



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
FACULDADE DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MORFOFUNCIONAIS**

**LUDMILA ARAÚJO RODRIGUES LIMA**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM VITAMINA D EM  
MODELO ANIMAL DE DOENÇA DE PARKINSON EM RATOS**

**FORTALEZA - CE  
2016**

**LUDMILA ARAÚJO RODRIGUES LIMA**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM VITAMINA D EM  
MODELO ANIMAL DE DOENÇA DE PARKINSON EM RATOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Morfofuncionais. Área de Concentração: Neurociência.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Glauce Socorro de Barros Viana.

**FORTALEZA - CE  
2016**

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

---

L698a Lima, Ludmila Araújo Rodrigues.  
AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM VITAMINA D EM MODELO ANIMAL DE DOENÇA DE PARKINSON EM RATOS / Ludmila Araújo Rodrigues Lima. – 2017.  
92 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais, Fortaleza, 2017.

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

Coorientação: Profa. Dra. Iana Bantim Felício Calou.

1. Vitamina D. 2. Doença de Parkinson. 3. Neuroproteção. 4. Antioxidante. I. Título.

CDD 611

---

**LUDMILA ARAÚJO RODRIGUES LIMA**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM VITAMINA D EM  
MODELO ANIMAL DE DOENÇA DE PARKINSON EM RATOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Morfofuncionais. Área de Concentração: Neurociência.

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Glauce Socorro Barros Viana (Orientadora)

Universidade Federal do Ceará - UFC

---

Profa. Dra. Iana Bantim Felício Calou (Coorientadora)

Universidade Federal do Piauí - UFPI

---

Prof. Dra. Antoniella Souza Gomes Duarte

Universidade Federal do Ceará - UFC

Dedico este trabalho a todos que amo.

## **AGRADECIMENTOS**

A meus pais, José e Maria, pelo amor, a certeza maior que tenho nesta vida é esse infinito AMOR! Muito obrigada por todo apoio, valores ensinados, carinho e por ter me proporcionado um lar tão maravilhoso quanto o nosso. Aos meus irmãos, Luara e André. Vocês são o sol que ilumina minha alma e a alegria que inunda meu coração. Amo vocês!

Aos Tios Henrylls, Daiane, Aila, Daniel, Jair, Lania e Culuda, aos meus avôs e primos Henry, Junior, Lívia, Bianca e Blenda que sempre torceram pelo meu sucesso.

A minha orientadora Dra. Glauce Socorro de Barros Viana. Dra Glauce é uma imensa honra poder ter tido o privilégio de absorver os seus ensinamentos. Não tenho como expressar o tamanho da gratidão que tenho. Muito obrigada pela confiança, orientação e ensinamentos.

A minha coorientadora Dra. Iana Bantim Felício Calou. Sou uma pessoa extremamente abençoada por ter tido o privilégio de poder ter conviado um pouco com um ser humano tão especial como a senhora. Muito obrigada pela por todos os ensinamentos, paciência e confiança.

Aos amigos de longas data, por todos os momentos, felizes e tristes, por entenderem minha ausência no dia-a-dia mas sentirem minha presença de coração. E aos novos amigos Junior e Pedro. Obrigada por entenderem minhas loucuras, por toda parceria e amizade.

A família de Picos, Artê, Ana Cibele e Jully, meu muito obrigada! Vocês são verdadeiros anjos que Deus me envio. Obrigada por se fazerem presentes mesmo longe.

Ao Laboratório de Neurofarmacologia em especial a Vilani, Carlos, Kelly, Arnaldo, Roberta, Karen e Germana.

A todos os professores que colaboraram para minha formação pois cada tem um pedaço dessa vitória, em especial Prof<sup>ª</sup> Danilla Michelle, Prof<sup>ª</sup> Camila Carvalho, Prof<sup>ª</sup> Silvânia e Prof<sup>ª</sup> Daniela, cujos ensinamentos jamais esquecerei.

A Faculdade de Medicina Estácio do Juazeiro do Norte, em especial a Janice, Viviane e Dárcio, por tão prontamente me acolher.

Ao CNPQ, CAPES e FUNCAP pelo incentivo a pesquisa e bolsa concedida.

E a todos que de alguma maneira colaboraram para a realização de mais essa etapa.

## RESUMO

A doença de Parkinson (DP) é uma desordem neurodegenerativa crônica cuja principal característica é a degeneração da via nigroestriatal, com consequente depleção de dopamina no estriado. Apresenta etiologia multifatorial que apesar de não totalmente esclarecida envolve claramente o estresse oxidativo. Evidências indicam que a deficiência de vitamina D (VIT D) afeta não apenas a progressão de doenças neurodegenerativas, mas apresenta-se como um co-fator de desenvolvimento. Em vista disso o objetivo do presente estudo foi investigar os efeitos da VIT D no modelo animal de DP induzida por lesão unilareal com 6-OHDA. Ratos Wistar (250-300g), foram divididos nos grupos: FO (sem lesão), VIT D (sem lesão), 6-OHDA (12µg/2µl), PRÉ-TTO (1µg/kg/dia, oral, 7 dias + 6-OHDA) e PÓS-TTO (6-OHDA+ 1µg/kg/dia, oral, 14 dias). Decorrido este tempo os animais foram submetidos aos testes de nado forçado, campo aberto e apomorfina sendo em seguida eutanasiados e dissecadas as áreas requeridas pelo estudo. Foram realizadas as determinações da concentração de dopamina (DA) e seus metabólitos (DOPAC e HVA), as alterações no estresse oxidativo (peroxidação lipídica e produção de nitrito), determinação do grau de degeneração neuronal (coloração de Cresil violeta) e análise imunohistoquímica para TH e DAT. Os dados foram analisados por ANOVA (Newman-Keuls) e considerados significativos valores de  $p < 0,05$ . Ambos protocolos de suplementação foram eficazes na restauração do comportamento motor, do comportamento rotacional induzido por apomorfina e no teste de nado forçado, onde ambas administrações reverteram o comportamento depressivo, assim como preveniram a depleção de DA, DOPAC e HVA. Corroborando estes achados, também se verificou a preservação da morfologia estriatal. Quanto ao estresse oxidativo, ambos protocolos promoveram redução a peroxidação lipídica e a produção de nitrito/nitrato. Em conjunto, os resultados do presente estudo indicam que a VIT D na DP desencadeia efeitos neuroprotetores significativos apresentando-se como uma potencial terapia adjuvante no tratamento da DP.

**Palavras-chaves:** Vitamina D. Doença de Parkinson. Neuroproteção. Antioxidante.



## ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is a chronic neurodegenerative disorder that has as main neuropathological characteristic the degeneration of the nigrostriatal pathway, with consequent depletion of dopamine in the striatum. This disease has a multifactorial etiology that despite unclear involves oxidative stress and mitochondrial dysfunction. Evidence indicates that vitamin D deficiency (VIT D) affects not only the progression of neurodegenerative diseases, but is presented as a co-factor for development. Given that the objective of this study was to investigate the neuroprotective effects of VIT D in the animal model of PD induced unilareal lesion with 6-OHDA. Wistar rats were divided into groups: FO (without lesion), VIT D (without lesion), 6-OHDA (12 µg / 2 µl), PRE-TTO (1 µg / kg / day, oral, 7 days + 6 -OHDA) and POST-TTO (6-OHDA + µg / kg / day, oral, 14 days). After this time the animals were subjected to behavioral tests and euthanized, and then dissected the areas required by the study and performed the neurochemical and immunohistochemical determinations. Data were analyzed by ANOVA (Newman-Keuls or Holm-Sidak's) and considered significant values of  $p < 0.05$ . Both supplementation protocols were effective in restoring motor behavior, apomorphine-induced rotational behavior and open field testing. Simulated results were verified in the forced swimming test, where both administrations reversed the depressive behavior, as well as preventing the depletion of dopamine (DA) and didroxyphenylacetic acid (DOPAC). Corroborating these findings, the preservation of the striatal morphology was also verified. Regarding oxidative stress, both protocols promoted reduction of malonildialdehyde (MDA) and nitrite / nitrate production. Taken together, the results of the present study indicate that VIT D supplementation in PD elicits significant neuroprotective effects thereby appearing as a potential adjuvant therapy in the treatment of PD.

**Key-words:** Vitamin D. Parkinson's disease. Neuroprotection. Antioxidant.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Diagrama simplificado dos circuitos neuronais lesionados durante DP-----	19
Figura 2 - Tomografia de emissão de pósitrons (PET) em indivíduos com DP-----	19
Figura 3 - Diagrama da hipótese da aceleração estocástica-----	21
Figura 4 - Disfunção mitocondrial na DP-----	24
Figura 5 - Biossíntese da vitamina D-----	25
Figura 6 - Alvos nucleares da VIT D no SNC-----	28
Figura 7 - Representação esquemática representativa das 2 coordenadas estereotáticas para injeção intraestriatal de 6-OHDA-----	38
Figura 8: -Representação da perda parcial de receptores de neurônios dopaminérgicos estriatais-----	39
Figura 9 - Efeito da suplementação com vitamina D no comportamento rotacional induzido por apomorfina (1mg/kg, s.c) em ratos com lesão estriatal induzida por 6-OHDA.-----	45
Figura 10 - Efeito da suplementação com vitamina D sobre o Número de Cruzamentos no teste do Campo Aberto em ratos com lesão estriatal induzida por 6-OHDA-----	47
Figura 11 - Efeito da suplementação com vitamina D sobre o Número de Rearing no teste do Campo Aberto em ratos com lesão estriatal induzida por 6-OHDA.-----	47
Figura 12 - Efeito da suplementação com vitamina D sobre o Número de Grooming no teste do Campo Aberto em ratos com lesão estriatal induzida por 6-OHDA-----	48
Figura 13 - Efeito da suplementação com vitamina D na avaliação do comportamento deprevisso em ratos com lesão estriatal induzida por 6-OHDA.-----	49

Figura 14- Efeito da suplementação com vitamina D nos níveis de dopamina (mg/área de tecido) em estriado direito de ratos com lesão estriatal induzida por 6-OHDA-----	52
Figura 15 - Efeito da suplementação com vitamina D nos níveis de DOPAC (mg/área de tecido) em estriado direito de ratos com lesão estriatal induzida por 6-OHDA.-----	53
Figura 16 – Efeito da suplementação com vitamina D nos níveis de HVA (mg/área de tecido) em estriado direito de ratos com lesão estriatal induzida por 6-OHDA-----	53
Figura 17- Efeito da suplementação com vitamina D sobre a peroxidação lipídica (TBARS) em córtex pré- frontal (CPF) de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA-----	55
Figura 18-Efeito da suplementação com vitamina D sobre a peroxidação lipídica (TBARS) em hipocampo (HP) de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA.-----	55
Figura 19 - Efeito da suplementação com vitamina D sobre a peroxidação lipídica (TBARS) em corpo estriado direito (CED) de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA-----	56
Figura 20- Efeito da suplementação com vitamina D sobre a peroxidação lipídica (TBARS) em corpo estriado esquerdo (CEE) de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA-----	56
Figura 21 - Efeito da suplementação com vitamina D sobre a dosagem de nitrito/nitrato em CPF de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA.-----	58
Figura 22 - Efeito da suplementação com vitamina D a dosagem de nitrito/nitrato em HP de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA-----	58
Figura 23 - Efeito da suplementação com vitamina D sobre a dosagem de nitrito/nitrato em corpo estriado direito (CED) de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA-----	59

Figura 24 - Efeito da suplementação com vitamina D sobre a dosagem de nitrito/nitrato em corpo estriado esquerdo (CEE) de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA.....	59
Figura 25 - Fotomicrografia do CED de ratos submetidos a lesão unilateral pela 6-OHDA.....	60
Figura 26 - Efeito da suplementação com vitamina D sobre integridade neuronal de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA.....	61
Figura 27 - Fotomicrografia representativas de neurônios imunorreativos para tirosina-hidroxilase no estriado direito (lesionado) de ratos submetidos a lesão estriatal com 6-OHDA.....	63
Figura 28 - Efeito da suplementação com vitamina D sobre a quantificação da imunomarcção para Tirosina Hidroxilase (TH) no estriado direito (CED) de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA.....	64
Figura 29 - Fotomicrografia representativas de neurônios imunorreativos para DAT no estriado direito (lesionado) de ratos submetidos a lesão estriatal com 6-OHDA.....	65
Figura 30 - Efeito da suplementação com vitamina D sobre a quantificação da imunomarcção para DAT no estriado direito (CED) de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA.....	66

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Determinação das concentrações de Dopamina (DA) e DOPAC no corpo estriado direito e esquerdo por HPLC-----	51
Tabela 2 - Efeito da suplementação com vitamina D sobre a peroxidação lipídica (TBARS) em tecidos cerebrais de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA-----	54
Tabela 3 - Efeito da suplementação com vitamina D sobre a dosagem de nitrito/nitrato (NO <sub>2</sub> /NO <sub>3</sub> ) em tecidos cerebrais de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA-----	57

## LISTA DE ESQUEMA

Esquema 1 - Protocolo de tratamento experimental-----	38
Esquema 2 - Desenho experimental-----	39

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

6-OHDA	6-hidroxidopamina
ANOVA	Análise de Variância
ATP	Adenosina 5 'trifosfato
CE	Corpo estriado
CED	Corpo Estriado Direito
CEE	Corpo Estriado Esquerdo
CEPA	Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal do Ceará
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CPF	Córtex Pré-Frontal
DA	Dopamina
DAT	Transportadores de dopamina
DOPAC	Ácido didroxifenilacético
DP	Doença de Parkinson
EO	Estresse oxidativo
EPM	Erro padrão da média
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FO	Falso Operado
GDNF	Fator neurotrófico derivado da glia
HP	Hipocampo
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
HVA	Ácido homovanílico
i.m	Intramuscular
i.p	Intraperitonal
KCl	Cloreto de potássio
MDA	Malonildialdeído
NaNO <sub>2</sub>	Nitrito de Sódio

NO	Óxido nítrico
NO <sub>2</sub>	Nitrito
NO <sub>3</sub>	Nitrato
PET	Tomografia de emissão de pósitrons
PKC-δ	Proteína quinase C delta
PÓS-TTO	Pós-tratamento
PRÉ-TTO	Pré-tratamento
RL	Radicais livres
SNpc	Substância <i>nigra pars compacta</i>
SOD	Superóxido dismutase
TBARS	Substâncias tiobarbitúricas ácido-reativas
TH	Tirosina hidroxilase
UI	Unidades internacionais
UV	Radiação ultravioleta
VIT D	Vitamina D
VMAT	Transportadores vesiculares de monoaminas



## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO18
  - 1.1. DOENÇA DE PARKINSON18
    - 1.1.1. EPIDEMIOLOGIA18
    - 1.1.2. FISIOPATOLOGIA18
    - 1.1.3. ETIOLOGIA20
      - 1.1.3.1. ESTRESSE OXIDATIVO E DP22
      - 1.1.3.2. DISFUNÇÃO MITOCONDRIAL E DPERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
  - 1.2. VITAMINA D (VIT D)25
    - 1.2.1. BIOSÍNTESE E METABOLISMO DA VIT D25
    - 1.2.2. VITAMINA D E DP28
  - 1.3. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA32
2. OBJETIVOS34
  - 2.1. OBJETIVO GERAL34
  - 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS34
3. MATERIAIS E MÉTODOS35
  - 3.1. ANIMAIS35
  - 3.2. DROGAS E REAGENTES35
  - 3.3. PROTOCOLO EXPERIMENTAL35
  - 3.4. CIRURGIA ESTEREOTÁXICA (UNGERSTEDT, 1968)35
  - 3.5.1. TESTES COMPORTAMENTAIS37
    - 3.5.1.1. AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO ROTACIONAL INDUZIDO POR APOMORFINA (UNGERSTEDT, 1971)37
    - 3.5.1.2. AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO MOTOR VIA TESTE DO CAMPO ABERTO (OPEN FIELD) (BROADHURST, 1957)38
    - 3.5.1.3. AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DEPRESSIVO VIA TESTE DO NADO FORÇADO (FORCED SWIM TEST) (PORSOLT ET AL., 1978)39
  - 3.5.2. DISSECAÇÃO DA ÁREA CEREBRAL (CORPO ESTRIADO, CÓRTEX E HIPOCAMPO)39
  - 3.5.3. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE DA E DOPAC COM HPLC39
  - 3.5.4. AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO MALONILDIALDEÍDO40
    - 3.5.4.1. DETERMINAÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA (DRAPER; HADELY,1990)40
    - 3.5.4.2. DETERMINAÇÃO DE NITRITO (GREEN ET AL., 1982)40
  - 3.5.5. ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA41
    - 3.5.5.1. COLORAÇÃO VIOLETA CRESIL (BITTENCOURT, 2007)42
  - 3.5.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA43
4. RESULTADOS44
  - 4.1. ESTUDOS COMPORTAMENTAIS44
    - 4.1.1. EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM VIT D NO COMPORTAMENTO ROTACIONAL POR APOMORFINA DE RATOS PARKINSONIANOS44

- 4.1.2. EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM VD SOBRE A ATIVIDADE LOCOMOTORA (TESTE DO CAMPO ABERTO) EM RATOS PARKINSONIANOS45
- 4.1.3. EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM VITAMINA D SOBRE O COMPORTAMENTO DEPRESSIVO VIA TESTE DO NADO FORÇADO EM RATOS COM LESÃO UNILATERAL POR 6-OHDA47
- 4.2. EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM VITAMINA D SOBRE A DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE DOPAMINA SEU METABÓLITO DOPAC.48
- 4.3. EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM VITAMINA D SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO EM TECIDOS CEREBRAIS DE RATOS PARKINSONIANOS52
  - 4.3.1. EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM VITAMINA D SOBRE A PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA (TBARS) EM TECIDOS CEREBRAIS DE RATOS PARKINSONIANOS52
  - 4.3.2. EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM VITAMINA D SOBRE A DOSAGEM DE NITRITO/NITRATO ( $\text{NO}_2/\text{NO}_3$ ) EM TECIDOS CEREBRAIS DE RATOS PARKINSONIANOS55
- 4.4. EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM VITAMINA D SOBRE A INTEGRIDADE NEURONAL DO CORPO ESTRIADO DIREITO E CORPO ESTRIADO ESQUERDO58
- 5. DISCUSSÃO65
- 6. CONCLUSÃO70
- 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS71
- REFERÊNCIAS72
- ANEXO87

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. DOENÇA DE PARKINSON

#### 1.1.1. Epidemiologia

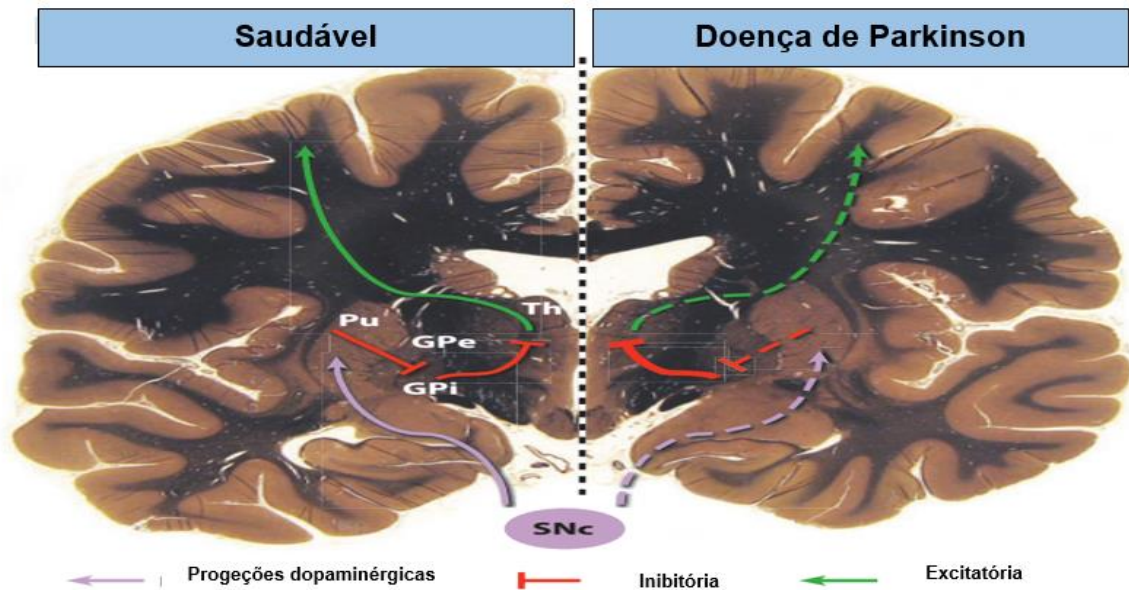
De acordo com a Associação Internacional de Gerontologia e Geriatria, a população mundial, em 2008, com mais de 65 anos era em torno de 500 milhões de pessoas. Estima-se que em 2040 esse valor chegará a 1,3 bilhão de idosos. Em vista de tal crescimento, são necessárias medidas que proporcionem a melhoria na qualidade de vida dessa parcela da população (TOLSON et al., 2011).

Considerada o segundo distúrbio neurodegenerativo crônico mais comum a Doença de Parkinson (DP) afeta aproximadamente 6 milhões de pessoas ao redor do mundo, acometendo cerca de 1 a 2% da população acima de 65 anos, sendo esta patologia mais prevalente em homens (BOVÉ; PERIER, 2012; De LAU; BRETELER, 2006; RIEDEL et al., 2016; SUBRAMANIAN; CHESSELET, 2013).

#### 1.1.2. Fisiopatologia

A DP é caracterizada primordialmente pela degeneração progressiva dos neurônios dopaminérgicos na substância *nigra pars compacta* (SNpc), em especial os neurônios presentes na porção ventrolateral com projeções para o putâmen, resultando em uma severa depleção de dopamina no estriado (**figura 1**). A dopamina é um importante neurotransmissor do sistema nervoso que apresenta uma miríade de funções fisiológicas, incluindo modulação dos movimentos, emoção, cognição, mecanismos de reforço/recompensa, entre outras. Devido o envolvimento da dopamina na articulação dos movimentos voluntários a deterioração da via nigroestriatal como consequente aumento da ação inibitória desta exercida via globo pálido ao tálamo e indiretamente ao córtex tem como consequência às manifestações motoras características da DP (KALIA; LANG, 2015; RODRIGUEZ-OROZ et al., 2009; OERTEL; SCHULZ, 2016).

Figura 1: Diagrama simplificado dos circuitos neuronais lesionados durante DP.

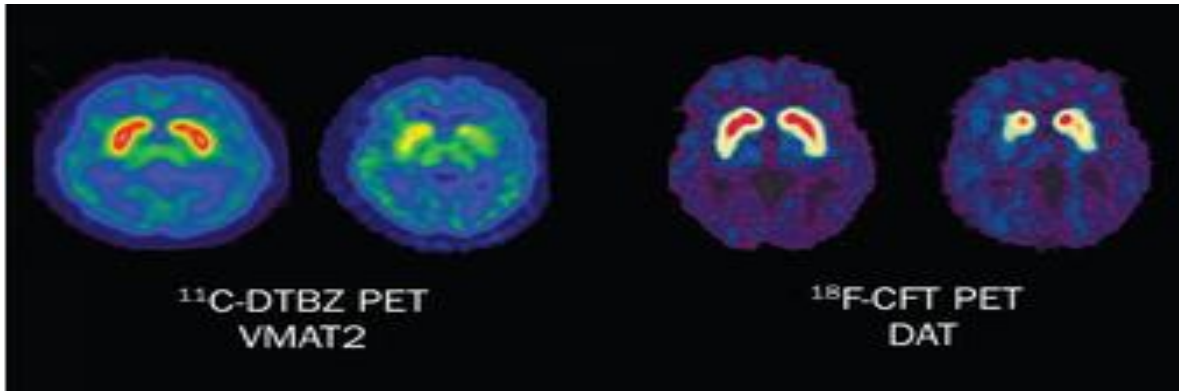


Fonte: Shulman e colaboradores (2011). A degeneração da via nigroestriatal e subsequente disfunção dos gânglios da base, conjunto de núcleos profundos que participam na iniciação e execução de movimentos, desencadeia as manifestações motoras típicas da DP. Legenda: GPe- globo palído externo; GPi- globo palído interno; Pu- putâmen; Th- tálamo.

Estima-se que o aparecimento da sintomatologia motora clássica da DP (tremor de repouso, bradicinesia, rigidez e instabilidade postural) surjam quando há uma diminuição de cerca de 30% dos neurônios dopaminérgicos da SNpc associado com déficit de 70-80% da concentração de dopamina estriatal. A morosidade das manifestações motoras dar-se-á pelos mecanismos compensatórios pré e pós-sinápticos que impedem que os sintomas se manifestem até que o sistema esteja inábil para compensa-lás (LEVY et al., 2003; NANDHAGOPAL et al., 2011).

Na DP também ocorre uma acentuada redução nos níveis de tirosina hidroxilase (TH), enzima limitante da velocidade da síntese de dopamina, e na atividade dos transportadores de dopamina (DAT) e dos transpodatores vesiculares de monoaminas (VMAT) (**figura 2**). Outro aspecto relevante é o aumento da concentração de receptores de glutamato que desencadeia, via excitotoxicidade por  $Ca^{2+}$ , a ativação do processo de morte celular (KANNURPATTI; JOSHI; JOSHI, 2000; KASTNER et al., 1993; POLITIS, 2014).

**Figura 2: Tomografia de emissão de pósitrons (PET) em pacientes com DP.**



Fonte: Politis (2014). Diminuição na atividade dos transportadores VMAT e DAT, obtida por PET, em pacientes com DP.

Embora a degeneração da via nigroestriatal seja a característica primária da DP, áreas extranigrais com *locus coeruleus*, núcleo da rafe, núcleo motor dorsal do vago e nervos glossofaríngeos, além de diversos subnúcleos do tálamo e amígdala e, em estágios mais avançados, o neocórtex também sofrem alterações morfofuncionais. Em vista disso as vias glutamatérgica, colinérgica, GABAérgica, noraadrenérgica e adrenérgica também são afetadas durante a progressão da patologia (BRAAK; BRAAK, 2000; DEN HARTOG; JAGER; BETHLEM, 1960; WAKABAYASHI; GÜZEY et al., 2012).

Outro marcador patológico da DP são os Corpos de Lewis, que são inclusões proteicas intraneuronais, de agregados de ubiquitina, neurofilamentos, elementos proteassomais e, principalmente,  $\alpha$ -sinucleína. O enovelamento incorreto da  $\alpha$ -sinucleína torna-a insolúvel, levando a sua agregação intracelular dentro dos Corpos de Lewis. Este marcador não se restringe somente ao cérebro, podendo ser encontrado também na medula espinhal e no sistema nervoso periférico (ABELIOVICH; GITLER, 2016; GOEDERT et al., 2012).

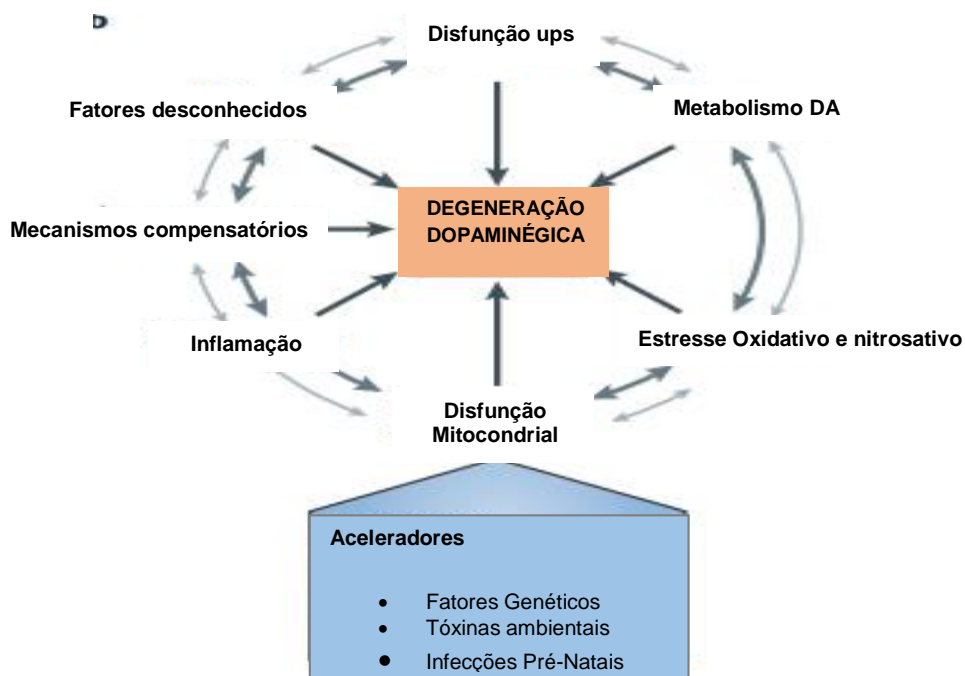
### 1.1.3. Etiologia

Apenas 10% dos casos de DP apresentam origem genética, sendo a maioria decorrente da forma esporádica. Apesar do substancial avanço científico, os

mecanismos pelo qual a degeneração seletiva dos neurônios dopaminérgicos ocorre ainda permanece não totalmente elucidados, todavia acredita-se que estes sejam desencadeados pela interconexão de fatores ambientais, genéticos e imunológicos (GABALLAH et al., 2016; LESAGE; BRICEAND, 2009; ROSNER; GILADI, 2008).

Na DP, assim como outras doenças neurodegenerativas que apresentam a idade como principal fator de risco, é plausível que a confluência da vulnerabilidade genômica com diversos fatores ambientais podem ser os responsáveis pela etiopatogênese da DP. Hipóteses como a da aceleração estocástica (**figura 3**), onde múltiplas alterações desencadeadas pelo processo do envelhecimento, que produzem um estado de vulnerabilidade pré-parkinsoniana, se mesclam com fatores ambientais (insultos ambientais, infecções pré-natais, entre outros) e genéticos que resultam no fenótipo da DP, são meios atuais, explicando o início do processo patológico da DP (COLLIER; KANAAN; JEFFREY, 2011; MILLER; O'CALLAGHAN, 2015).

**Figura 3: Diagrama da hipótese da aceleração estocástica**



Fonte: Collier, Kanaan e Kordower (2011).

Fatores pancelulares, que envolvem diversas vias celulares e moleculares, como disfunção mitocondrial, estresse oxidativo, alterações no retículo endoplasmático, neuroinflamação, excitotoxicidade glutamatérgica e distúrbios na

homeostase de cálcio são cruciais na patogênese da DP (CAMPUZANO et al., 2009; HETZ; MOLLEREAU, 2014; MORALES et al., 2013; RODRÍGUEZ-NOGALES et al., 2016).

