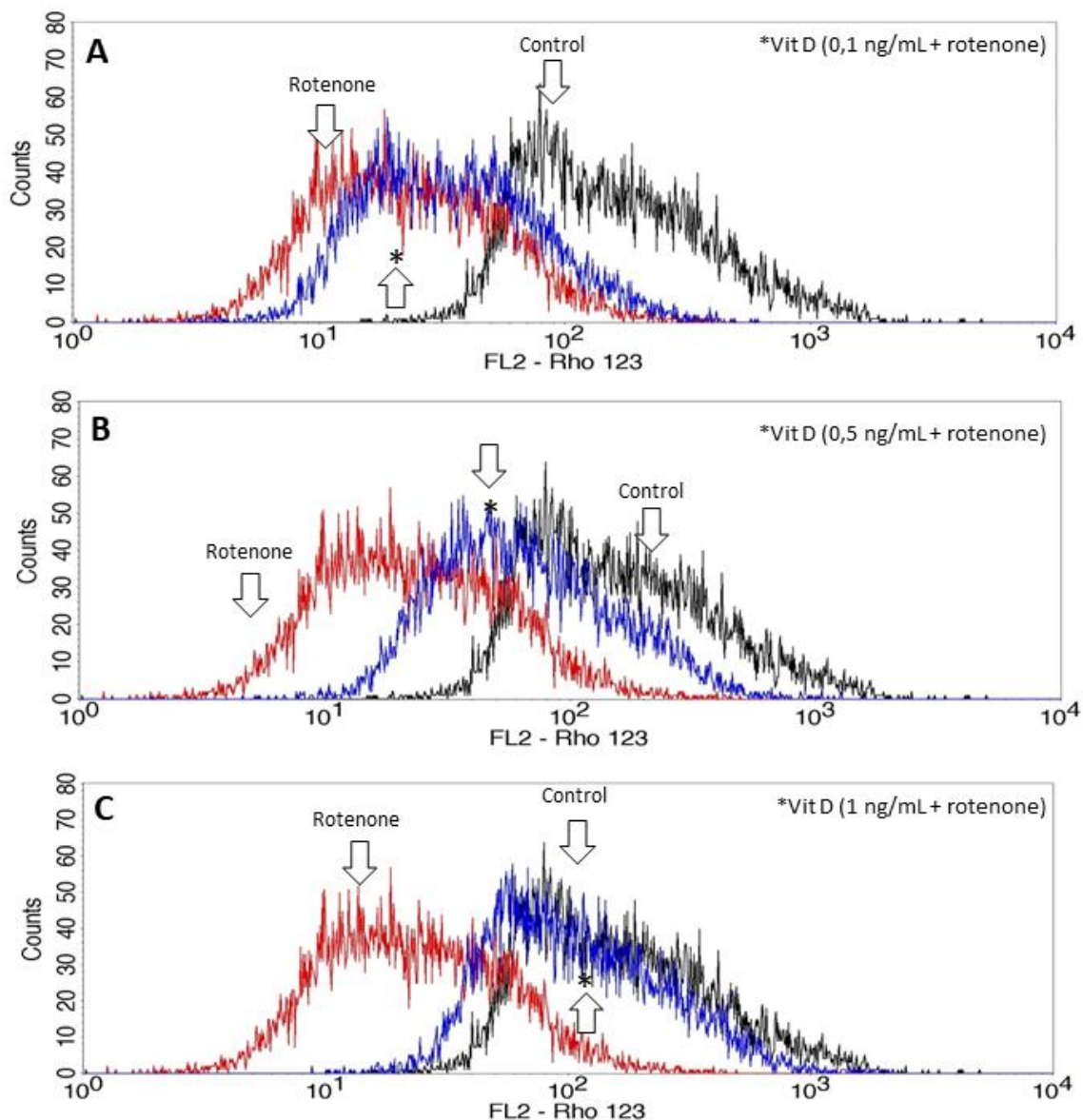
Figura 25. Análise do potencial transmembrânico mitocondrial em células de PC12 em A e em astrócitos em B por citometria de fluxo através do ensaio utilizando a Rodamina 123.



Os dados são expressos como fluorescência relativa ao controle \pm SEM. $p < 0,05$. Os dados foram analisados por one-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ vs. controle; # $p < 0,05$ vs Rotenona (ROT).

Fonte: Elaborado pela autora.

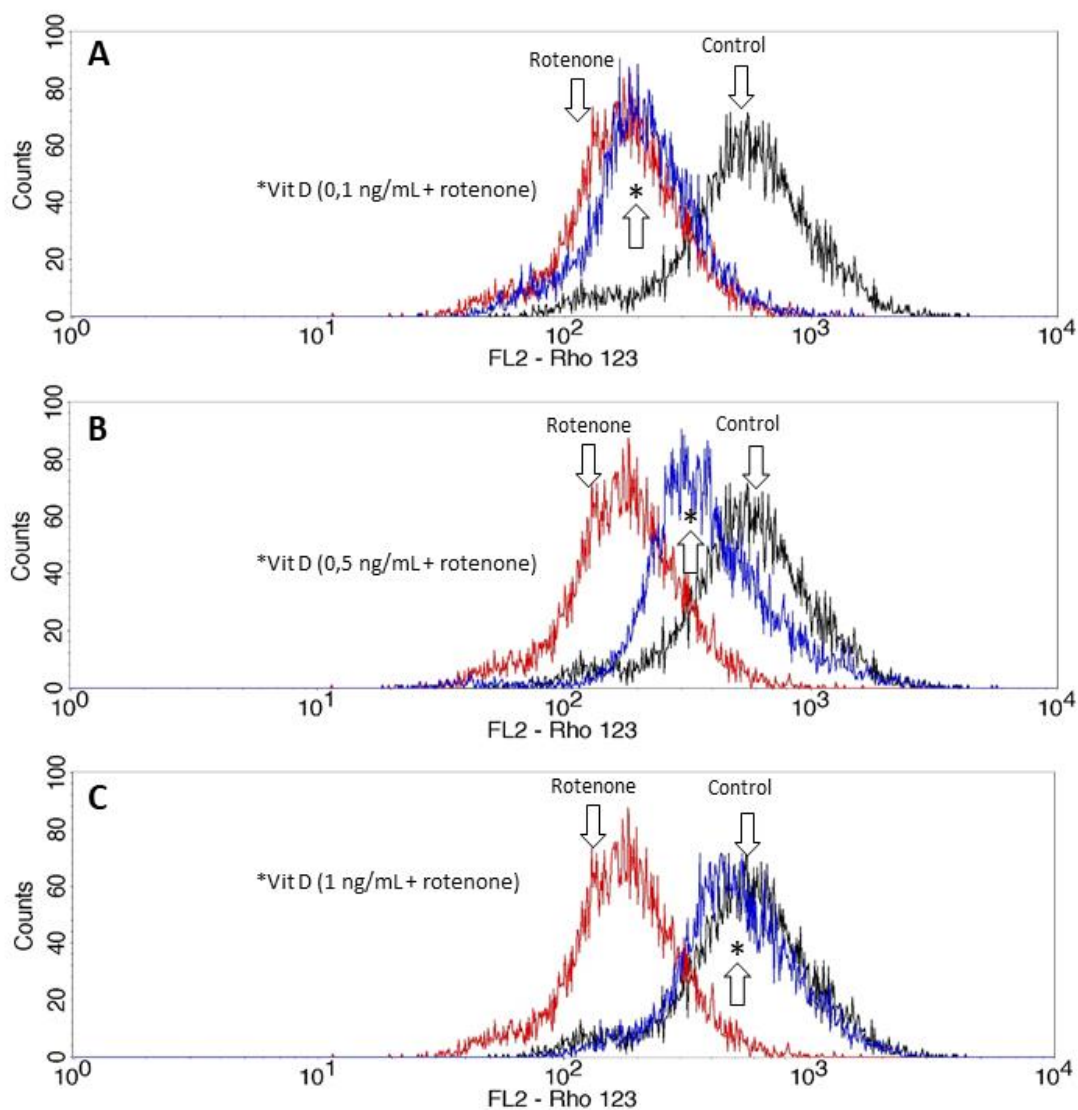
Figura 26. Histograma representativo do ensaio com Rodamina 123, apresentados em células PC12.



Em A, B e C estão apresentados o grupo controle em preto, rotenona em vermelho e tratado com VD3 0,1; 0,5 e 1 ng/mL e em seguida rotenona em azul. Os picos representam a contagem de eventos (células) que apresentam a respectiva fluorescência.

Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 27. Histograma representativo do ensaio com Rodamina 123, apresentados em astrócitos.



Em A, B e C estão apresentados o grupo controle em preto, rotenona em vermelho e tratado com VD3 0,1; 0,5 e 1 ng/mL e em seguida rotenona em azul. Os picos representam a contagem de eventos (células) que apresentam a respectiva fluorescência.

Fonte: Elaborado pela autora.