Todavia, as alterações morfofuncionais não se restringem somente aos neurônios *per se* sendo também são evidenciadas nas células da glia. Por exemplo, os astrócitos, células responsáveis por dar suporte e prevenir danos neuronais por meio da libertação de agentes neuroprotetores (glutathiona, fator neurotrófico derivado da glia, entre outros) e da remoção de agentes tóxicos no meio extracelular ( $\alpha$ -sinucleína), alteram sua morfologia e aumentam a expressão de proteína glial fibrilar ácida (GFAP). As células micróglia que são sensíveis a mudanças microambientais tornam-se ativadas, em resposta ao processo neuroinflamatório, e mudam sua conformação de morfologia ramificada para ameboide. Salienta-se ainda que além do exposto acima a ativação microglial e dos astrócitos é responsável pelo aumento da expressão de citocinas inflamatórias (IL -1 $\beta$ , IL - 6 e TNF- $\alpha$ ), ciclooxigenases (COX-1 e 2) e óxido nítrico sintase indutiva (iNOS). A cronicidade destas respostas estabelece um *feedback* que mantém a neuroinflamação e aumenta a vulnerabilidade dos neurônios dopaminérgicos (CHINTA et al., 2013; HALLIDAY STEVENS, 2011; RODRIGUEZ et al., 2014; SONG et al., 2009).

#### **1.1.3.1. ESTRESSE OXIDATIVO E DP**

Os radicais livres (RL) são produzidos naturalmente como metabólitos secundários do metabolismo celular. Os RLs representam espécies químicas que contêm elétrons não-pareados em sua última camada eletrônica. Essa conformação os tornam altamente instáveis, com meia-vida curtíssima e quimicamente muito reativos. Tais compostos promovem ou resultam de reações de oxido-redução e se multiplicam rapidamente em cascata pelo sequestro de elétrons de outras moléculas, que também se transformam em RLs. As classes mais importantes de espécies de radicais gerados em sistemas vivos são espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (EROs e ERNs respectivamente) (ANSARI, 1997; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990).

Quando os níveis de EROs e ERNs ultrapassam a capacidade antioxidante de uma célula, ocorre disfunção metabólica e da homeostase. Esta condição de estresse oxidativo causa danos irreversíveis às células, tais como perda da integridade do DNA, disfunção mitocondrial, peroxidação lipídica e alterações estruturais de proteínas, podendo levar à morte celular. Entretanto, vários sistemas antioxidantes, incluindo a catalase, superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase e as vitaminas C, E e K podem reduzir o estresse oxidativo (CHONG et al., 2012; MULEI et al., 2012; YANG et al., 2011).

Aproximadamente 20% do oxigênio consumido é destinado ao cérebro. Esse mesmo órgão possui baixos índices de enzimas antioxidantes e elevados níveis de ferro e cálcio. Essas condições desencadeiam, por conseguinte uma maior instabilidade no equilíbrio redox, em especial os ácidos graxos poli-insaturados que são particularmente propensos à peroxidação lipídica. (DIAS; JUNN; MOURADIAN, 2013; JENNER; OLANOW, 2006; JONES; GO, 2010).

Os neurônios dopaminérgicos da SNpc apresentam maior susceptibilidade a produção de EROs, isto ocorre uma vez que estes possuem: axônios particularmente longos, não mielinizados, com grande número de sinapses e que apresentam elevada atividade metabólica; atividade de marcapasso autônomo envolvendo oscilações no cálcio citosólico e extrusão de cálcio à custa de energia; pequenas quantidades de antioxidantes endógenos; alta concentração de ferro; e formação potencializada de EROs a partir da DA citosólica e seus metabólitos (MOSHAROV et al., 2009; SCHAPIRA et al. 1989; SURMEIER et al., 2017; SURMEIER et al., 2011).

O estresse oxidativo (EO) representa um mecanismo primordial na patogênese da DP, sendo este capaz de perturbar a estabilidade dos ácidos nucleicos, a homeostase de proteínas, a funcionalidade dos canais iônicos e das auto-defesas celulares. Isto ocorre, pois, o aumento substancial de EROs desencadeia a oxidação direta no RNA/DNA, amplifica as mutações no DNA mitocondrial (mtDNA), desencadeia a dissociação da proteassoma do sistema ubiquitina-proteassoma (UPS), precipita a agregação de  $\alpha$ -sinucleína e parkin, reduz a liberação de dopamina



via ativação dos canais de potássio dependente de ATP (KATP) e da inativação dos receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) e altera a homeostasia das proteínas DJ-1, PINK1 e Akt. O processo de disfunção mitocondrial, em especial decorrente de alterações no complexo I da cadeia transportadora de elétrons, é extremamente relevante na intensificação do EO (CACABELOS, 2017; CEN et al., 2016; CHEN et al., 2016. DIAS; JUNN; MOURADIAN, 2013; KUPERSHMIDT et al., 2010; MORAIS et al., 2014; SCHAPIRA et al. 1989; ZHAO et al., 2017).

A disfunção mitocondrial instaura, principalmente, via 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 (BOSE; BEAL, 2016; GABALLAH et al., 2016; HADDAD; NAKAMURA, 2015; PERIER; VILA, 2012).

#### **1.1.4. Modelos experimentais para a DP**

Os modelos experimentais para DP vêm assistido substancialmente a comunidade científica na compreensão da patogênese, na exploração de mecanismos neuroprotetores, bem como no desenvolvimento de alvos com potencial terapêutico. Embora não exista um modelo, *in vitro* ou *in vivo*, que expresse todas as características fisiopatológicas e sintomatológicas características da DP os vários modelos animais, em especial os baseados na administração das neurotoxinas 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA) e 1-metil -1,2,3,6-tetra-hidropiridina (MPTP) e dos pesticidas rotenona e paraquat, são ferramentas relevantes em pesquisas que almejam a indução de neurodegeneração seletiva do sistema nigroestriatal. Um mecanismo partilhado entre todos os modelos induzidos por essas toxinas é a sua capacidade promover o desequilíbrio redox e desencadear o estresse oxidativo promovendo assim a morte nos neurônios dopaminérgicos (BOVÉ; PERIER, 2012; DRECHSEL; PATEL, 2008).

A neurotoxina 6-OHDA é uma substância análoga da dopamina e um dos agentes mais utilizados em protocolos de degeneração das vias catecolaminérgicas, em especial a via nigroestriatal. Isto ocorre, em especial, devido à sua baixa

complexidade e custo, alta reprodutibilidade, baixo risco de toxicidade relacionada à sua manipulação, a capacidade de indução de uma degeneração estável e permanente, além de não apresentar uma dependência em relação à linhagem, sexo ou idade do animal (ALVAREZ-FISCHER et al., 2008; BLUM et al., 2001).

Devido suas características químicas a 6-OHDA não atravessa a barreira hematoencefálica devendo, deste modo, a neurotoxina ser injetada no tecido cerebral sendo aplicada diretamente no corpo estriado, SNpc ou no feixe prosencefálico medial (FPM). Vale ressaltar que cada tipo de administração provoca um perfil diferente de morte celular para promover o parkinsonismo. A aplicação na SNpc ou FPM desencadeia neurodegeneração 24 horas após a aplicação e os neurônios não exibem morfologia apoptótica, ao passo que a administração intraestriatal desencadeia perfil de morte neuronal retrógrada, que pode levar de uma a três semanas para estar completa, além de apresentar morfologia apoptótica (SAUER; OERTEL, 1994; BOVE; PERIER, 2011).

Devido sua similaridade estrutural com a dopamina a 6-OHDA tem alta afinidade pelos transportadores de dopamina. Estes carregam a neurotoxina para o interior dos neurônios dopaminérgicos aonde a 6-OHDA é rapidamente oxidada em peróxido de hidrogênio e quinonas. Os efeitos neurotóxicos, decorrente do acúmulo da toxina, ocorrem via desequilíbrio redox com consequente aumento excessivo de radicais livres, disfunção mitocondrial, liberação de citocromo c, ativação de caspase-9 e caspase-3, ativação proteolítica da proteína quinase C delta (PKC $\delta$ ) e fragmentação do DNA (LATCHOUMYCANDANE et al., 2011).

## **1.2. Vitamina D (VIT D)**

### **1.2.1. Biossíntese e metabolismo da VIT D**

Apesar de descoberta durante a revolução industrial, no final de 1800, a vitamina D somente demonstrou elo com a saúde humana quando em 1918, Sir Edward Mellanby demonstrou que a sua deficiência estava relacionada com o desenvolvimento do raquitismo. Já em 1922, o pesquisador Elmer McCollum isolou pela primeira vez a 1,25-dihidroxitamina-D<sub>3</sub> (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>), metabólito ativo, e

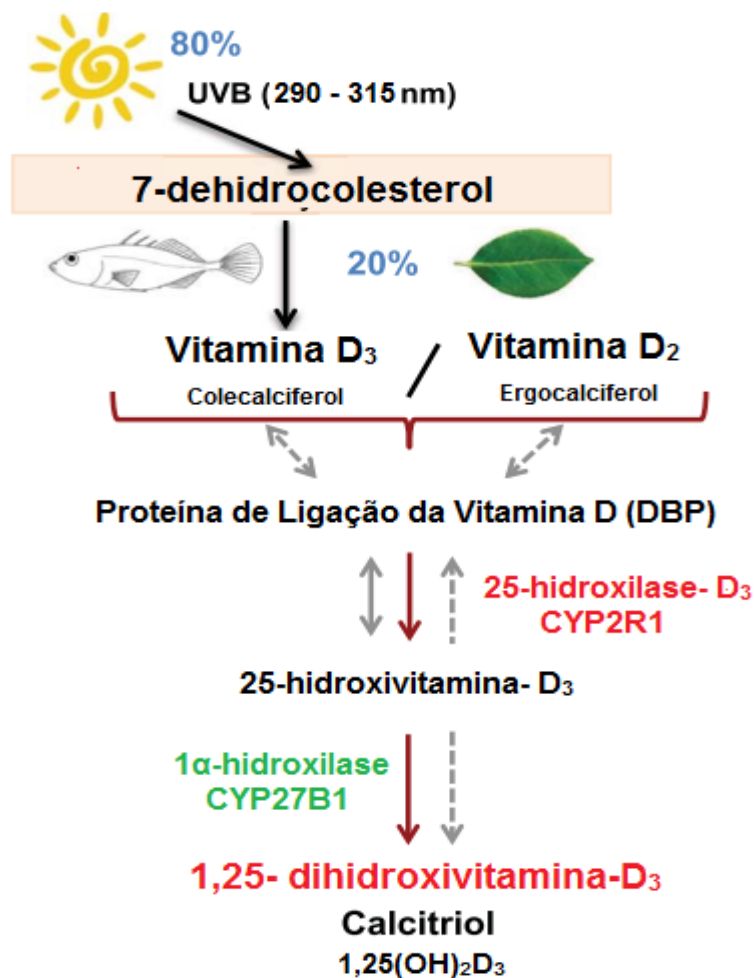
denominou vitamina D, uma vez que a sua descoberta seguiu a das vitaminas A, B e C. Somente em 1924 pesquisadores de três diferentes universidades descobriram simultaneamente a importância dos raios ultravioletas (UVR) da luz solar para a síntese de VIT D (HESS, 1924; HUME; SMITH, 1924; STEENBOCK, 1924).

A VIT D é um pró - hormônio esteróide que tem como precursores da 1,25-dihidroxitamina-  $D_3$  (calcitriol), o ergocalciferol (vitamina  $D_2$ ) e o colecalciferol (vitamina  $D_3$ ), sendo a pele e a dieta as duas principais fontes de sua obtenção em mamíferos. A pele humana, tanto a derme como a epiderme, sintetiza calcitriol a partir do 7-deidrocolesterol quando expostos a luz ultravioleta (290 nm e 315 nm, UVB). Destarte uma pessoa saudável, de pele clara, que exponha o rosto e antebraços ao sol do meio-dia durante 20-30 minutos, pode gerar até 2000 UI (unidades internacionais) de VIT D. Entretanto, caso esta vitamina seja adquirida por via oral, ela é absorvida no intestino delgado, na dependência da presença de gordura na dieta, incorporada a quilomicrons. Em ambos processos a VIT D é transportada para o fígado pela proteína de ligação da vitamina D (DBP). No fígado, a VIT D é convertida em 25-hidroxitamina- $D_3$  pela hidroxilação no carbono 25 mediada pela 25-hidroxilase-  $D_3$ , CYP2R1. Em seguida a 25-hidroxitamina-  $D_3$  é transportada para o rim pela DBP, filtrada pelo glomérulo e convertida em 1,25- dihidroxivitamina- $D_3$  nas mitocôndrias dos túbulos contorcidos proximais sendo catalisada pela 1  $\alpha$ -hidroxilase, CYP27B1 (**figura 5**). Ao final a VIT D é excretada predominantemente pela bile. As ações biológicas da 1,25(OH) $_2D_3$  são mediadas pelo receptor de vitamina D (VDR), um fator de transcrição que pertence à família de receptores hormonais nucleares 1, apresentando este uma relação direta com a regulação transcricional de diversos genes (CHUN et al., 2014; HOLICK, 2007; MARGOLIS; CHRISTAKOS, 2010; PEARCE; CHEETHAM, 2011).

O VDR é expresso em quase todas as células humanas e parece participar, de maneira direta ou indireta, de regulação de cerca de 3% do genoma humano. Os receptores VDR pertencem à família de receptores esteróides, que inclui receptores para o ácido retinóico, hormônio da tireóide, hormônios sexuais e esteróides adrenais. Como a maioria dos hormônios esteróides, a vitamina D também é capaz de ações

rápidas e não-genômicas. Essas respostas também sejam mediadas pelo receptor VDR mas também estão relacionados a outro receptor, a proteína de ligação a esteróides de resposta rápida, associada à membrana célula (MARRS). A sinalização intracelular para esse tipo de resposta biológica decorrente da interferência nos canais voltagem-dependente de transporte de íons transmembrana ( $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Cl}^-$ ), do controle do influxo e da quantidade de  $\text{Ca}^{+2}$  no citossol e da ativação de segundos mensageiros, como o AMP cíclico, proteína quinase A e fosfolipase C (BOUILLON et al., 2008; DOROUDI; SCHWARTZ; BOYAN, 2015; MENEGAZ et al., 2011; NORMAN; MINIREVIEW, 2006).

Figura 5: Biossíntese e metabolismo da VIT D



Fonte: Landel et al. 2016 (Adaptado).

### 1.2.2. Vitamina D e Ações Biológicas

A deficiência de VIT D é reconhecida como uma epidemia mundial, acometendo cerca de 1 bilhão de pessoas, estando fortemente vinculada a localização geográfica, idade e sexo. No Brasil, pesquisas demonstram que baixos níveis de VIT D se manifestam em aproximadamente 60% dos adolescentes, de 40% e 58% entre adultos e entre 42% e 83% em idosos (BANDEIRA et al., 2010; MAEDA, 2010; PETERS et al., 2011; PREMAOR et al., 2008; SILVA et al., 2008).

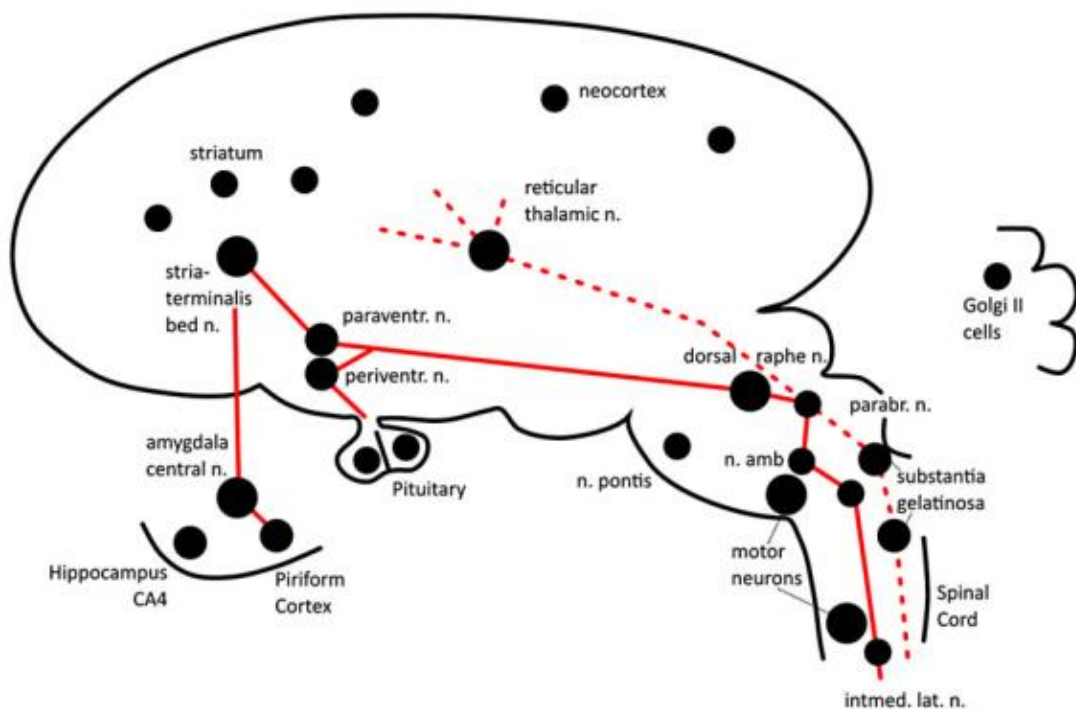
Níveis séricos de 25-hidroxivitamina D superiores a 30 ng/dL são considerados adequados, enquanto que concentrações entre 30 ng/dL a 15 ng/dL caracterizam insuficiência e menos de 15 ng/dL deficiência. Ross e colaboradores (2011) recomendam a suplementação de 600UI por dia para indivíduos entre 19 e 70 anos e de 800 UI/dia a idosos com mais de 70 anos (HOLICK, 2007).

Ao longo das últimas décadas, tornou-se cada vez mais evidente que os efeitos biológicos da VIT D não se limitam à manutenção da homeostase de cálcio e fosfato. A  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  apresenta atividade pleiotrópica estando relacionada com a regulação da expressão de diversos genes, bem como 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. Por conseguinte, 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., 2016; GATTO et al., 2015; JOSHI et al. 2011).

Por apresentar natureza altamente pleiotrópica a VIT D desempenha papel substancial tanto no desenvolvimento como na homeostasia do sistema nervoso. Por conseguinte, existem indícios de que a hipovitaminose D não é apenas um efeito da progressão de doenças neurodegenerativas, mas sim um co-fator agravante. Estudos demonstraram que a vitamina D apresenta íntima relação com a expressão dos genes correlatados a fatores neurotróficos (NT3, NT4 e NGF), desencadeia diversas ações sobre a modulação da neurotransmissão dopaminérgica, na homeostase do cálcio, nos mecanismos de resposta ao estresse oxidativo, na resposta inflamatória, na

regulação da apoptose e na neuroplasticidade. Estas ações ocorrem, em especial, devido os receptores VDR estarem altamente expressos nos neurônios e nas células da glia, estando distribuídos em diversas regiões do sistema nervoso periférico (**figura 6**) e central, onde se concentram em maior quantidade no hipotálamo e na substância negra ( ANNWEILER et al., 2014; BROWN et al., 2003; DURK et al., 2012; DURSUN et al., 2013; EYLES et al., 2005; EYLES et al., 2013; FERON et al., 2005; GEZEN-AK et al., 2011; HOLICK, 2015; MILLET et al., 2014; NEVEU et al., 1994).

**Figura 6: Alvos nucleares da VIT D no SNC.**



Fonte: Stumpf e Privette, 1991.

### 1.2.3. Vitamina D e DP

A ocorrência de hipovitaminose D é mais significativa em pessoas idosas. Isto se deve, em especial devido à redução na ingestão de vitamina D, na diminuição da síntese cutânea e aumento da adiposidade. Nas últimas décadas veio a luz da ciência que a hipovitaminose D crônica desempenha um papel relevante na

patogênese da DP. De acordo com o mecanismo biológico sugerido, o estado continuamente inadequado de VIT D pode catalisar a neurodegeneração dopaminérgica vinculando-se deste modo diretamente com a DP (KUPFERSCHMIDT, 2012; LV et al., 2014; NEWMARK; NEWMARK, 2007; RIMMELZWAAN et al., 2016).

Knent e colaboradores (2010) verificaram por meio da avaliação dos níveis séricos de 25(OH)D de mais de 7000 amostras coletadas em diversas áreas da Finlândia, país com baixa exposição solar, uma correlação inversa entre os níveis séricos de vitamina D e a incidência de DP, onde indivíduos com 50 nmol /L ou mais de vitamina D sérica possuem 65% menos probabilidade de desenvolver PD do que aqueles com 25 nmol /L ou menos. Ratificando essa relação Wang e colaboradores (2015) verificaram que indivíduos com DP são 2,64 vezes mais susceptíveis a deficiência de 25(OH)D e 2,13 vezes a insuficiência. Além destes, diversos outros estudos epidemiológicos corroboraram, alguns ainda de forma mais direta, o elo entre a hipovitaminose D e a DP (ABOU- RAYA et al., 2009; DING et al., 2015; EVATT et al., 2008; EVATT et al., 2011; KENBORG et al., 2011; KNENT et al., 2010; KRAVIETZ et al., 2017; LV et al., 2014; SATO et al., 2001; RIMMELZWAAN et al., 2016; VAN DEN BOS et al., 2013; WANG et al., 2015; WANG et al., 2016; ZHU et al., 2014).

Além das evidências epidemiológicas a plausibilidade biológica é corroborada em múltiplas pesquisas, estudos *in vitro* e *in vivo*. Um dos primeiros estudos pré-clínicos sobre o tema observou que a administração da 1-25, dihidroxivitamina D3 aumentava a expressão do fator neurotrófico derivado da glia (GDNF), sugerindo o seu possível benefício no tratamento de doenças neurodegenerativas, de forma mais específica, na doença de Parkinson. Sanchez e colaboradores (2009) demonstram ainda que a administração da vitamina restaurava os níveis de Tirosina Hidroxilase no estriado e na substância negra de ratos submetidos a lesão nigroestriatal por 6-OHDA. Outros mecanismos de ação da neuroproteção mediada pela vitamina D são inibição do estresse oxidativo, da ativação microglial e na neurotoxicidade mediada pelo glutamato (CASS et al., 2014; CASS et al., 2012; KIM et al., 2006; NAVEILHAN et al., 1996; ORME et al., 2013; SMITH et al., 2006).

Devido sua natureza pleiotrópica a VIT D tem capacidade de regular a expressão de centenas de genes através de mecanismos genéticos e ambientais tendo, deste modo, as alterações epigenéticas relacionadas a hipovitaminose D papel significativo com na relação da VIT D com a doença de Parkinson. Atualmente polimorfismos nos genes VDR tem sido alvo de múltiplas pesquisas que visam relacionar tais alterações com a DP. No entanto, os dados obtidos por tais pesquisas se apresentam de modo controverso, não havendo congruência nos resultados (KANG et al., 2016; PETERSON et al., 2014; WANG et al., 2015).

Como o estresse oxidativo demonstra ser um dos principais mecanismos envolvidos no desenvolvimento da DP, a ingestão da suplementação com vitamina D recurso terapêutico válido e promissor na doença de Parkinson.



### 1.3. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

A DP é reconhecida como uma das principais doenças incapacitantes em idosos, apresentando prevalência no Brasil de aproximadamente 3,3%. Vale ressaltar que evidências epidemiológicas indicam um claro crescimento na incidência de DP, ao longo das décadas, devido à alteração do perfil demográfico mundial. A DP é uma doença complexa e multifatorial causada pela susceptibilidade genética, fatores ambientais e imunológicos, sendo esta caracterizada por sintomas motores e não motores. Apesar das inúmeras descobertas sobre as bases moleculares da DP o entendimento sobre a patogênese e fisiopatologia ainda apresenta conexões a serem realizadas e completamente compreendidas (CHOONG; MOCHIZUKI, 2016; GOBBI et al., 2014; KOWAL et al., 2013; SHULMAN; JAGER; FEANY, 2011).

Apesar dos avanços científicos ainda não existe qualquer terapia farmacológica disponível capaz de reverter ou até mesmo interromper a neurodegeneração presente na DP, baseando-se essencialmente no alívio sintomático da doença, principalmente, por meio da reposição de dopamina, sendo a administração de levodopa, medicação de uso padrão. Contudo, a utilização prolongada deste fármaco leva a discinesia induzida por drogas que compromete fortemente a qualidade de vida de pacientes com DP, tornando, desta forma, emergencial a busca por terapia neuroprotetora mais eficaz (POEWE; ANTONINI, 2015).

Uma vasta gama de estudos epidemiológicos e pré-clínicos evidenciam a ação neuroprotetora da VIT D sobre a DP. As diversas ações biológicas da VIT D, como o aumento da expressão do fator neurotrófico derivado da glia (GDNF), a restauração dos níveis de tirosina hidroxilase (TH), a inibição da ativação microglial, bem como a modulação da concentração de dopamina, ratificam a relevância de investigações sobre a ação e os mecanismos pelos quais a VIT D age como agente neuroprotetor (CASS et al., 2014; KNEKT et al., 2010; ORME et al., 2013; PETERSON et al., 2013; SANCHEZ et al., 2009; SMITH et al., 2006; WEISS, 2011).

Em vista da deficiência dos recursos terapêuticos e da intensa prospecção por novos agentes que viabilizem o abrandamento sintomatológico motor e não-motor,

redução dos efeitos colaterais e, principalmente, que possam impedir ou retardar o avanço do processo neurodegenerativo, pesquisas sobre a potencial neuroproteção da VIT se tornam imprescindíveis para a viabilidade desta como uma nova ferramenta terapêutica para a DP. Tendo em vista a relevância da VIT D, esta pesquisa visa avaliar o potencial efeito neuroprotetor da suplementação com vitamina D no modelo animal de DP induzida por lesão estriatal unilateral com 6-hidroxidopamina (6-OHDA).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

- Investigar o efeito da suplementação de vitamina D sobre as alterações comportamentais, neuroquímicas e imunohistopatológicas em modelo de DP induzido por injeção estereotáxica unilateral de 6-OHDA.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- Verificar os efeitos da suplementação com VIT D no comportamento rotacional induzido por apomorfina em animais submetidos ao modelo de DP por 6-OHDA;
- Avaliar os efeitos da suplementação com VIT D sobre as alterações comportamentais nos testes do campo aberto e nado forçado em animais submetidos ao modelo de DP por 6-OHDA;
- Analisar as concentrações de dopamina e seus metabólitos (DOPAC e HVA) no corpo estriado direito (CED) e esquerdo (CEE) após tratamento com VIT D em animais submetidos ao modelo de DP por 6-OHDA;
- Avaliar os efeitos da suplementação com VIT D sobre o estresse oxidativo, sendo este determinado pelo índice de peroxidação lipídica e a produção de nitrito, em diversas áreas cerebrais de animais submetidos ao modelo de DP por 6-OHDA;
- Verificar o efeito da suplementação com vitamina D sobre o grau de degeneração e morte neuronal (coloração de cresyl violeta) em animais submetidos ao modelo de DP por 6-OHDA;
- Analisar os efeitos da suplementação com vitamina D no número de células imunopositivas para a enzima tirosina hidroxilase (TH) por meio de ensaios imunohistoquímicos de animais submetidos ao modelo de DP por 6-OHDA;
- Analisar o número de células imunopositivas para o transportador de dopamina (DAT), por meio de ensaios imunohistoquímicos de animais submetidos ao modelo de DP por 6-OHDA;

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Animais

Foram utilizados ratos *Wistar*, machos, com peso variando entre 250 - 300g provenientes do Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC. Os animais eram mantidos em caixas de prolipropileno com no máximo 6 animais, à temperatura média de  $24 \pm 2^\circ\text{C}$  em ciclos de alternância claro/escuro de 12 horas, recebendo ração padrão e água à vontade.

Para os cuidados com os animais, esta pesquisa seguiu os princípios éticos da experimentação animal instituído pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). O estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal do Ceará (CEPA), com protocolo sob nº 107/2015 (Anexo 1).

#### 3.2. Drogas e reagentes

As drogas utilizadas foram: 6-hidroxidopamina (6-OHDA) (Sigma Aldrich, USA), apomorfina (Sigma Aldrich, USA), cloridrato de ketamina (Vetanarcol®, Laboratório König S/A), cloridrato de xilazina (Kensol®, Laboratório König S/A). Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

#### 3.3. Protocolo experimental

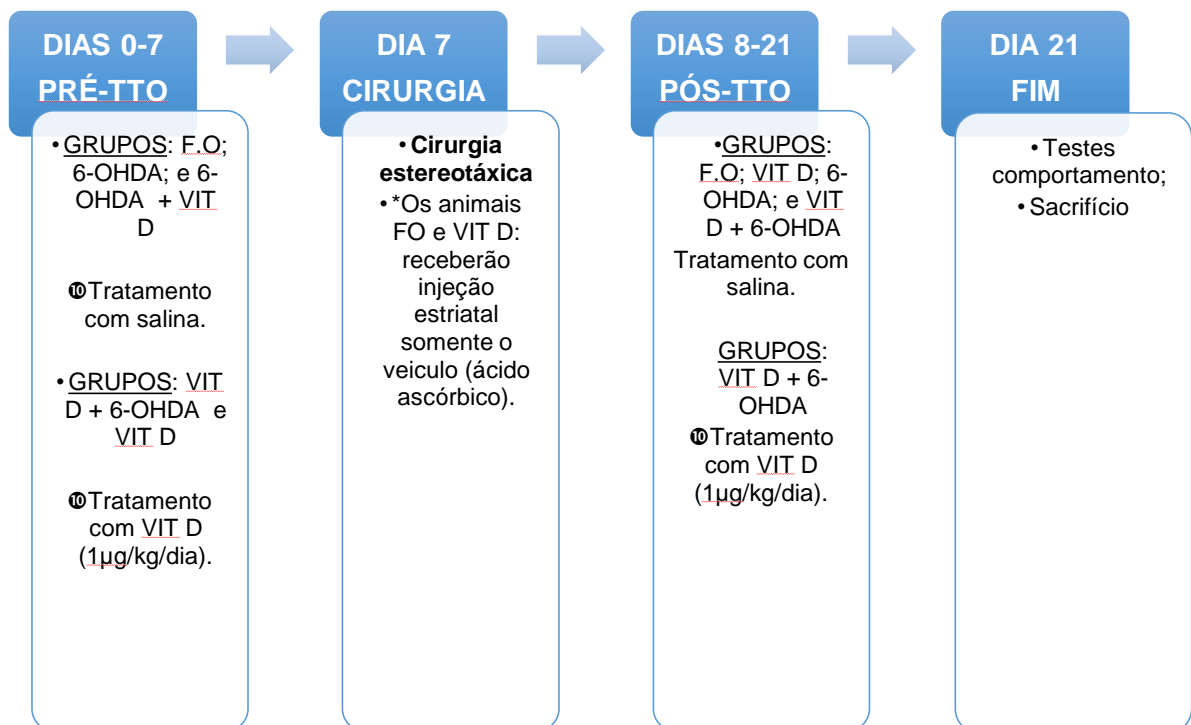
Os animais foram divididos em 5 grupos experimentais (FO, 6-OHDA, PRÉ-TTO VIT D+ 6-OHDA, 6-OHDA+PÓS-TTO VIT D e VIT D). O protocolo experimental seguiu descrição presente no **esquema 1 e 2**.