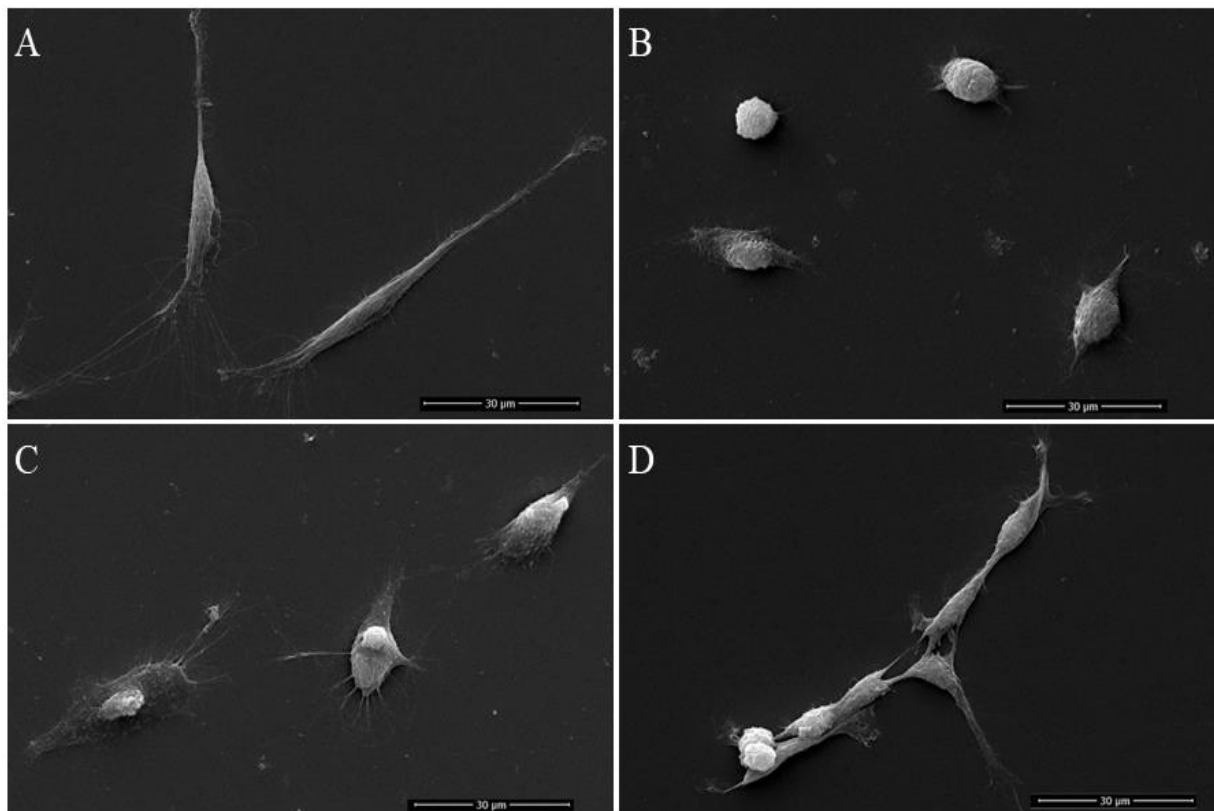
5.5. Microscopia Eletrônica de Varredura de Células PC-12 e Astrócitos

Para melhor associar os resultados celulares e bioquímicos obtidos com a avaliação do dano celular direto, alterações qualitativas em células PC12 e astrócitos foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), como mostrado nas (Figuras 28 e 29).

Na (figura 28) Microscopia Eletrônica de Varredura em PC12. Células normais de pré-neurônio (PC12) foram utilizadas como controle em A, esta foi possível observar a morfologia multipolar característica, com mais de dois prolongamentos celulares e comunicações dendríticas evidentes. Em B a indução da lesão com a rotenona, provocou fragmentação do citoplasma e formação de corpos apoptóticos, retração do volume celular e encurtamento dos prolongamentos celulares. Os tratamentos com VD3 nas concentrações de 0,5 e 1 ng/mL foram capazes de prevenir parcialmente as alterações causadas pela rotenona. Essa proteção fica clara ao se observar a conservação do volume e dos prolongamentos celulares em C. Na maior concentração da VD3 (1 ng/mL) praticamente retornou as células para a morfologia e número de células por campo do grupo controle, conforme demonstrado em D.

Na (figura 29) a Microscopia Eletrônica de Varredura em Astrócitos. No grupo controle em A, os astrócitos apresentaram morfologia característica de células grandes em forma de estrela, com prolongamentos, núcleo grande, cromatina frouxa e nucléolo central, conforme demonstrado. Com relação ao grupo rotenona em B, causou retração do volume celular, com fragmentação do citoplasma, formando corpos apoptóticos, ou *blebbing*. O tratamento com a VD3 na menor concentração (0,5 ng/mL) posterior tratamento com rotenona indicou considerável proteção, evidenciada pela conservação da estrutura celular em C. Essa proteção fica mais evidenciada nas células tratadas com a VD3 na maior concentração (1 ng/mL) em D e posterior tratamento com a rotenona, uma vez que foi possível observar nesse grupo conservação da estrutura celular.

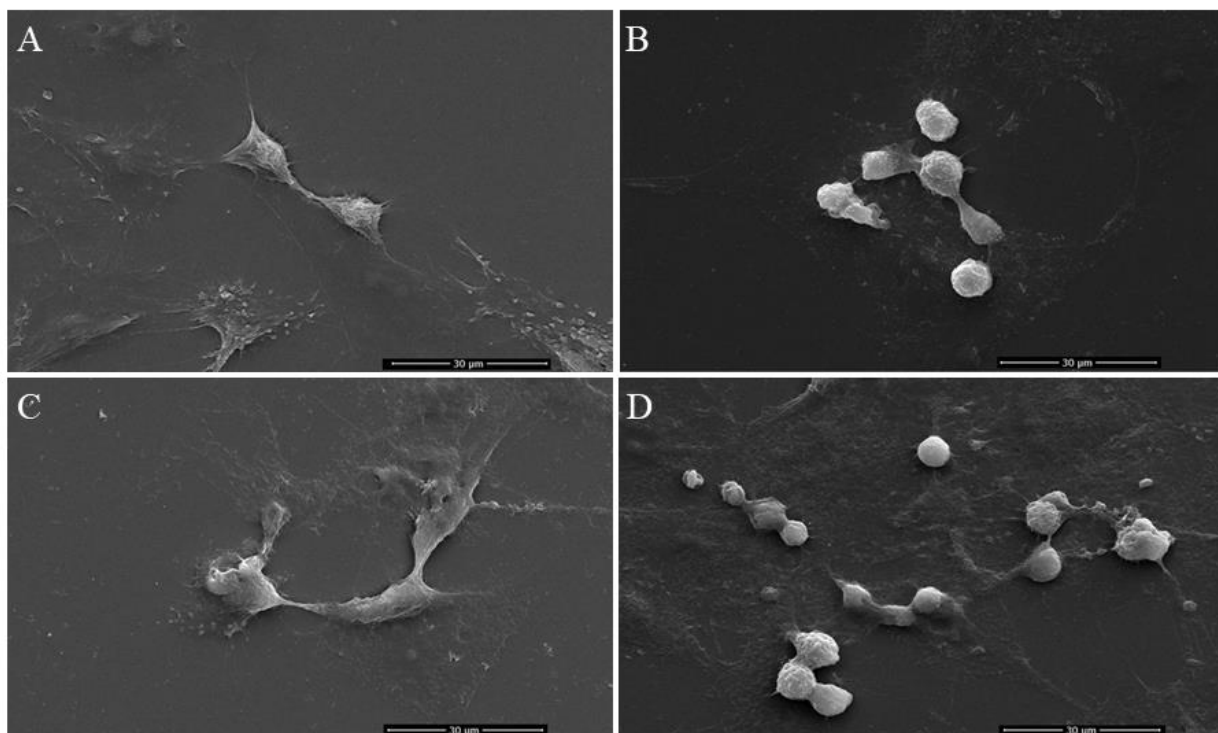
Figura 28. Microscopia Eletrônica de Varredura em células PC12.



Em A células do grupo controle; B células tratadas com rotenona, em C e D células pré tratadas com VD3 0,5 ng/mL e VD3 1 ng/mL e em seguida expostas a rotenona respectivamente. As imagens foram obtidas com o Microscópio Quanta 450 FEG-FEI ($\times 50.000$).

Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 29. Microscopia Eletrônica de Varredura em astrócitos.



Em A células do grupo controle; B células tratadas com rotenona, em C e D células pré tratadas com VD3 0,5 ng/mL e VD3 1 ng/mL e em seguida expostas a rotenona respectivamente. As imagens foram obtidas com o Microscópio Quanta 450 FEG-FEI ($\times 50.000$).

Fonte: Elaborado pelo autor.

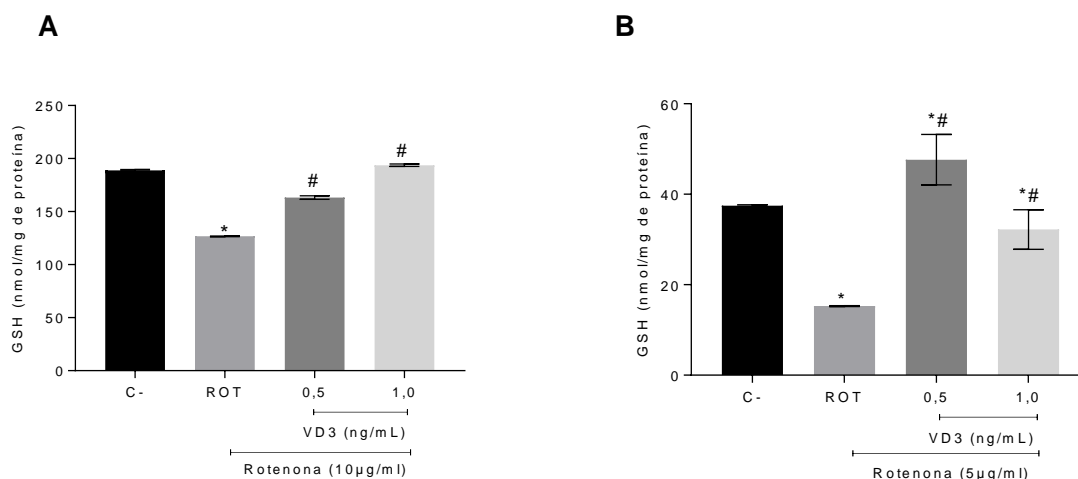
5.6. Avaliação do equilíbrio óxido-redutor

A fim de avaliar os danos causados pelo estresse oxidativo nas células PC12 e em astrócitos, o GSH foi medido (figura 30). Em células PC12 na (figura 30A) foi observado que no grupo da rotenona, ocorreu uma diminuição significativa dos níveis de GSH (em torno de 33%) em relação ao grupo controle. Além disso, o tratamento com VD3 foi capaz de prevenir essas alterações de forma dependente da concentração (13,6%) e com valores semelhantes aos do grupo controle após tratamento das células a 0,5 e 1 ng/mL de VD3 e em seguida expostas a rotenona (10 μ g/mL).

Já em astrócitos na (figura 30B) ocorreu uma redução significativa de GSH (em torno de 78%) no grupo tratado com rotenona (5 μ g/mL) em relação ao controle. Os grupos tratados com VD3 e posterior exposição a rotenona, teve ação protetora significativa com valores iguais ou próximos ao controle.

Esses dados sugerem que VD3 tem um efeito antioxidante direto nas células PC12 e em astrócitos, evitando a oxidação de lipídios, especialmente fosfolipídios.

Figura 30. Avaliação do estresse oxidativo através da mensuração dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) em células PC12 em A e em astrócitos em B.

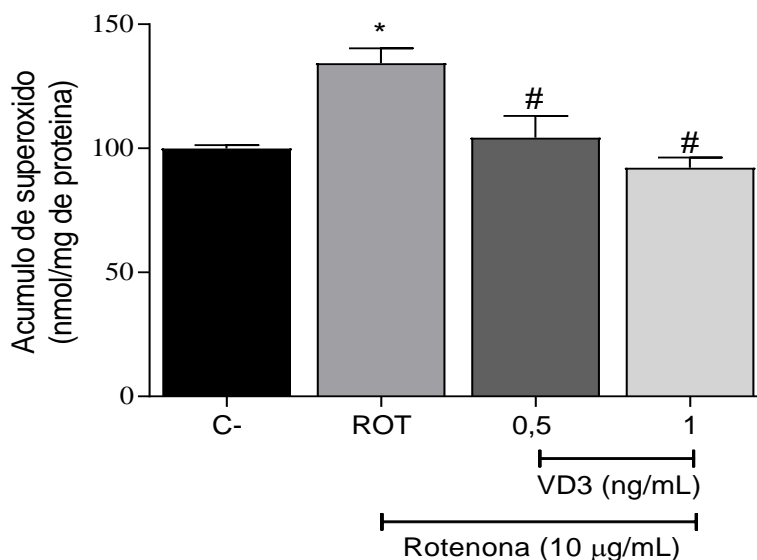


Os dados foram expressos em média da porcentagem de distribuição de eventos (células) \pm SEM; * $p < 0,05$ vs. grupo controle; # $p < 0,05$ vs. Rotenona (ROT). Para análise estatística, foi utilizado ANOVA, seguido de pós-teste de Bonferroni.

5.7. Acumulação de superóxido em células PC12 avaliada por medições de atividade de superóxido dismutase (SOD)

No grupo da rotenona, foi observado um aumento significativo (34%) no acúmulo de superóxido quando comparado ao grupo controle. O tratamento com VD3 foi capaz de prevenir esse acúmulo de forma dependente da concentração, sugerindo que a vitamina D tem efeito antioxidante direto nas células PC12 (figura 31).

Figura 31. Avaliação do acúmulo de superóxido (SOD) em células PC12.



Os dados foram expressos em média da porcentagem de distribuição de eventos (células) \pm SEM, * $p < 0,05$ vs. grupo controle; # $p < 0,05$ vs. Rotenona (ROT). Para análise estatística, foi utilizado ANOVA, seguido de pós-teste de Bonferroni.

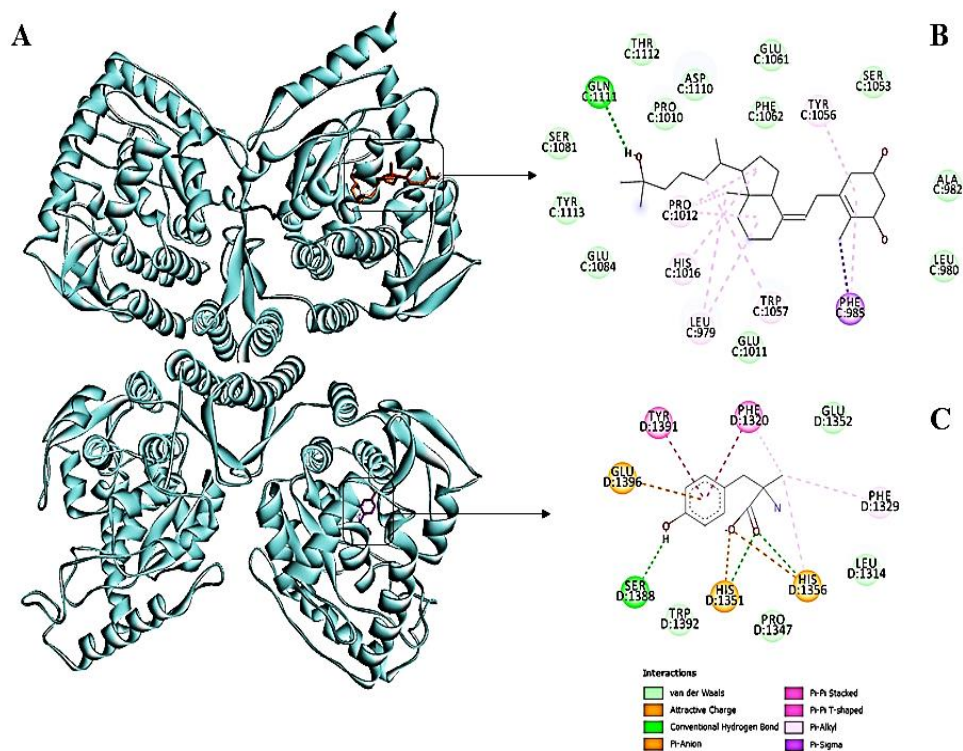
5.8. Ensaio de *Docking* molecular

Em simulações de docking molecular, VD3 exibiu energia de interação mais forte com a subunidade C da tirosina hidroxilase, TH (-9,5 kcal / mol) do que AMPT (um inibidor de TH) (-6,6 kcal / mol) na subunidade D (Figura 32). As interações hidrofóbicas foram realizadas com LEU979 (3,25 Å), PHE985 (3,64 e 3,47 Å), TYR1056 (3,68 e 3,79 Å), TRP1057 (3,50 Å), PHE1062 (3,91 Å) e ASP1110 (3,55 Å) resíduos e hidroxila terminal foi capaz de formar ligações de hidrogênio com LEU980 (3,19 Å) e GLN1111 (2,36 Å). As interações e distâncias estão resumidas na (Tabela 1).

Tabela 1. Interações teóricas entre 1 α , 25-dihidroxitamina D3 (VD3) e o inibidor de tirosina hidroxilase, alfa-metil-para-tirosina (AMPT) com tirosina hidroxilase (TH).

	Resíduo de aminoácido	Interação e distâncias (Å)	
1 α , 25-dihidroxitamina D3 (VD3)	Interações hidrofóbicas		
	LEU979C	3.25	-
	PHE985C	3.64	3.47
	TYR1056C	3.68	3.79
	TRP1057C	3.50	3.75
	PHE1062C	3.91	-
	ASP1110C	3.55	-
	Ligações de hidrogênio / Atomo acceptor		
	LEU980C	3.19 [O3]	-
	GLN1111C	2.36 [O2]	-
AMPT (Inibidor da TH)	Interações hidrofóbicas		
	LEU1314D	3.46	-
	PHE1320D	3.38	3.42
	TYR1391D	3.62	3.95
	Ligações de hidrogênio		
	HIS1356D	3.22 [N3]	-
	SER1388D	2.14 [O3]	-
	TYR1391D	2.49 [N3]	2.69 [O3]
	Pontes salinas		
	HIS1351D	4.43	
HIS1356D	4.98		

Figura 32. Interação da enzima tirosina hidroxilase (TH), VD3 e AMPT.



Em (A) Mapas em 2D das interações entre VD3 (B) e AMPT (C) e o receptor VD3.

5.9 Avaliação da expressão de TH e NF- κ B células PC12 por Western Blot

Foram extraídas as proteínas das células não tratadas, referentes ao grupo controle, as células que passaram pelo dano com rotenona e aquelas células que, além de serem tratadas com VD3 nas concentrações de 0,5 e 1 ng/mL, foram submetidas a rotenona em seguida, respectivamente, essas concentrações foram escolhidas por terem mostrado melhor efeito protetor no ensaio de viabilidade celular. Dessa forma, foi analisada a expressão da TH e NF- κ B normalizada pela análise concomitante da expressão da proteína constitutiva α -tubulina, conforme demonstrado nas (figuras 33 e 34).

Após análises, foi possível observar que células tratadas com a rotenona mostrou um aumento de 2,6 vezes a expressão de NF- κ B, enquanto o tratamento com a VD3 nas concentrações de 0,5 e 1 ng/mL e em seguida expostas a rotenona foi capaz de proteger contra esse estímulo inflamatório, reduzindo a expressão, indicativo de proteção celular

(Figura 35). Foi observado que a rotenona diminui a expressão da TH em 25%, enquanto os tratamentos na concentração de 0,5 e 1 ng/mL da VD3 protege a células PC12 aumentando essa expressão, principalmente de forma significativa na concentração de 1 ng/mL (figura 36).

Figura 33. Fotografia representativa do ensaio de Western blot, representando a expressão de NF-kB em células PC12 em comparação com a expressão de α -tubulina em células expostas à ROT.

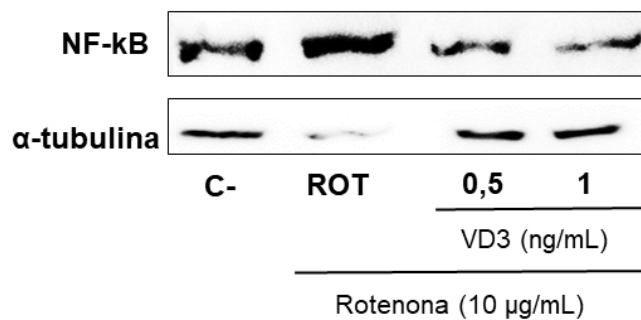
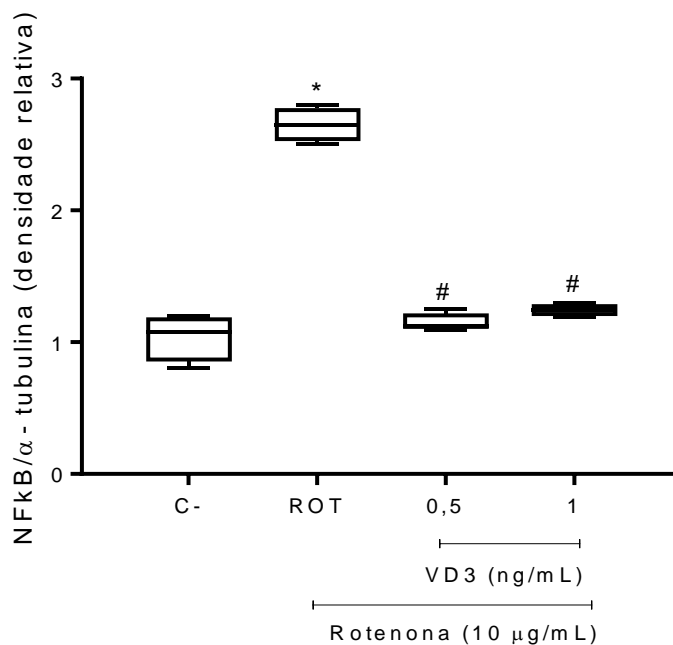


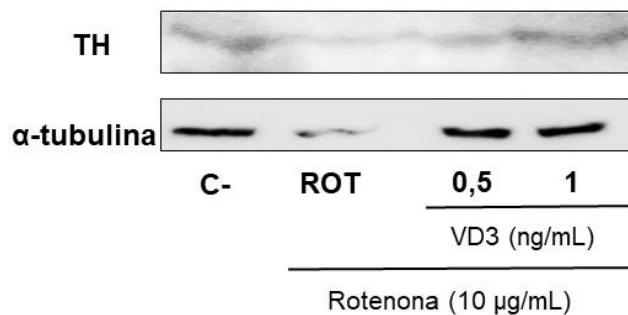
Figura 34. Expressão relativa de NF-kB em células PC12 pré-tratadas com (VD3) e em seguida ROT.