#### 3.4. Cirurgia Estereotóxica (UNGERSTEDT, 1968)

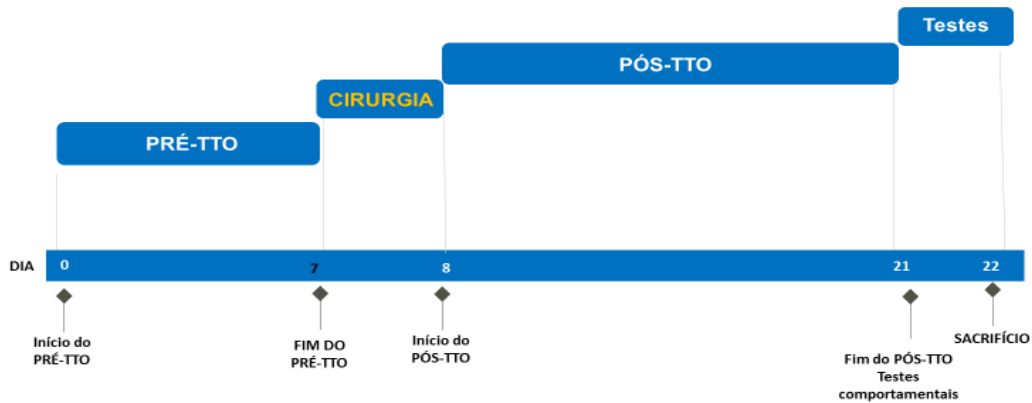
Os procedimentos de lesão do corpo estriado foram realizados através de cirurgia estereotóxica. Os animais foram anestesiados com xilazina (10mg/kg via intraperitoneal, i.p.) e quetamina (80mg/kg via intramuscular, i.m.) e, posicionados no

aparelho estereotáxico (Starling®), sendo então submetidos à tricotomia da região superior da cabeça e, posteriormente, fixados ao aparelho estereotáxico onde receberam injeção estereotáxica unilateral de 6-OHDA (duas injeções de 1µl de uma solução de 6-OHDA dissolvida em salina 0,9%, contendo 0,2% de ácido ascórbico) na dose de 12µg/µl dentro do corpo estriado direito (AP 0,9/1,4; ML 3,8; DV 3,3 a partir do bregma) (**figura 7**) de acordo com o atlas de Paxinos e Watson (2005), usando uma seringa de Hamilton de 5µl. Os animais do grupo falso - operado foram submetidos aos mesmos procedimentos cirúrgicos, no entanto, não receberam a neurotoxina 6-OHDA, sendo somente introduzida à agulha nas mesmas coordenadas estereotáxicas, seguido de infusão de salina estéril com ácido ascórbico a 0,1% (veículo para 6-OHDA). A seringa foi deixada no local de aplicação por 5 minutos para assegurar que o seu conteúdo tenha sido injetado corretamente (KIM et al, 1998).

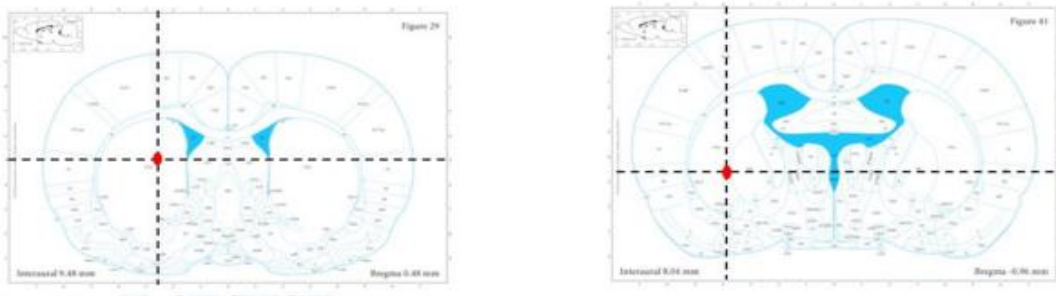
#### Esquema 1: Protocolo de tratamento experimental



## Esquema 2: Desenho Experimental



**Figura 7: Representação esquemática representativa das 2 coordenadas estereotáticas para injeção intracraniana de 6-OHDA no corpo estriado.**



Os tracejados indicam as coordenadas médio-lateral e dorsoventral. Coordenadas ântero-posteriores aproximadas, de acordo com as lâminas disponíveis no atlas. Fonte: adaptado Paxinos; Watson (2006)

### 3.5.1. Testes Comportamentais

#### 3.5.1.1. Avaliação do comportamento rotacional induzido por apomorfina (UNGERSTEDT, 1971)

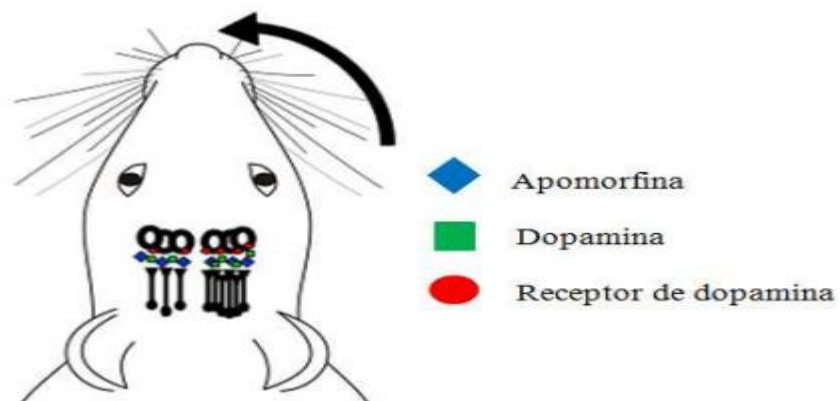
A gravidade da depleção de dopamina foi avaliada pelo comportamento rotacional induzido po apomorfina (**figura 8**). Este é um teste sensível para lesões estriatais com extensões maiores que 80%. (DEUMENS et al., 2002).

Os animais foram submetidos ao teste rotacional duas semanas após a lesão estriatal com 6-OHDA. O comportamento rotacional foi determinado através do monitoramento das rotações induzidas pela apomorfina (0,3mg/kg, subcutânea), sendo o número de rotações completas em volta do próprio eixo observado durante 60 minutos (KIM et al, 1998).

### 3.5.1.2. Avaliação do comportamento motor via teste do Campo Aberto (Open Field) (BROADHURST, 1957)

Neste teste é possível avaliar a atividade exploratória do animal, em que foi usado o modelo do campo aberto. O Campo aberto consiste de uma arena quadrada de acrílico preto (50 x50 cm), iluminada com luz vermelha. O piso da arena é dividido em quatro quadrados iguais. No teste os animais foram colocados na arena e deixados para explorar o ambiente por 5 (cinco) minutos. Durante este período foi registrado o número de quadrantes atravessados pelo animal (*crossings*). Também foi avaliado o número de vezes que o animal se levantou para explorar o ambiente, mantendo-se suspenso apenas pelas patas traseiras, caracterizando o comportamento exploratório vertical (*rearing*) e a autolimpeza do animal (*grooming*). Após cada animal ser retirado, a arena foi limpa com uma solução de álcool a 20% e seca com toalhas de papel, para evitar que o cheiro de urina e fezes interferissem no teste.

**Figura 8: Representação da perda parcial de receptores de neurônios dopaminérgicos estriatais**



### **3.5.1.3. Avaliação do comportamento depressivo via teste do Nado forçado (Forced Swim test) (PORSOLT et al., 1978)**

Este modelo experimental é utilizado para o estudo da atividade depressiva através do desespero comportamental. Neste teste, os ratos foram submetidos a um período de nado forçado, uma situação inescapável de estresse como o objetivo de identificar se os animais estavam com comportamento depressivo. Os animais foram colocados em um cilindro de acrílico (60 cm de altura e 23 cm de diâmetro), contendo 25 cm de água por 6 (seis) minutos. Dessa forma, no primeiro minuto de adaptação registramos o tempo de imobilização nos 5 (cinco) minutos posteriores.

### **3.5.2. Dissecção da área cerebral ( corpo estriado, córtex e hipocampo)**

Os animais foram decapitados com guilhotina (Harvard, USA) 15 dias após a cirurgia estereotáxica de 6-OHDA sendo, os encéfalos retirados rapidamente e colocados sobre papel alumínio em uma placa de Petri com gelo. Acompanhando a fissura sagital mediana, a camada cortical cerebral foi liberada das leptomeninges com uma pinça reta de microdissecção que divulsionou o córtex delicadamente, expondo as áreas cerebrais de interesse do estudo (CPF, HP, CED e CEE). Após pesados, as áreas foram guardados em freezer a -20°C ou depositados em formol tamponado e, posteriormente, álcool a 70% para o estudo histológico.

### **3.5.3. Determinação da concentração de DA, DOPAC e HVA com HPLC**

O CE foi utilizado para preparar homogenatos a 10%. Os tecidos cerebrais foram sonicados em ácido perclórico por 30 segundos e centrifugados por 15 minutos em centrífuga refrigerada a 15.000 rpm. Uma alíquota de 20 µl do sobrenadante foi, então, injetada no equipamento de HPLC para a análise química.

Para a análise de DA e DOPAC, uma coluna CLC-ODS(M) com comprimento de 25 cm, espessura de 4,6 mm e diâmetro da partícula de 3 µm da Shimadzu-Japão, foi utilizada. A fase móvel utilizada foi composta por tampão ácido cítrico 0,163 M, pH 3,0, contendo ácido octanosulfônico sódico, 0,69 M (SOS) como



reagente formador do par iônico, acetonitrila 4% v/v e tetrahydrofurano 1,7% v/v. DA e DOPAC foram eletronicamente indentificados através de um detector amperométrico (Modelo L-ECD-6A da Shimadzu, Japão) pela oxidação em um eletrodo de carbono vítreo fixado em 0,85 V, relativo a um eletrodo de referência de Ag-AgCl.

Os padrões foram preparados em uma concentração final de 4 ng/mL de DA e DOPAC (Sigma, MO, EUA). A partir da altura ou área dos picos desses padrões, as amostras foram calculadas no programa Microsoft Excel® em um computador e os resultados expressos em ng/g de tecido.

### **3.5.4. Avaliação do Estresse Oxidativo**

#### **3.5.4.1. Determinação da peroxidação lipídica (DRAPER; HADELY, 1990)**

Um dos principais componentes celulares afetados pelo estresse oxidativo é a membrana celular que sofre um processo de peroxidação. O malondialdeído (MDA) é um aldeído de cadeia curta, sendo o principal produto da peroxidação lipídica. Para indentificar o efeito da suplementação com VD sobre a peroxidação lipídica em modelo de 6-OHDA em ratos, foi avaliado pela mensuração de substâncias tiobarbitúricas ácido-reativas (TBARS) nos homogenatos. As amostras foram homogenizadas a 10% com tampão fosfato de potássio monobásico 50 mM pH 7,4, 63 µL do homogenato foi misturado a 100 µL de HClO<sub>4</sub> 35%, sendo estas centrifugadas (7000 rpm/15 min), no qual 150 µL do sobrenadante foram recuperados e misturado com 50 µL de ácido tiobarbitúrico 1,2% e, em sequência, estas amostras foram aquecidas em um banho de água fervente (95-100°C) por 30 min. Após o resfriamento, a peroxidação lipídica foi determinada por espectrofotometria em comprimento de onda de 535 nm e expressa como micrograma de MDA/g de tecido (OHKAWA; OHISHI; YAGI, 1979).

#### **3.5.4.2. Determinação de Nitrito (GREEN et al., 1982)**

Em condições de desequilíbrio oxidativo a concentração de óxido nítrico (NO) aumento expressivamente tornando-o extremamente tóxico com capacidade

para danificar proteínas, lipídeos de membrana e DNA. A partir da dosagem de dióxido de nitrogênio/Nitrato ( $\text{NO}_2/\text{NO}_3$ ) podemos quantificar, de forma indireta, a produção do NO, visto que estes dois são seus metabólitos. Para avaliar o efeito da suplementação com VIT D de ratos parkinsonianos na produção de NO, foram determinados níveis de nitrito em homogenatos dos cérebros de ratos imediatamente após a decapitação em todos os grupos.

- **Preparação da Curva Padrão:**

Foram pesados 7mg de nitrito de sódio ( $\text{NaNO}_2$ ) e dissolvidos em 10 mL de água destilada (estoque-10mM). Foram feitas as diluições em série (10 e 20x), ficando 1 mM, 100  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 2,5  $\mu\text{M}$ , 1,25  $\mu\text{M}$ , 0,625  $\mu\text{M}$ , 0,312  $\mu\text{M}$ . Foi realizada uma equação da reta para o cálculo das concentrações do teste (GREEN et al., 1982). Foram preparados homogenatos das áreas cerebrais a 10% (w/v) em solução de cloreto de potássio (KCl) 1,15%. Após a centrifugação (800rpm, 10 min), os sobrenadantes foram coletados e a produção de NO determinada através da reação de Griess. Uma alíquota de 100  $\mu\text{l}$  do sobrenadante foi incubada com 100  $\mu\text{l}$  do reagente de Griess [sulfanilamida 1% em  $\text{H}_3\text{PO}_4$  1%/N-(-1-naphthyl)-ethylenediamine 0,1%/ $\text{H}_3\text{PO}_4$  1%/diluído em água (1:1:1:1)] a temperatura ambiente por 10 min. A absorvância é medida em espectrofotômetro a 540 nm. A concentração de nitrito ( $\mu\text{M}$ ) foi determinada a partir de uma curva padrão de  $\text{NaNO}_2$ .

### **3.5.5. Análise Imunohistoquímica**

Para a realização dos procedimentos imunohistoquímicos os animais foram decapitados com uma guilhotina (Harvard, USA) sem utilização de anestésico, pois os mesmos poderiam interferir nos resultados da pesquisa. Os cérebros foram removidos por inteiro, depois divididos em dois por um corte coronal com uma lâmina. A porção caudal dos cérebros, contendo o CE foi preparada para os testes. Essas amostras foram acondicionadas em formol tamponado 4% para fixação do material e, após 24h, esta solução foi substituída por álcool a 70%.

### **3.5.5.1. COLORAÇÃO VIOLETA CRESIL (BITTENCOURT, 2007)**

A coloração de violeta de cresil é uma das técnicas mais utilizadas para investigação do sistema nervoso. Ela permite a evidência da substância de Nissl, material granular constituído por RNA ribossomal, RER e DNA no nucléolo, possibilitando a discriminação destas estruturas celulares específicas. As lâminas foram mergulhadas em água destilada durante 1 (um) minuto para posterior incubação na solução de violeta de cresil 0,5% em ácido acético, por um período de 3 (três) minutos. Em seguida, as lâminas foram desidratadas em álcool (50, 70 e 100%), diafanizadas e montadas em meio à base de xilol (Entelan®), e, posteriormente, examinadas.