Os dados estão expressos como média padrão \pm EPM e avaliados por one-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ vs. controle; # $p < 0,05$ vs. Rotenona (ROT).

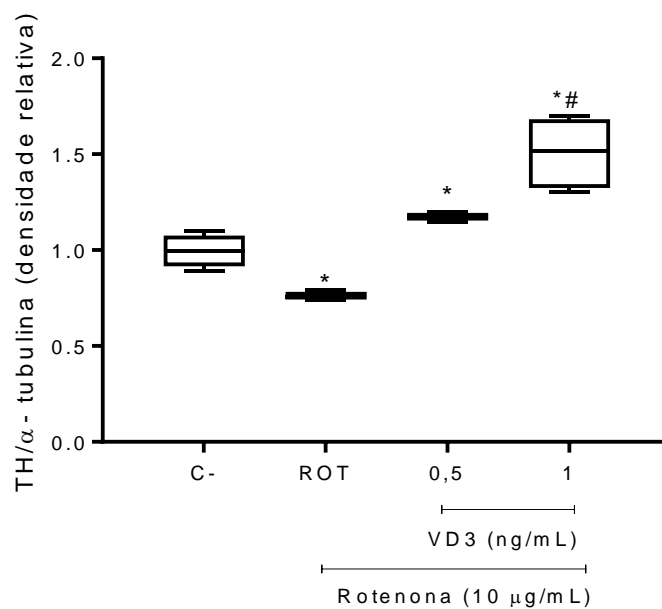
Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 35. Fotografia representativa do ensaio de Western blot, representando a expressão de tirosina hidroxilase (TH) em células PC12 em comparação com a expressão de α -tubulina em células expostas à ROT.



Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 36. Expressão relativa de TH em células PC12 pré-tratadas com (VD3) e em seguida ROT.



Fonte: Elaborado pela autora.

Os dados estão expressos como média padrão \pm EPM e avaliados por one-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni. *p < 0,05 vs. controle; #p < 0,05 vs. Rotenona (ROT).

5. DISCUSSÃO

A DP é uma doença neurodegenerativa caracterizada pela perda progressiva de neurônios dopaminérgicos no SNpc. Muitos estudos clínicos e pré-clínicos mostraram neuroinflamação, estresse oxidativo e disfunção mitocondrial como fatores importantes na DP (KAUR et al., 2017). No presente trabalho, avaliamos *in vitro* o efeito da VD3 sobre o estresse oxidativo, disfunção mitocondrial e morte celular, além da avaliação da morfologia, expressão de proteínas e interação da VD3 na tentativa de esclarecer o mecanismo de ação da VD3.

A partir dos resultados obtidos na citometria de fluxo para verificação da viabilidade celular pela marcação por 7AAD em células PC12 e pelo ensaio de MTT em astrócitos, foi possível observar uma diminuição da viabilidade celular no tratamento com rotenona e que as células pré-tratadas com VD3 apresentaram uma proteção em todas as concentrações. Com intuito de verificar alterações morfológicas e funcionais características de necrose e/ou apoptose as células foram duplamente marcadas com 7AAD/anexina pelo mesmo método de avaliação e foi identificada uma diminuição significativa no número de células viáveis associado à marcação característica de necrose nos grupos submetidos à rotenona, porém uma proteção nos grupos pré-tratados com VD3, demonstrando o potencial efeito neuroprotetor da mesma. A vitamina D é promissora e vem sendo bastante estudada nos últimos tempos e tem se mostrado como moduladora do crescimento, proliferação, diferenciação e sinalização de cálcio dos neuritos, além dos efeitos na neuroproteção e alteração da neurotransmissão e da plasticidade sináptica (GROVES; MCGRATH; BURNE, 2014). Estudos semelhantes como o de Gao e colaboradores (2015) mostrou que a rotenona (1 μ M) foi capaz de induzir morte celular por apoptose e reduziu a viabilidade celular em cerca de 40%.

A necrose é um tipo de morte celular no qual a célula sofre um insulto que tem como resultado um aumento do volume celular, agregação da cromatina, desorganização do citoplasma, perda da integridade da membrana plasmática e consequente ruptura celular, liberando dessa forma o conteúdo citoplasmático e causando inflamação (BERGHE et al., 2013). Já a morte celular programada por apoptose, é um processo fundamental na manutenção do desenvolvimento dos seres vivos, ocorrendo eliminação de células senescentes ou defeituosas. Alterações morfológicas como as próprias do processo caracterizam tanto o gatilho quanto as consequências locais e sistêmicas da

morte; essas alterações incluem a retração da célula, perda de aderência com a matriz extracelular e células vizinhas, condensação da cromatina, fragmentação internucleossômica do DNA, também ocorre ruptura da membrana externa mitocondrial, oxidação de lipídios de membrana e formação de prolongamentos citoplasmáticos e de corpos apoptóticos (GALLUZZI et al., 2018).

No presente estudo, foi realizada a avaliação morfológica por microscopia eletrônica de varredura nas duas linhagens de estudo PC12 e astrócitos, com o objetivo de identificar as alterações ultraestruturais induzidas pela rotenona e o efeito da VD3 frente esse dano. As células expostas a rotenona apresentaram alterações morfológicas características relacionadas à apoptose. Os tratamentos prévios com VD3 e posterior exposição com rotenona foi capaz de evitar, embora parcialmente, essas alterações, principalmente na concentração de 1 ng/mL de VD3 mantendo a morfologia das células e preservando os neuritos e suas terminações simpáticas. Esses resultados reforçam os indícios experimentais de que a VD3 exerce efeito neuroprotetor frente o dano induzido pela rotenona.

Assim como o composto MPTP (1-metil-4-fenil01,2,3,6-tetra-hidropiridina) já bem descrito na literatura sobre sua toxicidade, por causar síndromes parkinsonianas em humanos, roedores e primatas ao inibir o complexo mitocondrial I da cadeia de transporte de elétrons (KUBOTA et al., 2020), a rotenona um herbicida, usado nas áreas agrícolas, também é um inibidor do complexo I, provocando disfunção mitocondrial, devido à perda de neurônios dopaminérgicos nigrais em modelo de camundongo com DP (BETARBET et al., 2000; GASH et al., 2008). Levando em consideração que a DP em seres humanos ocorre de forma mais comum nas áreas agrícolas que nas cidades, sugere-se que toxinas ambientais podem ser um grande fator na causa da doença. A rotenona é um potente inibidor do complexo I da cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria e que ao entrar na célula, induz diminuição da produção de ATP, aumento dos níveis de EROs como superóxido e peróxido de hidrogênio causando estresse oxidativo e liberação de citocinas pro-inflamatórias tais como IL-1 β , IL-6 e TNF- α , levando a inflamação e apoptose celular (RADAD et al., 2019).

Cada vez mais o estresse oxidativo é reconhecido como um evento central que contribui para a degeneração dos neurônios dopaminérgicos na patogênese da (DP). Apesar da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) esteja implicada como um fator causal na DP, os mecanismos celulares e moleculares que envolve o estresse

oxidativo à morte de neurônios dopaminérgicos são complexos e não estão bem caracterizados. Os insultos causam a maior produção de ERO, o que contribui para o dano oxidativo ao atacar todas as macromoléculas, incluindo lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, levando a defeitos em sua função fisiológica. Defeitos nessas macromoléculas resultam conseqüentemente em disfunção mitocondrial e neuroinflamação, que provoca aumento da produção de ROS e, posterior, dano neuronal (JD et al., 2018).

Os astrócitos pertencem a classe de células gliais no sistema nervoso central (SNC), tem diversas funções dentre elas fornecem suporte estrutural e metabólico crítico aos neurônios, mas evidências crescentes revelam que o estresse oxidativo e nitrosativo astrocítico está envolvido e contribui para a patogênese da DP. Como os astrócitos executa um papel crítico na produção de antioxidantes e na desintoxicação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERO / ERN), o estresse oxidativo / nitrosativo astrocítico vem sendo apontado como um mediador crítico da etiologia da DP. Vários estudos mostram que o estresse celular e a inflamação provocam astrogliose reativa, isso faz com que inicie a produção de ERO / ERN astrocíticos, conseqüentemente pode levar ao estresse oxidativo / nitrosativo e à patogênese da DP. Apesar da causa da astrogliose reativa aberrante seja ainda desconhecida, mutações genéticas e exposição a toxinas ambientais como rotenona também podem contribuir para o estresse oxidativo / nitrosativo astrocítico (RIZOR et al., 2019).

Em uma análise pós-morte de pacientes com DP foi identificada a presença de astrócitos reativos (BEN HAIM et al., 2015). Estudos também demonstraram que a α -sinucleína liberada dos neurônios pode ser absorvida pelos astrócitos, isso também pode ser uma causa da astrogliose reativa, que foi visto em um modelo de co-cultura de astrócitos e SH-SY5Y (neuroblastoma), bem como em um modelo de camundongo transgênico α -sinucleína (LEE et al., 2010). Tomados em conjunto, esses achados demonstram que a astrogliose reativa está associada à DP por contribuir diretamente para a patogênese da DP ou como resultado de sua progressão.

O efeito de proteção da VD3 sobre mecanismos oxido-redutores ocasionado pela rotenona nas células PC12 e astrócitos foi avaliado utilizando o DCFH-DA e a Rho123 como marcadores de estresse oxidativo citoplasmático e mitocondrial, respectivamente. O pré-tratamento com VD3 diminuiu o acúmulo de EROs induzido pela rotenona, além de melhorar o potencial transmembrânico mitocondrial, como observado pelo aumento

do acúmulo mitocondrial de Rho123. Além disso a VD3 também foi capaz de manter os níveis de GSH que foram diminuídos pela toxicidade da rotenona na linhagem PC12 e astrócitos. Nosso estudo corrobora os dados de Sai *et al* (2008) e Liu *et al* (2007) que mostraram que a rotenona induz aumento de estresse oxidativo através da análise de DCFH-DA e diminui os níveis de GSH em células PC12 e astrócitos. Estudos realizados por (WIMALAWANSA, 2019) mostra que a vitamina D também é um antioxidante potente que facilita as atividades mitocondriais, evitando a oxidação de proteínas relacionadas ao estresse oxidativo, peroxidação de lipídios e danos ao DNA. Com base em estudos com animais, os pesquisadores relataram que a disfunção mitocondrial, uma parte do processo que ocorre no envelhecimento, pode ser retardada pela suplementação de micronutrientes (por exemplo, por ácido lipóico, acetil carnitina, vitamina K e vitamina D) (AMES, 2010).

A vitamina D controla a expressão de Nrf2, que é um fator de transcrição sensível a redox que ativa muitos genes que codificam enzimas antioxidantes (NAKAI et al., 2014). Em resposta ao estresse oxidativo, o Nrf2, que está dissociado do Keap1, entra no núcleo fornecendo sinais para a regulação transcricional de genes relacionados ao elemento de resposta anti-oxidante (ARE) tais como catalase, glutamato cisteína ligase (GCL) que sintetiza o tampão redox GSH, glutationa S-transferase, hemoxigenase 1 (HO1), NAD(P) H quinona oxidase 1 (NQO1), peroxiredoxinas, SOD1, SOD2 e tioredoxina (TRX). Nrf2 também atua no aumento da expressão de sulfiredoxinas que atuam na redução das peroxiredoxinas oxidadas (BERRIDGE, 2015b).

A vitamina D também regula expressão da γ -glutamil transpeptidase que contribui para a síntese de GSH (BERRIDGE, 2015a). Esses resultados mostram o potencial neuroprotetor da vitamina D envolvido no equilíbrio redox e nos processos de prevenção, bem como do mecanismo de ação da substância em estudo. Nas doenças neurodegenerativas como a DP, ocorre uma alteração nos níveis de glutationa. Em um estudo realizado em cérebros post-mortem de pacientes com DP foi observado uma diminuição seletiva de GSH na substância negra (SIAN et al., 1994). Também foi visto em experimentos *in vivo* e *in vitro* que a reposição dos níveis intracelulares de GSH pode prevenir o dano oxidativo e dessa forma manter a função mitocondrial em células dopaminérgicas, mostrando que restaurar os níveis de GSH nos cérebros de pacientes com DP é uma estratégia promissora para modificar a progressão da doença (PRADHAN et al., 2020).

Outros estudos mostraram que a VD3 possui efeitos protetores contra os radicais livres gerados por espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico, também inibe a síntese de óxido nítrico sintase induzível, além de regular a atividade da gama glutamil transpeptidase, uma enzima chave envolvida na metabolismo da glutatona (GARCION et al., 1997; IBI et al., 2001). Foi observado que mesmo depois de tratamentos com neurotoxinas ou inibidores de síntese de glutatona, a vitamina D tem o potencial de aumentar os níveis de glutatona em neurônios dopaminérgicos mesencefálicos (GARCION et al., 1999). A vitamina D tem também ação protetora na disfunção endotelial cerebral por apresentar efeitos inibitórios na produção de ERO e na ativação de NF- κ B (WON et al., 2015). Além de apresentar diversos receptores expresso no cérebro (EYLES et al., 2005). Ela ativada tem efeito de regular os níveis de neurotrofina (BDNF e NGF) e também protege da morte neuronal (ANNWEILER et al., 2013).

Superóxido dismutases (SOD) são importantes enzimas antioxidantes que catalisam a conversão do superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio. Os ânions superóxidos são enzimas de sinalização e subprodutos de vários processos metabólicos, incluindo a respiração mitocondrial. Por meio de sua atividade, as enzimas SOD controlam os níveis de uma variedade de espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN) (WANG et al., 2018). No presente estudo, mostramos que a rotenona induziu um aumento significativo no acúmulo de superóxido, e o tratamento com VD3 foi capaz de prevenir esse acúmulo de superóxido de forma dependente da concentração, sugerindo que a vitamina D tem um efeito antioxidante direto nas células PC12.

Vitamina D parece essencial para o desenvolvimento normal de neurônios dopaminérgicos. A VD3 afeta a síntese e o metabolismo da dopamina, bem como a expressão do fator neurotrófico derivado de células gliais (GDNF), que é crucial para a sobrevivência dos neurônios dopaminérgicos (PERTILE et al., 2018).

A DP é causada principalmente por uma deficiência do neurotransmissor dopamina (DA), considerada devida à degeneração progressiva dos neurônios DA nigro-estriatal. A tirosina hidroxilase (TH) catalisa a conversão de L-tirosina em L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA), que é a etapa inicial e limitante da taxa na biossíntese de catecolaminas (DA, noradrenalina e adrenalina). A DP afeta especificamente os neurônios contendo TH. A neurodegeneração mais acentuada em pacientes com deficiência de DA é observada nos neurônios DA nigro-estriatal, que contêm TH em

abundância. Consequentemente, especulou-se que o TH desempenha alguns papéis importantes na fisiopatologia da DP (NAGATSU et al., 2019). No presente trabalho, a VD3 foi capaz de proteger as células PC12 da diminuição da expressão de TH, sendo promissora na DP.

Cada vez mais os métodos computacionais para prever possíveis ligações e interações de alvos importante em diversas patologias vêm sendo amplamente utilizados para estudos de desenvolvimento de medicamentos, para fornecer vantagens em comparação com os métodos tradicionais, sendo importantes para o desenvolvimento de medicamentos, aumentando dessa forma as taxas de sucesso, menor tempo e custos. Além disso, esses métodos representam um ganho ético, uma vez que reduzem o número de animais e recursos biológicos utilizados em pesquisas experimentais (CHALLAL et al., 2012).

A 1 α ,25-dihidroxitamina D3 foi capaz de interagir com a subunidade da TH. Além disso, a VD3 apresentou interação mais forte com a proteína do que o inibidor (AMPT), ambos com valores abaixo de -6,0 kcal / mol, implicando em ligações mais estáveis e passíveis de ocorrer (SHITYAKOV; FÖRSTER, 2014), que podem estar relacionadas a interações hidrofóbicas e ocorrência de ligações de hidrogênio muito fortes, com distâncias entre 2,0 e 3,1 Å (IMBERTY et al., 1991). No entanto, apesar da alta energia de ligação e da ocorrência de fortes interações, essas subunidades não estão envolvidas no sítio de ligação da tirosina (DAUBNER et al., 2006). Nossos resultados sugerem que a ligação da vitamina D neste local pode modular positivamente a ativação da enzima, talvez modulando a expressão gênica e a fosforilação de proteínas (TEKIN et al., 2014).

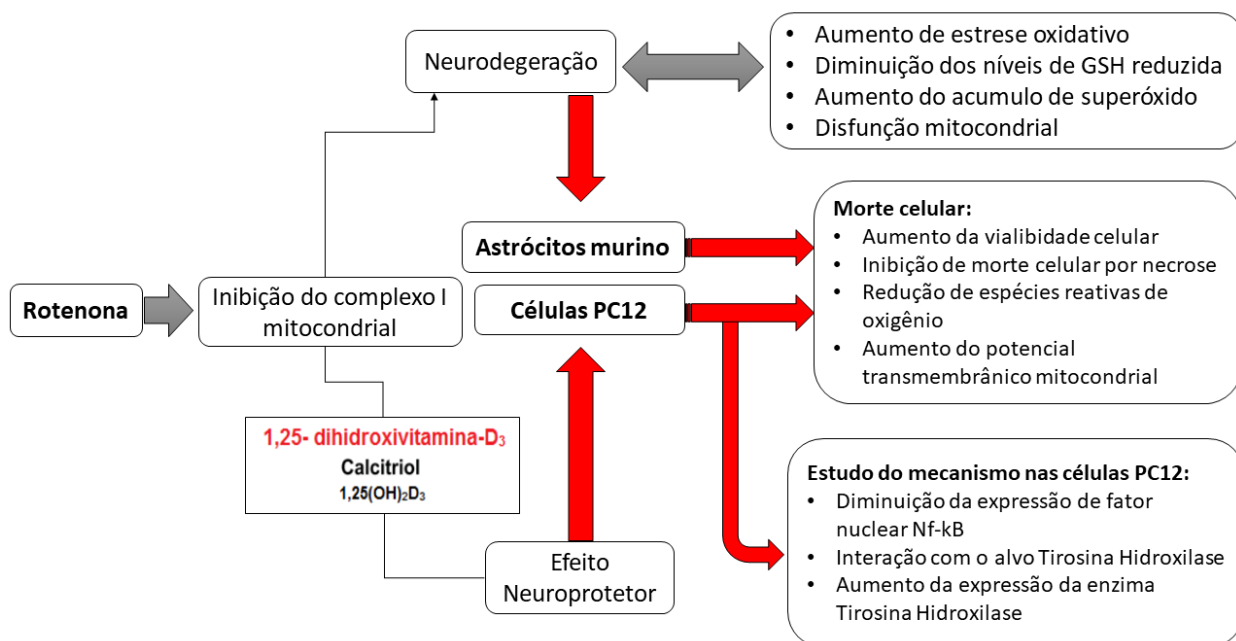
A inflamação causa degeneração no cérebro. A ativação de células gliais como astrócitos liberam muitos fatores pró-inflamatórios, ativação do fator nuclear Kappa-B (NF-kB), mediadores neurotóxicos e também aumenta a expressão de proteínas receptoras relacionadas à inflamação nas células cerebrais. Esses mediadores inflamatórios e expressões proteicas aumentam ainda mais a neuroinflamação e a neurodegeneração de uma maneira viciosa, causando doenças neurodegenerativas progressivas, como a DP (KEMPURAJ et al., 2016; TAYSA BERVIAN BASSANI; VITAL; RAUH, 2015). A expressão da subunidade p65 do NF-kB é significativamente maior no mesencéfalo de pacientes com DP, e a análise imunofluorescente indica que a exposição a estímulos inflamatórios induz aumentos robustos na expressão astrocítica de

p65 em um modelo de camundongo MPTP (GHOSH et al., 2007). A regulação positiva de NF-kB inicia um aumento marcante na geração de ERO / ERN astrocíticas e na liberação de citocinas pró-inflamatórias, iniciando uma cascata tóxica de inflamação crônica e estresse oxidativo / nitrosativo astrocítico, levando à neurotoxicidade (KAUR; SHARMA; DESHMUKH, 2019). Nos ensaios de Western blot no presente trabalho, a VD3 foi capaz de proteger o aumento da expressão de NF-kB, mostrando-se como promissor agente protetor contra DP.