### **3.5.5.2. IMUNOHISTOQUÍMICA PARA TIROSINA HIDROXILASE**

A Tirosina Hidroxilase (TH) é uma enzima envolvida na síntese de dopamina e é um marcador molecular de neurônios dopaminérgicos. Na doença de Parkinson há uma deficiência de TH, assim como baixos níveis de dopamina. A detecção imunohistoquímica foi realizada sobre cortes estriatais e mesencefálicos. Para examinar a extensão da desnervação presente na substância negra, a imunorreatividade de TH foi avaliada comparando o lado lesionado e não lesionado.

Os cortes foram lavados três vezes com tampão fosfato (PBS, pH 7.4) por 5 (cinco) minutos, o bloqueio da peroxidase endógena foi feito com peróxido de hidrogênio 0,3% (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a 3% em metanol a 10% em TB durante 15 min em seguida lavadas TB (três vezes). Foram então pré-incubadas durante 30 minutos com soro de cabra normal a 5% (NGS) em Triton 0,3%, logo após, incubadas com o anticorpo primário (1:500, anti-TH; Calbiochem, Nottingham, United Kingdom) em 2% NGS/TB durante a noite a 4°C. Após três banhos com TB, os cortes foram incubados com um anticorpo secundário (biotinylated goat antirabbitIgG — 1:200, DAKO) por 2 horas, banhados novamente três vezes com TB e revelados com diaminobenzidina 0,05% em 0.03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 5–10 min. Após lavagem com água destilada, os cortes foram montados em meio aquoso e cobertos com lamínula para posterior exame.

### 3.5.5.3. IMUNOHISTOQUÍMICA PARA DAT

DAT é o transportador transmembrana de dopamina que fica localizado na terminação nervosa pré-sináptica, onde é responsável por finalizar a atividade de dopamina através da recaptção pré-sináptica desse neurotransmissor, ou seja, o transporte de dopamina para o sítio pré-sináptico (recaptção). Os receptores dopaminérgicos parecem apresentar alterações na DP. A perda de dopamina mesencefálica na doença de Parkinson é acompanhada de uma perda de DAT (RACHAKONDA et al., 2004). O procedimento segue o mesmo para TH, sendo o anticorpo anti-DAT diluído em 1:100.

### 3.5.6. Análise Estatística

A análise dos dados foi realizada através do software *GraphPad Prism*, versão 6.0 para *Windows*, expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Para comparação de médias entre os grupos, foi utilizado para comparação múltipla dos parâmetros, pela Análise de Variância (ANOVA). O nível de significância entre os grupos foi determinado pelo teste de *Student Newman Keuls*. Em todas as análises, foram consideradas, estatisticamente significantes, valores de  $p < 0,05$ .

## 4. RESULTADOS

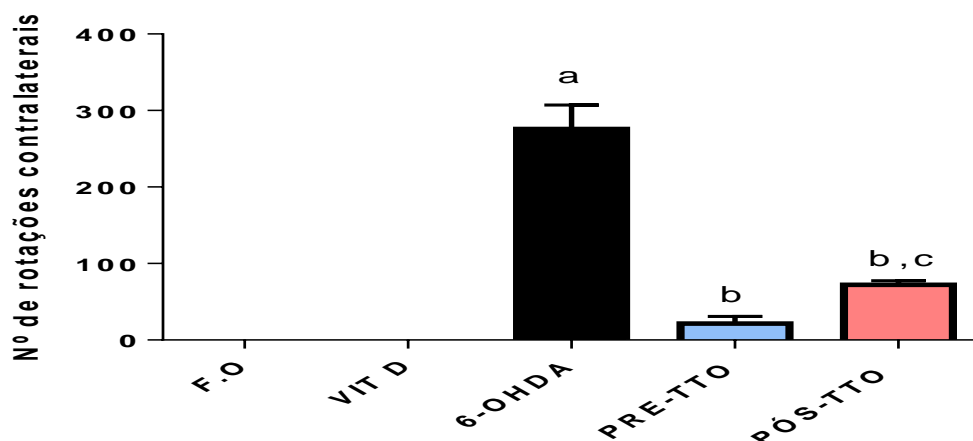
### 4.1. Estudos Comportamentais

#### 4.1.1. Efeito da suplementação com VIT D no comportamento rotacional por apomorfina em ratos submetidos ao modelo de DP induzido por 6-OHDA

A avaliação do comportamento rotacional induzido por apomorfina é utilizada como parâmetro para a determinação da extensão da lesão estriatal em animais submetido à injeção estriatal unilateral de 6-OHDA e se caracteriza por movimentos estereotipados de rotação na direção contralateral à lesão realizada.

A **figura 9** mostra o efeito da suplementação com vitamina D, anterior (PRÉ-TTO, 1µg/Kg/dia) e posterior (PÓS-TTO, 1µg/Kg/dia) à lesão estriatal sobre o comportamento rotacional induzido por apomorfina. O PRÉ-TTO desencadeou uma redução de 92,15% ao passo que o PÓS-TTO reduziu em 73,88% o número de rotações contralaterais em relação aos animais somente lesionados (6-OHDA).

**Figura 9:** Efeito da suplementação com vitamina D no comportamento rotacional induzido por apomorfina (1mg/kg, s.c) em ratos com lesão estriatal induzida por 6-OHDA.



Teste realizado 14 dias após a injeção estereotáxica de 6-OHDA. Os animais foram observados durante 60 minutos. Os valores foram expressos como média ± EPM (n=8); a vs FO, b vs 6-OHDA e c vs PRÉ-TTO,  $p < 0,05$ . (ANOVA e teste Student - Newman - Keul).

#### 4.1.2. Efeito da suplementação com VIT D sobre a atividade locomotora (Teste do Campo aberto) em ratos submetidos ao modelo de DP induzido por 6-OHDA

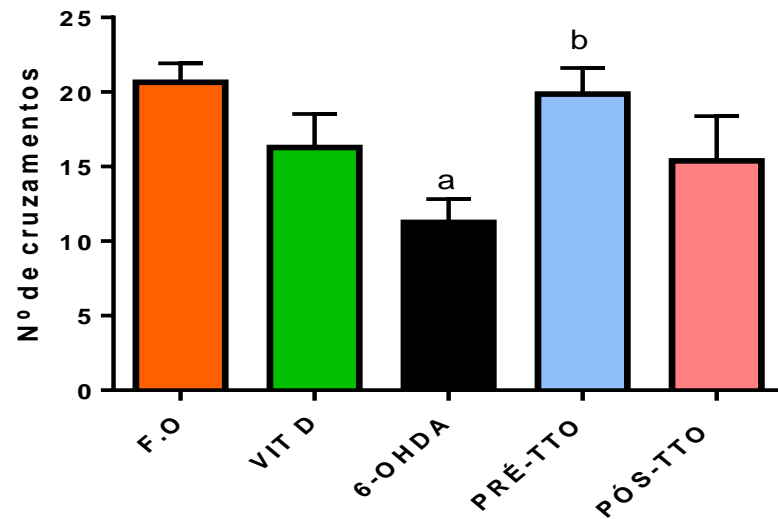
O teste do campo aberto configura, entre outros, como um importante método de observação de alterações na atividade locomotora dos animais. Sendo o animal avaliado quanto ao número  $n^o$  de cruzamentos na arena, o número de iniciativas de comportamento de limpeza (*grooming*), além da quantidade de vezes em que se levanta sendo apoiado completamente pelas patas traseiras (*rearing*).

Os resultados obtidos na avaliação da atividade locomotora, avaliando-se o número de cruzamentos, a lesão pela toxina 6-OHDA desencadeou um quadro de hipolocomoção nos animais. Todavia o PRÉ-TTO com VIT D foi capaz de restaurar a atividade locomotora dos roedores, não apresentando diferença significativa com os animais não lesionados, grupo FO. Apesar de promover aumento da ambulação do animal o PÓS-TTO não difereu estatisticamente com o grupo 6-OHDA (**figura 10**).

A **figura 11** mostra que tanto o PRÉ-TTO ( $21,57 \pm 1,616$ ) como o PÓS-TTO ( $17,57 \pm 2,136$ ) COM VIT D, além dos animais FO ( $31,63 \pm 1,990$ ) apresentaram maior atividade exploratória vertical, avaliando-se o número de *rearing* no teste de campo aberto, ao comparar com o grupo 6-OHDA ( $10,88 \pm 1,109$ ).

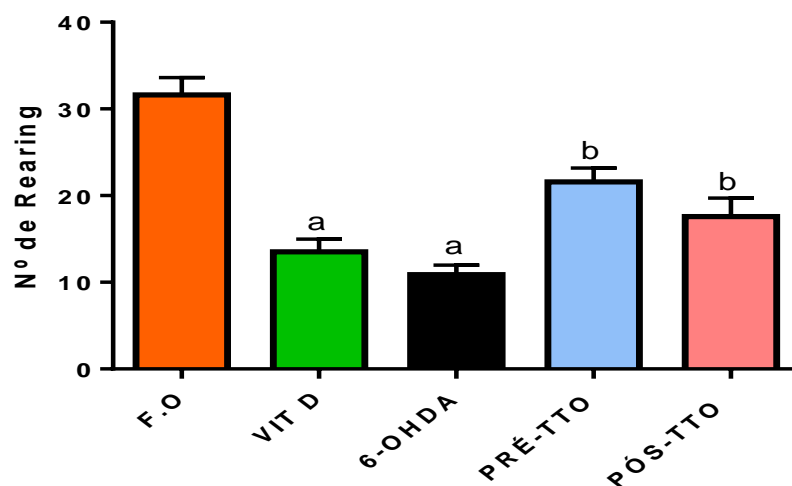
No que cerne ao parâmetro de autolimpeza (*grooming*) (**figura 12**) os animais 6-OHDA ( $0,1250 \pm 0,1250$ ) diminuíram o número de grooming quando comparados aos do grupo FO. Os grupos PRÉ-TTO ( $1,250 \pm 0,1637$ ) e o PÓS-TTO ( $2,250 \pm 0,5261$ ) com vitamina D não defiraram estatisticamente dos animais FO ( $3,250 \pm 0,9955$ ) e 6-OHDA. Entretanto, os animais pertencentes ao grupo VIT D ( $4,875 \pm 0,8952$ ) aumentaram o comportamento de auto-limpeza em relação ao grupo FO.

**Figura 10: Efeito da suplementação com vitamina D sobre o número de cruzamentos no teste do campo aberto em ratos com lesão estriatal induzida por 6-OHDA. Teste realizado 14 dias após a injeção estereotáxica de 6-OHDA.**



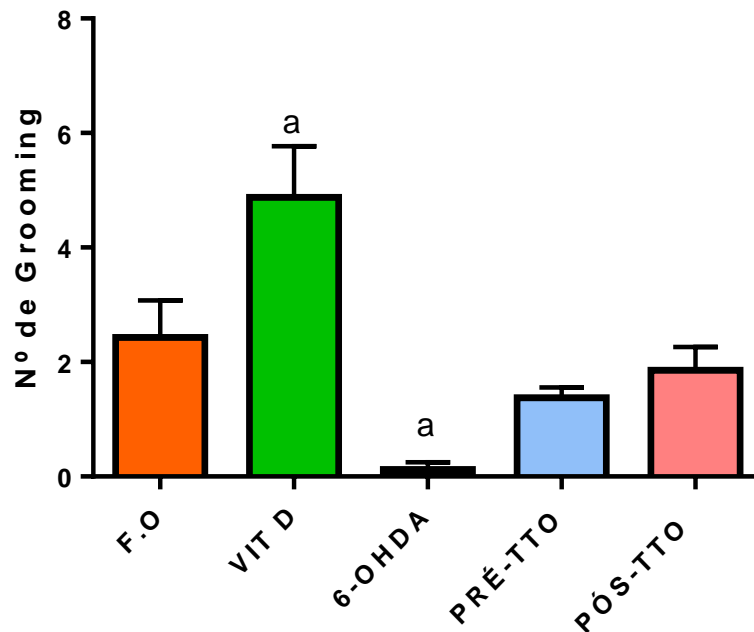
Os animais foram observados durante cinco minutos. Os valores foram expressos como média  $\pm$  EPM (n=8); a vs FO e b vs 6-OHDA,  $p < 0,05$  (ANOVA e teste Student-Newman-Keul).

**Figura 11: Efeito da suplementação com vitamina D sobre o número de rearing no teste do Campo Aberto em ratos com lesão estriatal induzida por 6-OHDA.**



Teste realizado 14 dias após a injeção estereotáxica de 6-OHDA. Os animais foram observados durante cinco minutos. Os valores foram expressos como média  $\pm$  EPM (n= 8); a vs FO e b vs 6-OHDA,  $p < 0,05$  (ANOVA e teste Student-Newman-Keul).

**Figura 12: Efeito da suplementação com vitamina D sobre o número de *grooming* no teste do campo aberto em ratos com lesão estriatal induzida por 6-OHDA.**



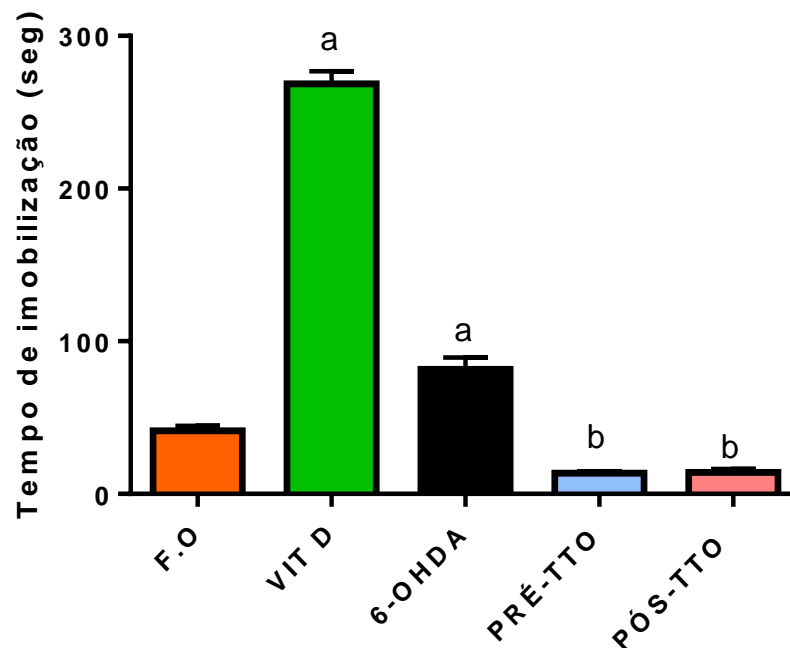
Teste realizado 14 dias após a injeção estereotáxica de 6-OHDA. Os animais foram observados durante cinco minutos. Os valores foram expressos como média  $\pm$  EPM (n=8); a vs 6-OHDA,  $p < 0,05$  vs VIT D (ANOVA e teste Student-Newman-Keul).