Lima et al (2018) mostramos que os pré ou pós-tratamentos com VD3 reverteram as mudanças comportamentais e melhoraram o conteúdo reduzido de DA do grupo 6-OHDA em modelo animal de DP. Além disso, a VD3 reduziu o estresse oxidativo, aumentou (TH e DAT) e reduziu (TNF-alfa) em ensaios de imunomarcações. Embora diminuições significativas na imunorreatividade de VD3R tenham sido observadas após a lesão com a 6-OHDA, essas alterações foram bloqueadas após pré ou pós-tratamentos com VD3.

Outros (CUI et al., 2015), mostraram que VD3 promove aumento da expressão de TH e modula diretamente a expressão de TH. A VD3 exerce seus efeitos ligando-se ao VD3R, modulando a expressão de vários genes. A deficiência de VD3 agora está associada a muitas condições de saúde, incluindo DP. Esses achados, juntamente com a descoberta de que o VD3R e a 1 α -hidroxilase (enzima que converte VD3 em sua forma ativa), são altamente expressos na substância negra, levaram à hipótese de que níveis inadequados de VD3 circulante podem levar à disfunção celular e morte neuronal (FULLARD; DUDA, 2020b). A seguir, na figura 37, é apresentado um mapa mental que correlaciona os achados do presente trabalho.

Figura 37. Fluxograma com a correlação dos achados do presente trabalho.



6. CONCLUSÃO

Tomados em conjunto, os dados obtidos neste estudo permite concluir que:

- A vitamina D (VD3) é neuroprotetora contra a toxicidade induzida por rotenona no modelo PC12 (*in vitro*) da doença de Parkinson e em células de astrócitos murinho, considerando-se a importância dessas células na fisiopatologia da neuroinflamação e da DP, porque:
- A VD3 melhorou a viabilidade das células e diminuiu a produção de espécie reativas de oxigênio e o estresse oxidativo;
- A VD3 foi eficaz em prevenir a morte celular, ocasionada pela rotenona em células PC12 e em astrócitos;
- A VD3 preveniu a disfunção mitocondrial, evitando a diminuição do potencial transmembranar mitocondrial causado pela rotenona;
- Na avaliação morfológica por microscopia eletrônica de varredura foi observado que a VD3 preveniu em parte os danos causados por rotenona em células PC12 e em astrócitos;
- Nos testes de predição e modelagem foi observado a interação da VD3 com a enzima TH, enzima limitante na síntese da dopamina.
- VD3 preveniu a diminuiu da expressão da TH em células PC12, causada por rotenona;
- VD3 preveniu o aumento da expressão do NF-kB em células PC12, causado por rotenona.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os efeitos da VD3, conforme demonstrado no presente estudo, podem resultar de suas ações anti-inflamatórias e antioxidantes e de suas ações no VD3R. A VD3 exerce efeito antienvhecimento ativando a via de sinalização antioxidante Nrf2. Efeitos neuroprotetores foram observados após ativação do Nrf2 em modelos de DP e alteração nessa via de sinalização pode contribuir para EO, conforme demonstrado em trabalhos anteriores. Embora nossos dados sejam inéditos e possam estimular a pesquisa translacional em direção ao potencial da VD3 para prevenção ou tratamento de doenças neurodegenerativas, como DP, mais estudos são necessários para esclarecer os mecanismos de ação de VD3 em células PC12 (modelo celular de DP) e em astrócitos.

REFERÊNCIAS

ALARCÓN-ARÍS, D. et al. Anti- α -synuclein ASO delivered to monoamine neurons prevents α -synuclein accumulation in a Parkinson's disease-like mouse model and in monkeys. **EBioMedicine**, v. 59, 1 set. 2020.

ALBERT J CZAJA; MONTANO-LOZA, A. J. Evolving Role of Vitamin D in Immune-Mediated Disease and Its Implications in Autoimmune Hepatitis. **Digestive diseases and sciences**, v. 64, n. 2, p. 324–344, 15 fev. 2019.

AMES, B. N. Optimal micronutrients delay mitochondrial decay and age-associated diseases. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 131, n. 7–8, p. 473–479, 1 jul. 2010.

ANNWEILER, C. et al. Vitamin D concentration and lateral cerebral ventricle volume in older adults. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 57, n. 2, p. 267–276, 2013.

BALLATORI, N. et al. Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. **Biological chemistry**, v. 390, n. 3, p. 191–214, 1 mar. 2009.

BEGOÑA SANCHEZ et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ administration to 6-hydroxydopamine-lesioned rats increases glial cell line-derived neurotrophic factor and partially restores tyrosine hydroxylase expression in substantia nigra and striatum. **Journal of neuroscience research**, v. 87, n. 3, p. 723–732, 15 fev. 2009.

BEN HAIM, L. et al. Elusive roles for reactive astrocytes in neurodegenerative diseases. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 0, n. AUGUST, p. 278, 3 ago. 2015.

BENAZZOUZ, A. et al. Involvement of dopamine loss in extrastriatal basal ganglia nuclei in the pathophysiology of Parkinson's disease. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 6, n. MAY, 2014.

BENITA WIATRAK et al. PC12 Cell Line: Cell Types, Coating of Culture Vessels, Differentiation and Other Culture Conditions. **Cells**, v. 9, n. 4, 14 abr. 2020.

BERGHE, T. VANDEN et al. Determination of apoptotic and necrotic cell death in vitro and in vivo. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 61, n. 2, p. 117–129, 1 jun. 2013.

BERRA, C. M.; MENCK, C. F. M.; DI MASCIO, P. Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1340–1344, 2006.

BERRIDGE, M. J. Vitamin D cell signalling in health and disease. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 460, n. 1, p. 53–71, 2015a.

BERRIDGE, M. J. Vitamin D: a custodian of cell signalling stability in health and disease. **Biochemical Society Transactions**, v. 43, n. 3, p. 349–358, 1 jun. 2015b.

BETARBET, R. et al. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. **Nature Neuroscience**, v. 3, n. 12, p. 1301–1306, 2000.

BISBAL, M.; SANCHEZ, M. Neurotoxicity of the pesticide rotenone on neuronal polarization: a mechanistic approach. **Neural Regeneration Research**, v. 14, n. 5, p. 762, 1 maio 2019.

BOSE, A.; BEAL, M. F. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. **Translational neurodegeneration**, v. 5, n. 1, 22 jul. 2016a.

BOSE, A.; BEAL, M. F. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. **Journal of Neurochemistry**, v. 139, p. 216–231, 1 out. 2016b.

CHANG-HWAN IM et al. Computational methods in neuroengineering. **Computational and mathematical methods in medicine**, v. 2013, 2013.

CHEUNG, Y. T. et al. Effects of all-trans-retinoic acid on human SH-SY5Y neuroblastoma as in vitro model in neurotoxicity research. **NeuroToxicology**, v. 30, n. 1, p. 127–135, jan. 2009.

CHIHANGA, T. et al. NMR spectroscopy and electron microscopy identification of

metabolic and ultrastructural changes to the kidney following ischemia-reperfusion injury. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, v. 314, n. 2, p. F154, 1 fev. 2018.

CHRISTAKOS, S. et al. Vitamin D: Metabolism, Molecular Mechanism of Action, and Pleiotropic Effects. <https://doi.org/10.1152/physrev.00014.2015>, v. 96, n. 1, p. 365–408, 16 dez. 2015.

CHUN, R. F. et al. Vitamin D and DBP: The free hormone hypothesis revisited. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 144, n. PART A, p. 132–137, 1 out. 2014.

COLLINS, M. A.; NEAFSEY, E. J. Potential neurotoxic “agents provocateurs” in Parkinson’s disease. **Neurotoxicology and teratology**, v. 24, n. 5, p. 571–577, set. 2002.

CONSIGLIO, M. et al. Mitochondrial and lipogenic effects of vitamin D on differentiating and proliferating human keratinocytes. **Experimental dermatology**, v. 24, n. 10, p. 748–753, 1 out. 2015.

CUI, X. et al. Vitamin D regulates tyrosine hydroxylase expression: N-cadherin a possible mediator. **Neuroscience**, v. 304, p. 90–100, 24 set. 2015.

DAUBNER, S. C. et al. A flexible loop in tyrosine hydroxylase controls coupling of amino acid hydroxylation to tetrahydropterin oxidation. **Journal of molecular biology**, v. 359, n. 2, p. 299–307, jun. 2006.

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

DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **Journal of Immunological Methods**, v. 89, n. 2, p. 271–277, 22 maio 1986.

DI DOMENICO, A. et al. Patient-Specific iPSC-Derived Astrocytes Contribute to Non-Cell-Autonomous Neurodegeneration in Parkinson’s Disease. **Stem Cell Reports**, v. 12,

n. 2, p. 213–229, 12 fev. 2019.

DRINGEN, R.; SCHEIBER, I. F.; MERCER, J. F. Copper metabolism of astrocytes. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 0, n. MAR, p. 9, 2013.

DUARTE-JURADO, A. P. et al. Antioxidant therapeutics in parkinson's disease: Current challenges and opportunities. **Antioxidants**, v. 10, n. 3, p. 1–19, 2021.

ER, D. et al. Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. **Neurology**, v. 68, n. 5, p. 384–386, 2007.

ERUSTES, A. G. et al. Overexpression of α -synuclein in an astrocyte cell line promotes autophagy inhibition and apoptosis. **Journal of Neuroscience Research**, v. 96, n. 1, p. 160–171, 1 jan. 2018.

EYLES, D. W. et al. Distribution of the Vitamin D receptor and 1 α -hydroxylase in human brain. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 29, n. 1, p. 21–30, 2005.