#### **4.1.3. Efeito da suplementação com vitamina D sobre o comportamento depressivo via teste do Nado forçado em ratos com lesão unilateral por 6-OHDA**

Os animais que sofreram lesão por 6-OHDA ( $81,57 \pm 7,709$ ) apresentaram aumento significativo no tempo de imobilização, quando comparados ao grupo falsamente operado ( $41,38 \pm 3,223$ ). Contudo, esse efeito foi revertido tanto pelo PRÉ-TTO ( $13,57 \pm 1,192$ ) quanto pelo PÓS-TTO ( $14,14 \pm 2,154$ ) com vitamina D (**figura 13**). Vale salientar que os animais do grupo VIT D ( $268,5 \pm 8,439$ ) demonstraram comportamento atípico ao esperado, exibindo um aumento substancial no tempo de imobilização em relação a todos os demais grupos.



**Figura 13: Efeito da suplementação com vitamina D na avaliação do comportamento deprevisso em ratos com lesão estriatal induzida por 6-OHDA**



Teste realizado 14 dias após a injeção estereotáxica de 6-OHDA. Os animais foram observados durante 5 minutos. Os valores foram expressos como média  $\pm$  EPM (n=8); a vs FO e b vs 6-OHDA,  $p < 0,05$  (ANOVA e teste Student-Newman-Keul).

#### **4.2. Efeito da suplementação com vitamina D sobre a determinação das concentrações de DA seus metabólitos, DOPAC e HVA.**

A injeção estriatal unilateral com 6-OHDA desencadeou uma redução severa na concentração de dopamina do estriado lesionado, ipsilateral (IP), ( $0,5656 \mu\text{g}/\text{mg}$  de tecido  $\pm 0,076$ ) de aproximadamente 78,11% em relação ao estriado não-lesionado, contralateral (CL), ( $2,62 \mu\text{g}/\text{mg}$  de tecido  $\pm 0,331$ ) entre os animais deste mesmo grupo. Ademais, o teor de DA estriatal, IP, encontrada nos animais 6-OHDA apresenta redução de 72,27% e 85,82% em relação ao grupo FO ( $2,02 \mu\text{g}/\text{mg}$  de tecido  $\pm 0,10$ ) e VIT D ( $3,95 \mu\text{g}/\text{mg}$  de tecido  $\pm 0,45$ ), respectivamente. Verificando deste modo que a neurotoxina 6-OHDA promoveu uma degeneração neuronal intensa no lado ipsilateral a lesão (**figura 14**). Contudo, como demonstrado na **tabela 1**, tanto

o PRÉ-TTO como o PÓS-TTO com vitamina D foram efetivos na neuroproteção dopaminérgica, sendo estes capazes de restabeleceram o teor de dopamina estriatal a valores semelhante aos encontrados tanto nos animais FO como no lado contralateral a lesão. Ressalta-se ainda que, a concentração estriatal de dopamina dos animais pertencentes ao grupo VIT D aumentou significativamente em relação ao teor de dopamina estriatal em relação ao grupo FO demonstrando a importância da vitamina D na modulação deste neurotransmissor tanto no estado fisiológico como no estado patológico.

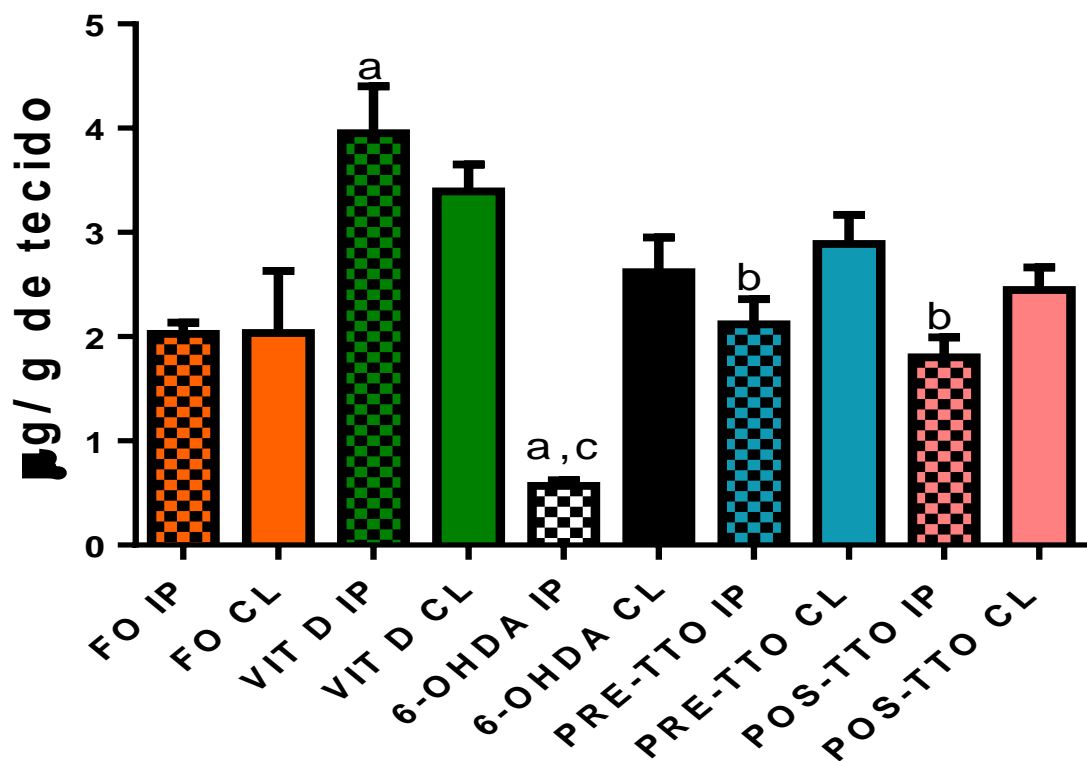
**Tabela 1: Concentração de DA e DOPAC ( $\mu\text{g/g}$  de tecido) no corpo estriado direito e esquerdo.**

<b>GRUPOS</b>	<b>DOPAMINA</b>	<b>DOPAC</b>	<b>HVA</b>	<b>DOPAC/DA</b>
<b>FO IP</b>	2,02 $\pm$ 0,10	3,56 $\pm$ 0,63	2,25 $\pm$ 0,30	1,33
<b>FO CL</b>	2,03 $\pm$ 0,59	2,61 $\pm$ 0,37	1,84 $\pm$ 0,42	1,00
<b>VIT D IP</b>	3,95 $\pm$ 0,45 <sup>ab</sup>	2,25 $\pm$ 0,48 <sup>b</sup>	2,91 $\pm$ 0,29 <sup>b</sup>	0,56
<b>VIT D CL</b>	3,39 $\pm$ 0,25	2,59 $\pm$ 0,43	2,23 $\pm$ 0,44	0,76
<b>6-OHDA IP</b>	0,56 $\pm$ 0,14 <sup>a,c</sup>	0,93 $\pm$ 0,17 <sup>a,c</sup>	0,54 $\pm$ 0,22 <sup>a,c</sup>	1,66
<b>6-OHDA CL</b>	2,62 $\pm$ 0,87	3,56 $\pm$ 0,30	1,97 $\pm$ 0,27	1,35
<b>PRE-TTO IP</b>	2,12 $\pm$ 0,24 <sup>b</sup>	2,67 $\pm$ 0,18 <sup>b</sup>	1,53 $\pm$ 0,28 <sup>b</sup>	1,25
<b>PRE-TTO CL</b>	2,89 $\pm$ 0,27	3,29 $\pm$ 0,23	2,09 $\pm$ 0,16	1,13
<b>POS-TTO IP</b>	1,80 $\pm$ 0,18 <sup>b</sup>	3,41 $\pm$ 0,33 <sup>b</sup>	2,71 $\pm$ 0,33 <sup>b</sup>	1,89
<b>POS-TTO CL</b>	2,44 $\pm$ 0,21	3,94 $\pm$ 0,42	3,40 $\pm$ 0,39	1,61

LEGENDA: <sup>a</sup>p<0,05 vs FO IP; <sup>b</sup>p<0,05 vs 6-OHDA IP; <sup>c</sup>p<0,05 vs 6-OHDA CL. Os valores foram expressos como média  $\pm$  EPM (n=5-8) e significativos para p<0,05 (ANOVA e teste Student-Newman-Keul).

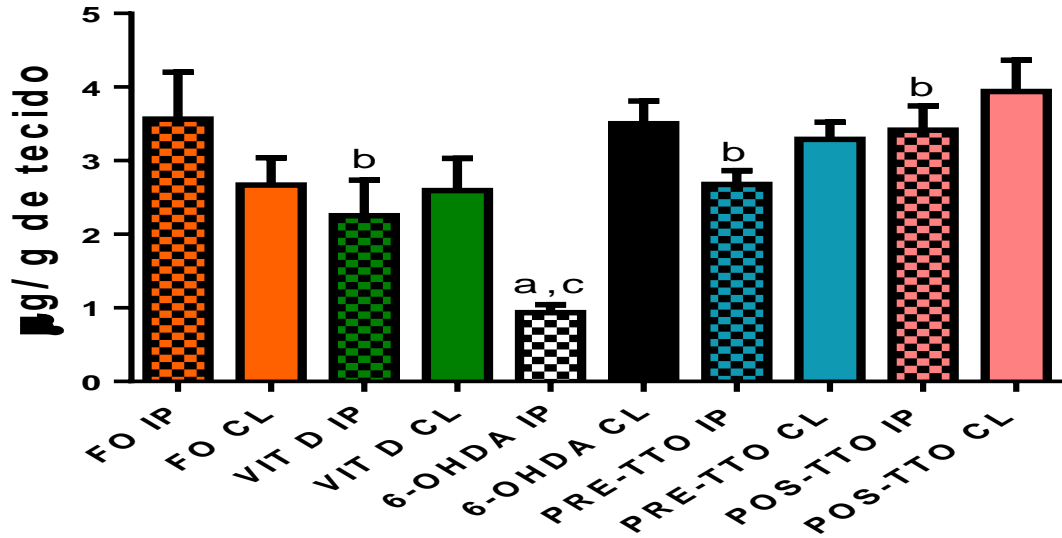
Como demonstrado na **tabela 1** a concentração de DOPAC no grupo 6-OHDA ( $0,93\pm 0,17$ ) apresentou redução de 73,87% com relação ao grupo F.O ( $3,56\pm 0,63$ ). Corroborando a ação moduladora da vitamina D sobre a depleção de dopamina, tanto o PRÉ-TTO ( $2,67\pm 0,18$ ) como o PÓS-TTO ( $3,41\pm 0,33$ ) foram eficazes em suplantiar totalmente e parcialmente a concentração DOPAC, bem como a de HVA, **figuras 15 e 16**.

**Figura 14:** Efeito da suplementação com vitamina D na concentração de dopamina estriatal de ratos com lesão estriatal induzida por 6-OHDA.



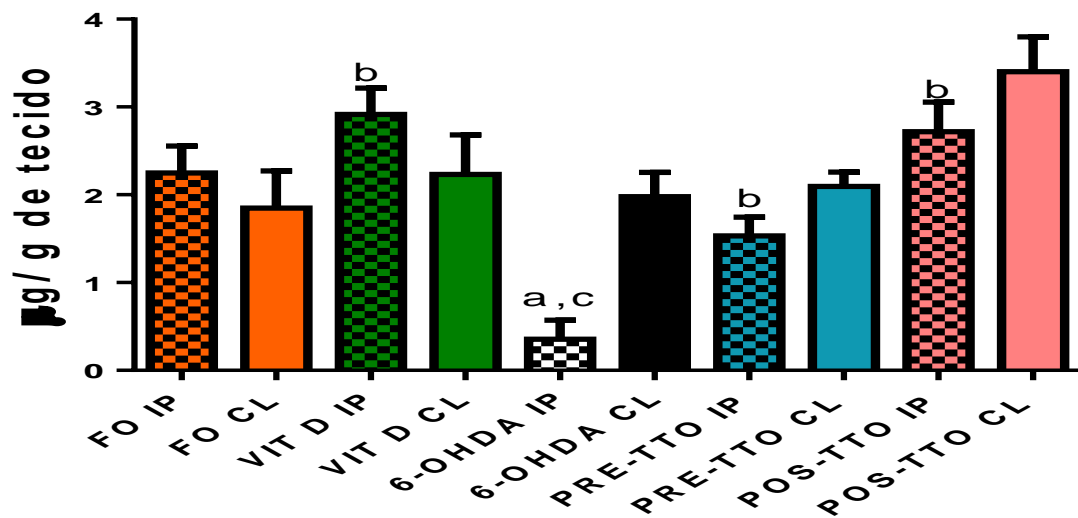
LEGENDA: <sup>a</sup>p<0,05 vs FO IP; <sup>b</sup>p<0,05 vs 6-OHDA IP; <sup>c</sup>p<0,05 vs 6-OHDA CL. Os valores foram expressos como média ± EPM (n=5-8) e significativos para p<0,05 (ANOVA e teste Student-Newman-Keul).

Figura 15: Efeito da suplementação com vitamina D na concentração de DOPAC estriatal de ratos com lesão estriatal induzida por 6-OHDA.



LEGENDA: <sup>a</sup>p<0,05 vs FO IP; <sup>b</sup>p<0,05 vs 6-OHDA IP; <sup>c</sup>p<0,05 vs 6-OHDA CL. Os valores foram expressos como média ± EPM (n=5-8) e significativos para p<0,05 (ANOVA e teste Student-Newman-Keul).

Figura 16: Efeito da suplementação com vitamina D nos níveis de HVA estriatal de ratos com lesão estriatal induzida por 6-OHDA.



LEGENDA: <sup>a</sup>p<0,05 vs FO IP; <sup>b</sup>p<0,05 vs 6-OHDA IP; <sup>c</sup>p<0,05 vs 6-OHDA CL. Os valores foram expressos como média ± EPM (n=5-8) e significativos para p<0,05 (ANOVA e teste Student-Newman-Keul).

### 4.3. Efeito da suplementação com vitamina D sobre o estresse oxidativo em tecidos cerebrais de ratos parkinsonianos

#### 4.3.1. Efeito da suplementação com vitamina D sobre a peroxidação lipídica (TBARS) em tecidos cerebrais de ratos parkinsonianos

A tabela abaixo (**tabela 2**) mostram as concentrações de MDA no estriado direito (CED), estriado esquerdo (CEE), córtex pré-frontal (CPF) e hipocampo (HP) nos animais que sofreram lesão unilateral estriatal por 6-OHDA, falsamente operado, além dos grupos suplementados com vitamina D com (pré-tratamento e pós-tratamento) e sem lesão (VIT D).