FRANCO-IBORRA, S.; VILA, M.; PÉRIER, C. The Parkinson Disease Mitochondrial Hypothesis: Where Are We at? **The Neuroscientist: a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry**, v. 22, n. 3, p. 266–277, 1 jun. 2016.

FULLARD, M. E.; DUDA, J. E. A Review of the Relationship Between Vitamin D and Parkinson Disease Symptoms. **Frontiers in Neurology**, v. 0, p. 454, 27 maio 2020a.

FULLARD, MI.; DUDA, J. A Review of the Relationship Between Vitamin D and Parkinson Disease Symptoms. **Frontiers in neurology**, v. 11, 27 maio 2020b.

GALLUZZI, L. et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. **Cell Death & Differentiation 2018 25:3**, v. 25, n. 3, p. 486–541, 23 jan. 2018.

GARCION, E. et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ inhibits the expression of inducible nitric oxide synthase in rat central nervous system during experimental allergic

encephalomyelitis. **Molecular Brain Research**, v. 45, n. 2, p. 255–267, 1997.

GARCION, E. et al. **1,25-dihydroxyvitamin D3 regulates the synthesis of γ -glutamyl transpeptidase and glutathione levels in rat primary astrocytes** **Journal of Neurochemistry**, 1999.

GASH, D. M. et al. Trichloroethylene: Parkinsonism and complex 1 mitochondrial neurotoxicity. **Annals of Neurology**, v. 63, n. 2, p. 184–192, 2008.

GATTO, N. M. et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms and Parkinson's disease in a population with high ultraviolet radiation exposure. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 352, n. 1–2, p. 88–93, 15 maio 2015.

GHOSH, A. et al. Selective inhibition of NF- κ B activation prevents dopaminergic neuronal loss in a mouse model of Parkinson's disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 47, p. 18754–18759, 20 nov. 2007.

GIL, A. H.; PLAZA-DÍAZ, J.; MESA, M. D. Vitamin D: Classic and Novel Actions. **Annals of nutrition & metabolism**, v. 72, n. 2, p. 87–95, 1 mar. 2018.

GIVAN, A. L. Flow Cytometry. In: HAWLEY, T. S.; ROBERT G HAWLEY (Eds.). . **Methods in Molecular Biology: Flow Cytometry Protocols**. 2^a ed. Totowa: Humana Press, 2004. v. 263p. 434.

GORMAN, A. M. et al. Use of flow cytometry techniques in studying mechanisms of apoptosis in leukemic cells. **Cytometry**, v. 29, n. 2, p. 97–105, 1 out. 1997.

GRAU, C. M.; GREENE, L. A. Use of PC12 cells and rat superior cervical ganglion sympathetic neurons as models for neuroprotective assays relevant to parkinson's disease. **Methods in Molecular Biology**, v. 846, p. 201–211, 2012.

GREENE, L. A.; REIN, G. Release of (3H)norepinephrine from a clonal line of pheochromocytoma cells (PC12) by nicotinic cholinergic stimulation. **Brain research**, v. 138, n. 3, p. 521–528, 23 dez. 1977.

GREENE, L. A.; TISCHLER, A. S. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 73, n. 7, p. 2424–2428, 1976.

GROVES, N. J.; MCGRATH, J. J.; BURNE, T. H. J. Vitamin D as a neurosteroid affecting the developing and adult brain. **Annual Review of Nutrition**, v. 34, p. 117–141, 2014.

HADDAD, D.; NAKAMURA, K. Understanding the susceptibility of dopamine neurons to mitochondrial stressors in Parkinson's disease. **FEBS Letters**, v. 589, n. 24, p. 3702–3713, 21 dez. 2015.

HANAA HIBISHY GABALLAH et al. Modulatory effects of resveratrol on endoplasmic reticulum stress-associated apoptosis and oxido-inflammatory markers in a rat model of rotenone-induced Parkinson's disease. **Chemico-biological interactions**, v. 251, p. 10–16, 5 maio 2016.

HOLICK, M. F. Vitamin D and brain health: the need for vitamin D supplementation and sensible sun exposure. **Journal of internal medicine**, v. 277, n. 1, p. 90–93, 1 jan. 2015.

HUANG, Y.-N. et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ attenuates endotoxin-induced production of inflammatory mediators by inhibiting MAPK activation in primary cortical neuron-glia cultures. **Journal of neuroinflammation**, v. 12, n. 1, 12 ago. 2015.

I, N. et al. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ regulates the synthesis of nerve growth factor in primary cultures of glial cells. **Brain research. Molecular brain research**, v. 24, n. 1–4, p. 70–76, 1994.

IBI, M. et al. Protective effects of 1 α ,25-(OH)₂D₃ against the neurotoxicity of glutamate and reactive oxygen species in mesencephalic culture. **Neuropharmacology**, v. 40, n. 6, p. 761–771, 2001.

IMBERTY, A. et al. Molecular modelling of protein-carbohydrate interactions. Docking of monosaccharides in the binding site of concanavalin A. **Glycobiology**, v. 1, n. 6, p. 631–642, dez. 1991.

JD, G. et al. Damage to dopaminergic neurons by oxidative stress in Parkinson's disease (Review). **International journal of molecular medicine**, v. 41, n. 4, p. 1817–1825, 1 abr. 2018.

JOHN S ADAMS; HEWISON, M. Update in vitamin D. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 95, n. 2, p. 471–478, 2010.

JORDI BOVÉ et al. Toxin-induced models of Parkinson's disease. **NeuroRx: the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics**, v. 2, n. 3, p. 484–494, 2005.

JOSHI, S. et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 Ameliorates Th17 Autoimmunity via Transcriptional Modulation of Interleukin-17A. **Molecular and Cellular Biology**, v. 31, n. 17, p. 3653, set. 2011.

K, K. Uncertain verdict as vitamin D goes on trial. **Science (New York, N.Y.)**, v. 337, n. 6101, p. 1476–1478, 21 set. 2012.

KATHARINE HANROTT et al. 6-hydroxydopamine-induced apoptosis is mediated via extracellular auto-oxidation and caspase 3-dependent activation of protein kinase Cdelta. **The Journal of biological chemistry**, v. 281, n. 9, p. 5373–5382, 3 mar. 2006.

KAUR, D.; SHARMA, V.; DESHMUKH, R. Activation of microglia and astrocytes: a roadway to neuroinflammation and Alzheimer's disease. **Inflammopharmacology 2019 27:4**, v. 27, n. 4, p. 663–677, 14 mar. 2019.

KAUR, K. et al. Neuroinflammation - A major cause for striatal dopaminergic degeneration in Parkinson's disease. **Journal of the neurological sciences**, v. 381, p. 308–314, 15 out. 2017.

KEMPURAJ, D. et al. Neuroinflammation Induces Neurodegeneration. **Journal of neurology, neurosurgery and spine**, v. 1, n. 1, 2016.

KHURGEL, M.; IVY, G. O. Astrocytes in kindling: relevance to epileptogenesis. **Epilepsy Research**, v. 26, n. 1, p. 163–175, 1 dez. 1996.

KUBOTA, M. et al. Carnosine suppresses neuronal cell death and inflammation induced by 6-hydroxydopamine in an in vitro model of Parkinson's disease. **PLoS ONE**, v. 15, n. 10 October, p. 1–14, 2020.

LEE, H.-J. et al. Direct Transfer of α -Synuclein from Neuron to Astroglia Causes Inflammatory Responses in Synucleinopathies *. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 12, p. 9262–9272, 19 mar. 2010.

LIMA, L. A. R. et al. Vitamin D protects dopaminergic neurons against neuroinflammation and oxidative stress in hemiparkinsonian rats. **Journal of neuroinflammation**, v. 15, n. 1, 31 ago. 2018.

LOPES, F. M. et al. Comparison between proliferative and neuron-like SH-SY5Y cells as an in vitro model for Parkinson disease studies. **Brain research**, v. 1337, p. 85–94, 14 jun. 2010.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of biological chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–275, nov. 1951.

LV, L. et al. **The relationships of vitamin D, vitamin D receptor gene polymorphisms, and vitamin D supplementation with Parkinson's disease** *Translational Neurodegeneration* BioMed Central, , 1 set. 2020. Disponível em: <<https://translationalneurodegeneration.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40035-020-00213-2>>. Acesso em: 19 ago. 2021

LV, Z. et al. Vitamin D status and Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. **Neurological Sciences** 2014 35:11, v. 35, n. 11, p. 1723–1730, 22 maio 2014.

MARGOLIS, R. N.; CHRISTAKOS, S. The nuclear receptor superfamily of steroid hormones and vitamin D gene regulation. An update. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1192, p. 208–214, 2010.

MARIJA USENOVIC et al. Deficiency of ATP13A2 leads to lysosomal dysfunction, α -synuclein accumulation, and neurotoxicity. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 32, n. 12, p. 4240–4246, 21 mar. 2012.

MASATOSHI INDEN et al. PARK7 DJ-1 protects against degeneration of nigral dopaminergic neurons in Parkinson's disease rat model. **Neurobiology of disease**, v. 24, n. 1, p. 144–158, out. 2006.

MASEREJIAN, N.; VINIKOOR-IMLER, L.; DILLEY, A. **Estimativa da População Global da Doença de Parkinson (DP) em 2020 - MDS Abstracts**. Disponível em: <<https://www.mdsabstracts.org/abstract/estimation-of-the-2020-global-population-of-parkinsons-disease-pd/>>. Acesso em: 19 ago. 2021.

MATHIEU MARELLA et al. Parkinson's disease and mitochondrial complex I: a perspective on the Ndi1 therapy. **Journal of bioenergetics and biomembranes**, v. 41, n. 6, p. 493–497, dez. 2009.

MEDEIROS, L. M. DE et al. Cholinergic Differentiation of Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cell Line and Its Potential Use as an In vitro Model for Alzheimer's Disease Studies. **Molecular neurobiology**, v. 56, n. 11, p. 7355–7367, 1 nov. 2019.

MILLET, P. et al. [Role of vitamin D in the physiopathology of neurodegenerative diseases]. **Biologie aujourd'hui**, v. 208, n. 1, p. 77–88, 2014.

MIRZAEI, H. et al. Identification of Rotenone-Induced Modifications in α -Synuclein Using Affinity Pull-Down and Tandem Mass Spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 78, n. 7, p. 2422–2431, 1 abr. 2006.

MOSMANN, T. R. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 16 dez. 1983.

- NAGATSU, T. et al. **Human tyrosine hydroxylase in Parkinson's disease and in related disorders***Journal of Neural Transmission*Springer-Verlag Wien, , abr. 2019.
- NAKAI, K. et al. Vitamin D Activates the Nrf2-Keap1 Antioxidant Pathway and Ameliorates Nephropathy in Diabetic Rats. **American Journal of Hypertension**, v. 27, n. 4, p. 586–595, 1 abr. 2014.
- NEWMARK, H. L.; NEWMARK, J. Vitamin D and Parkinson's disease—A hypothesis. **Movement Disorders**, v. 22, n. 4, p. 461–468, 15 mar. 2007.
- NISTICÒ, R. et al. Paraquat-and Rotenone-Induced Models of Parkinson's Disease: <http://dx.doi.org/10.1177/039463201102400205>, v. 24, n. 2, p. 313–322, 1 abr. 2011.
- PAUL KNEKT et al. Serum vitamin D and the risk of Parkinson disease. **Archives of neurology**, v. 67, n. 7, p. 808–811, jul. 2010.
- PEARCE, S. H.; CHEETHAM, T. D. Diagnosis and management of vitamin D deficiency. **BMJ**, v. 340, n. 7738, p. 142–147, 11 jan. 2010.
- PERIER, C.; VILA, M. Mitochondrial Biology and Parkinson's Disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 2, n. 2, p. a009332, 1 fev. 2012.
- PERTILE, R. A. N. et al. Vitamin D regulation of GDNF/Ret signaling in dopaminergic neurons. **The FASEB Journal**, v. 32, n. 2, p. 819–828, 1 fev. 2018.
- PETERSON, A. L.; MANCINI, M.; HORAK, F. B. The relationship between balance control and vitamin D in Parkinson's disease-a pilot study. **Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society**, v. 28, n. 8, p. 1133–1137, jul. 2013.
- PETTERSEN, E. F. et al. UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1605–1612, 2004.
- POEWE, W. et al. Parkinson disease. **Nature Reviews Disease Primers 2017 3:1**, v. 3,

n. 1, p. 1–21, 23 mar. 2017.

POKORNÝ, J. et al. Targeting mitochondria for cancer treatment - two types of mitochondrial dysfunction. **Prague medical report**, v. 115, n. 3–4, p. 104–119, 2014.

PRADHAN, P. et al. Enhanced accumulation of reduced glutathione by Scopoletin improves survivability of dopaminergic neurons in Parkinson's model. **Cell Death and Disease**, v. 11, n. 9, 2020.

PRINGSHEIM, T. et al. The prevalence of Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis. **Movement Disorders**, v. 29, n. 13, p. 1583–1590, 1 nov. 2014.

QIAO, L.; WONG, B. C. Y. Targeting apoptosis as an approach for gastrointestinal cancer therapy. **Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy**, v. 12, n. 3, p. 55–64, jun. 2009.

RADAD, K. et al. Rotenone: from modelling to implication in Parkinson's disease. **Folia neuropathologica**, v. 57, n. 4, p. 317–326, 2019.

RANG, H. P. et al. Rang & Dale's Pharmacology, 8e. p. 776, 2015.

RAZA, C.; ANJUM, R.; SHAKEEL, N. UL A. Parkinson's disease: Mechanisms, translational models and management strategies. **Life sciences**, v. 226, p. 77–90, 1 jun. 2019.

RIMMELZWAAN, L. M. et al. Systematic Review of the Relationship between Vitamin D and Parkinson's Disease. **Journal of Parkinson's Disease**, v. 6, n. 1, p. 29–37, 1 jan. 2016.

RIZOR, A. et al. Astrocytic Oxidative/Nitrosative Stress Contributes to Parkinson's Disease Pathogenesis: The Dual Role of Reactive Astrocytes. **Antioxidants 2019, Vol. 8, Page 265**, v. 8, n. 8, p. 265, 1 ago. 2019.

ROCHA, D. D. et al. Cell cycle arrest through inhibition of tubulin polymerization by

withaphysalin F, a bioactive compound isolated from *Acnistus arborescens*. **Investigational New Drugs**, v. 30, n. 3, p. 959–966, jun. 2012.

ROMMELFANGER, K. S.; WICHMANN, T. Extrastriatal dopaminergic circuits of the Basal Ganglia. **Frontiers in neuroanatomy**, v. 4, n. OCT, 27 out. 2010.

ROWAN P ORME; BHANGAL, M. S.; FRICKER, R. A. Calcitriol imparts neuroprotection in vitro to midbrain dopaminergic neurons by upregulating GDNF expression. **PloS one**, v. 8, n. 4, 23 abr. 2013.

RUSSELL, J.; ANJANEYULU, M.; BERENT-SPILLSON, A. Metabotropic Glutamate Receptors (mGluRs) and Diabetic Neuropathy. **Current Drug Targets**, v. 9, n. 1, p. 85–93, 19 jan. 2008.

SAIKI, S.; SATO, S.; HATTORI, N. Molecular pathogenesis of Parkinson's disease: update. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v. 83, n. 4, p. 430–436, 1 abr. 2012.

SENTHILKUMAR S KARUPPAGOUNDER et al. LRRK2 G2019S transgenic mice display increased susceptibility to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-mediated neurotoxicity. **Journal of chemical neuroanatomy**, v. 76, n. Pt B, p. 90–97, 1 out. 2016.

SHARMA, S. et al. Identification of chemopreventive agents by screening for induction of glutathione-S-transferase as a biomarker. **Methods in Cell Science** 1997 19:1, v. 19, n. 1, p. 49–52, 1997.

SHERER, T. B. et al. An In Vitro Model of Parkinson's Disease: Linking Mitochondrial Impairment to Altered α -Synuclein Metabolism and Oxidative Damage. **Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 16, p. 7006–7015, 15 ago. 2002.

SHITYAKOV, S.; FÖRSTER, C. In silico predictive model to determine vector-mediated transport properties for the blood-brain barrier choline transporter. **Advances and Applications in Bioinformatics and Chemistry**, v. 7, n. 1, p. 23–36, 2014.

SIAN, J. et al. Alterations in glutathione levels in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders affecting basal ganglia. **Annals of Neurology**, v. 36, n. 3, p. 348–355, 1994.

SIMON, D. K.; TANNER, C. M.; BRUNDIN, P. Parkinson Disease Epidemiology, Pathology, Genetics, and Pathophysiology. **Clinics in Geriatric Medicine**, v. 36, n. 1, p. 1–12, 1 fev. 2020.

SMITH, M. P. et al. Calcitriol protection against dopamine loss induced by intracerebroventricular administration of 6-hydroxydopamine. **Neurochemical research**, v. 31, n. 4, p. 533–539, abr. 2006.

SOFRONIEW, M. V. Reactive astrocytes in neural repair and protection. **The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry**, v. 11, n. 5, p. 400–407, out. 2005.

SPRENGER, F.; POEWE, W. Management of motor and non-motor symptoms in Parkinson's disease. **CNS drugs**, v. 27, n. 4, p. 259–272, abr. 2013.

STAAL, R. G. W.; MOSHAROV, E. V; SULZER, D. Dopamine neurons release transmitter via a flickering fusion pore. **Nature Neuroscience 2004 7:4**, v. 7, n. 4, p. 341–346, 29 fev. 2004.

STEPHENSON, J. et al. Inflammation in CNS neurodegenerative diseases. **Immunology**, v. 154, n. 2, p. 204–219, 1 jun. 2018.

TAYSA BERVIAN BASSANI; VITAL, M. A. B. F.; RAUH, L. K. Neuroinflammation in the pathophysiology of Parkinson's disease and therapeutic evidence of anti-inflammatory drugs. **Arquivos de neuro-psiquiatria**, v. 73, n. 7, p. 616–623, 1 jan. 2015.
TEKIN, I. et al. Complex molecular regulation of tyrosine hydroxylase. . 22 nov. 2014, p. 1451–1481.

THACHER, T. D.; CLARKE, B. L. Vitamin D insufficiency. **The New England journal of medicine**, v. 364, n. 14, p. 1378–1380, 7 abr. 2011.

TUFEKCI, K. U. et al. Inflammation in Parkinson's Disease. **Advances in Protein Chemistry and Structural Biology**, v. 88, p. 69–132, 1 jan. 2012.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 39, n. 1, p. 44–84, 2007.

WANG, Y. et al. Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. **Journal of Cell Biology**, v. 217, n. 6, p. 1915–1928, 4 jun. 2018.

WAYNE A CASS et al. Calcitriol promotes augmented dopamine release in the lesioned striatum of 6-hydroxydopamine treated rats. **Neurochemical research**, v. 39, n. 8, p. 1467–1476, 2014.

WHITE, D. K. et al. Changes in Walking Activity and Endurance Following Rehabilitation for People With Parkinson Disease. **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation**, v. 90, n. 1, p. 43–50, 1 jan. 2009.

WIMALAWANSA, S. J. Vitamin D Deficiency: Effects on Oxidative Stress, Epigenetics, Gene Regulation, and Aging. **Biology 2019, Vol. 8, Page 30**, v. 8, n. 2, p. 30, 11 maio 2019.

WON, S. et al. Vitamin D prevents hypoxia/reoxygenation-induced blood-brain barrier disruption via vitamin D receptor-mediated NF- κ B signaling pathways. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. 1–17, 2015.

WYCKELSMA, V. L. et al. Preservation of skeletal muscle mitochondrial content in older adults: relationship between mitochondria, fibre type and high-intensity exercise training. **The Journal of physiology**, v. 595, n. 11, p. 3345–3359, 1 jun. 2017.

XIAN-SI, Z.; GENG, W.-S.; JIA, J.-J. Neurotoxin-Induced Animal Models of Parkinson Disease: Pathogenic Mechanism and Assessment. **ASN neuro**, v. 10, 1 maio 2018.

YAN SAI et al. Rotenone-induced PC12 cell toxicity is caused by oxidative stress resulting from altered dopamine metabolism. **Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA**, v. 22, n. 6, p. 1461–1468, set. 2008.

ZHU-XIA TAN et al. Calcitriol inhibits tumor necrosis factor alpha and macrophage inflammatory protein-2 during lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. **Steroids**, v. 112, p. 81–87, 1 ago. 2016.