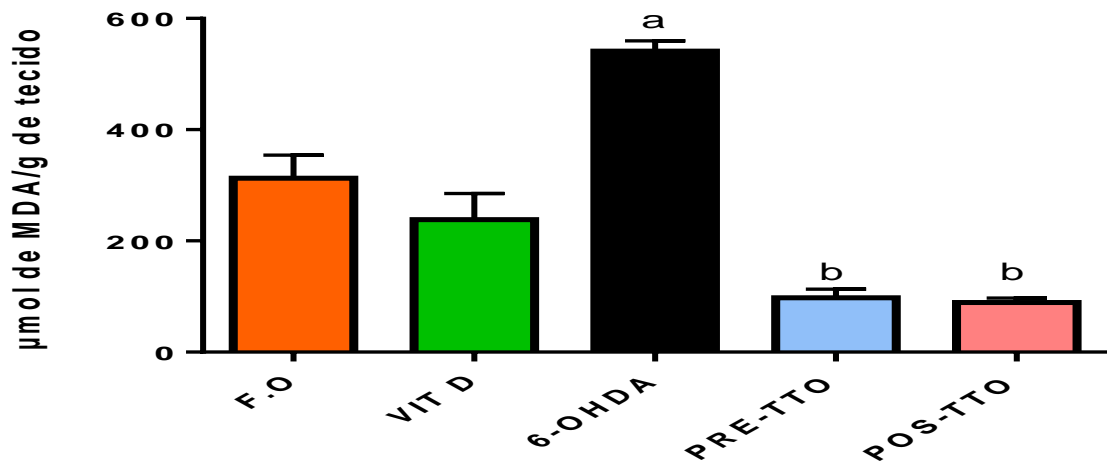
**Tabela 2: Efeito da suplementação com vitamina D em diversas cerebrais sobre a peroxidação lipídica (TBARS) de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA.**

Área/ Grupo	CPF	HP	CED	CEE
<b>FO</b>	312,7±41	271,1±29,0	312,3±38,9	397,8±48,4
<b>VIT D</b>	238,1±47,0	143,1±6,8	182,5±11,1	213,0±25,9 <sup>a</sup>
<b>6-OHDA</b>	541,1±18,8 <sup>a</sup>	697,8±76,1 <sup>a</sup>	1488±193,3 <sup>a</sup>	339,1±13,1
<b>PRE-TTO</b>	97,9 ±15,2 <sup>b</sup>	238,7±19,5 <sup>b</sup>	762,9±43,7 <sup>b</sup>	372,8±33,0
<b>POS-TTO</b>	89,3±7,9 <sup>b</sup>	424,6 ±46,4 <sup>b,c</sup>	358,8±39,0 <sup>b,c</sup>	293,7±49,5

LEGENDA: <sup>a</sup>p<0,05 vs FO; <sup>b</sup>p<0,05 vs 6-OHDA; <sup>c</sup>p<0,05 vs PRE-TTO. Os valores foram expressos como média ± EPM (n=5-8) e significativos para p<0,05 (ANOVA e teste Student-Newman-Keul).

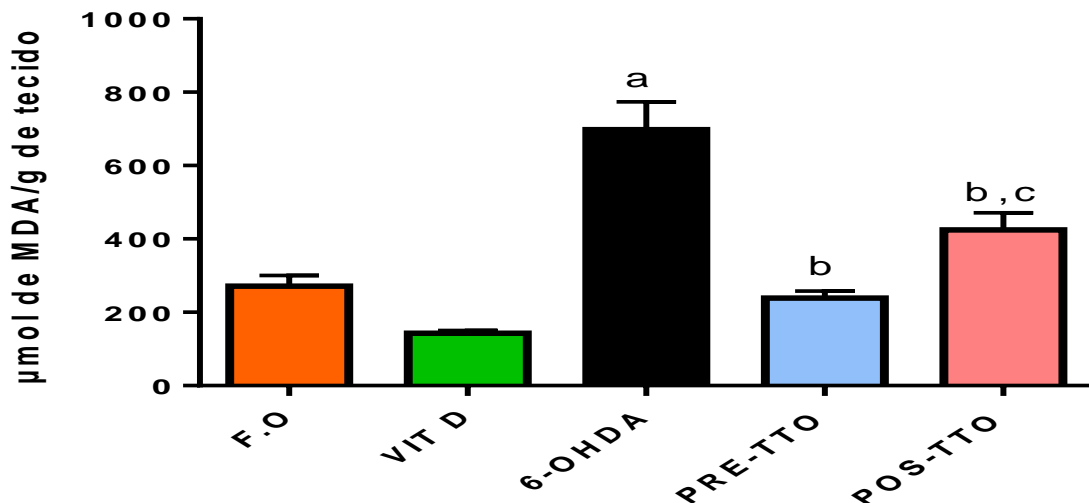
O grupo 6-OHDA apresentou aumento significativo nos níveis de MDA em todas as áreas avaliadas, exceto no CEE. Apresentando no CED aumento de 79,01% e 87,73% com o grupo FO e VIT D, respectivamente. Torna-se necessário salientar que a suplementação com vitamina D foi capaz de restaurar ou diminuir significativamente o teor de MDA, em todas as áreas analisadas, exceto no corpo estriado esquerdo, para valores próximos ao encontrado no grupo F.O (**Figuras 17-19**).

Figura 17: Efeito da suplementação com vitamina D sobre a peroxidação lipídica (TBARS) em CPF de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA.



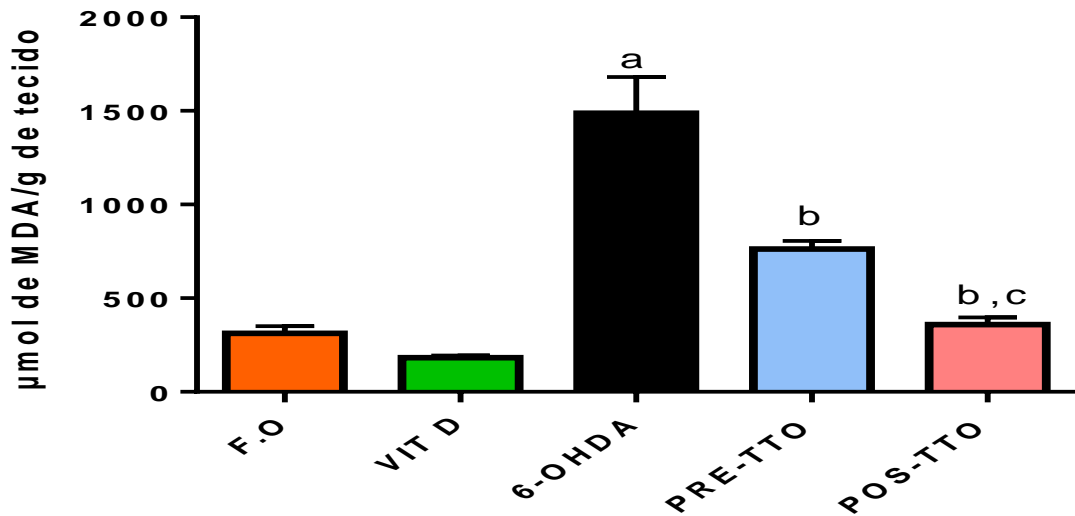
Os valores foram expressos como média  $\pm$  EPM (n= 5-6). a vs FO e b vs 6-OHDA,  $p < 0,05$  (ANOVA e teste Student - Newman - Keul).

Figura 18: Efeito da suplementação com vitamina D sobre a peroxidação lipídica (TBARS) em HP de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA.



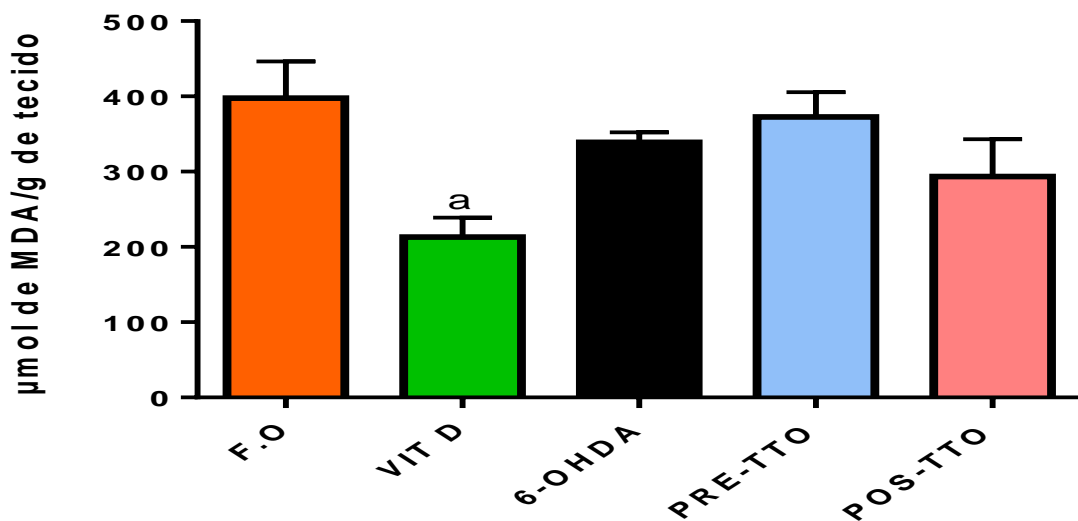
Os valores foram expressos como média  $\pm$  EPM (n= 5 - 6). a vs FO, b vs 6-OHDA e c vs PRÉ-TTO,  $p < 0,05$  (ANOVA e teste Student - Newman - Keul).

Figura 19: Efeito da suplementação com vitamina D sobre a peroxidação lipídica (TBARS) em corpo estriado direito (CED) de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA.



Os valores foram expressos como média  $\pm$  EPM (n= 5 - 6). a vs FO, b vs 6-OHDA e c vs PRÉ-TTO,  $p < 0,05$  (ANOVA e teste Student - Newman - Keul).

Figura 20: Efeito da suplementação com vitamina D sobre a peroxidação lipídica (TBARS) em corpo estriado esquerdo (CEE) de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA.



Os valores foram expressos como média  $\pm$  EPM (n= 5 - 6). a vs FO,  $p < 0,05$  (ANOVA e teste Student - Newman - Keul).

### 4.3.2. Efeito da suplementação com vitamina D sobre a dosagem de nitrito/nitrato ( $\text{NO}_2/\text{NO}_3$ ) em tecidos cerebrais de ratos parkinsonianos

A partir a dosagem de  $\text{NO}_2/\text{NO}_3$  podemos avaliar, de modo indireto, a concentração de óxido nítrico no tecido tendo em vista que estes dois são seus metabólitos.

A concentração de  $\text{NO}_2/\text{NO}_3$  aumentou significativamente em todas as áreas estudadas nos animais 6-OHDA ao comparar com os animais FO e VIT D. Vale salientar que o teor de nitrito/nitrato encontrado no CED, área de indução da lesão, dos animais 6-OHDA aumentou 57,53% e 69,60% em relação ao grupo FO e VIT D, respectivamente (**tabela 3**).

A suplementação com vitamina D antes (PRÉ-TTO) e após (PÓS-TTO) à lesão por 6-OHDA promoveu melhora da resposta ao estresse oxidativo sendo capaz de diminuir estatisticamente os níveis de  $\text{NO}_2/\text{NO}_3$  no CPF (**figura 20**), HP (**figura 21**) e CED (**figura 22**), entretanto no CEE (**figura 23**) a redução só foi significativa no pré-tratamento.

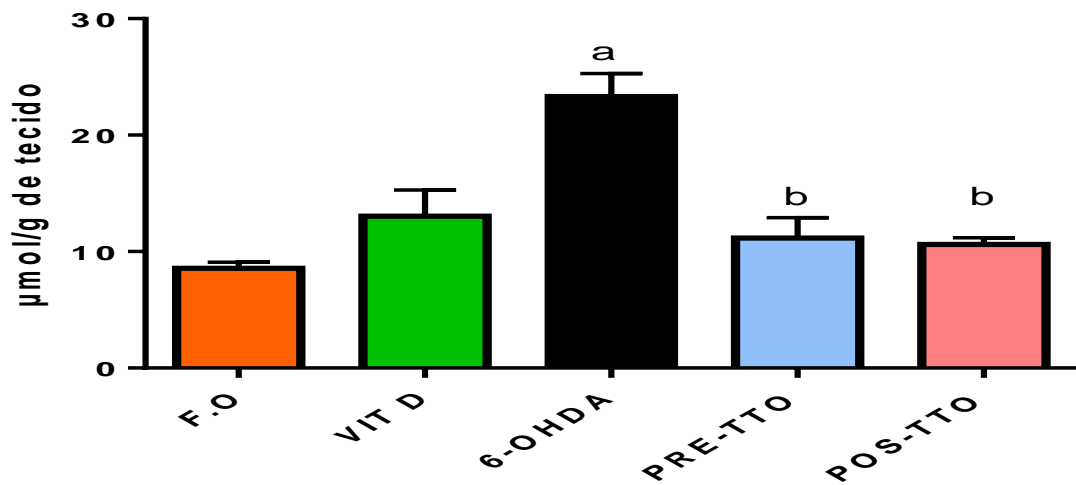
**Tabela 3: Efeito da suplementação com vitamina D sobre a a dosagem de nitrito/nitrato ( $\text{NO}_2/\text{NO}_3$ ) em tecidos cerebrais de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA.**

	F.O	VIT D	6-OHDA	PRÉ-TTO	PÓS-TTO
<b>CPF</b>	312,7±41,9 <sup>b,c</sup>	238,1±47,0 <sup>c,d,e</sup>	541,1±18,8 <sup>d,e</sup>	97,9±15,2	89,3±7,9
<b>HP</b>	271,1±29,0 <sup>c,e</sup>	143,1±6,8 <sup>c,e</sup>	697,8±76,1 <sup>c,e</sup>	238,7±19,5 <sup>e</sup>	424,6±46,4
<b>CED</b>	312,3±38,9 <sup>c,d</sup>	182,5±11,1 <sup>c,d</sup>	1488±193,3 <sup>d,e</sup>	762,9±43,7 <sup>e</sup>	358,8±39,0 <sup>a</sup>
<b>CEE</b>	397,8±48,4 <sup>b</sup>	213,0±25,9 <sup>c</sup>	339,1±13,1	372,8±33,0	293,7±49,5

LEGENDA: <sup>a</sup>p<0,05 vs FO; <sup>b</sup>p<0,05 vs 6-OHDA; <sup>c</sup>p<0,05 vs PRE-TTO. Os valores foram expressos como média ± EPM (n=5-8) e significativos para p<0,05 (ANOVA e teste Student-Newman-Keul).

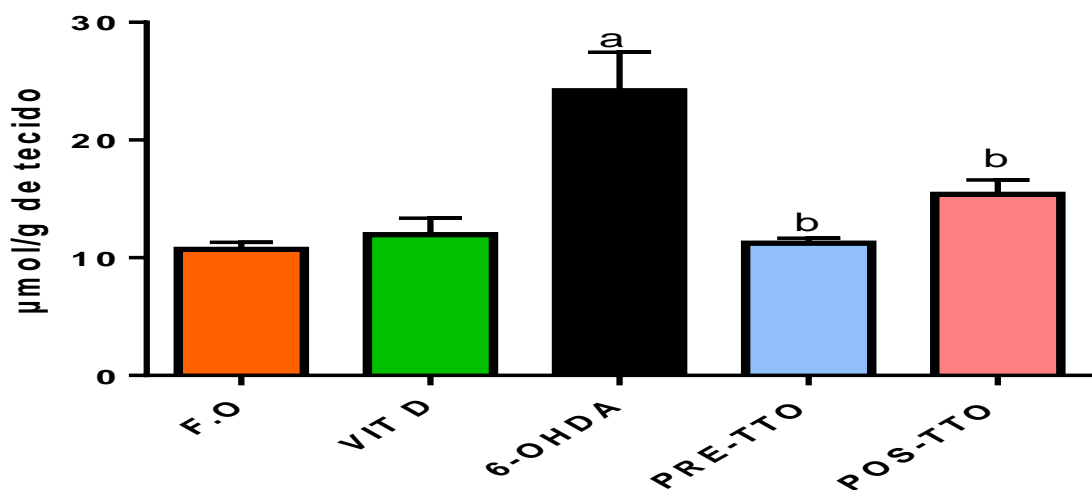


Figura 21: Efeito da suplementação com vitamina D sobre a dosagem de nitrito/nitrato ( $\text{NO}_2/\text{NO}_3$ ) em córtex pré-frontal (CPF) de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA.



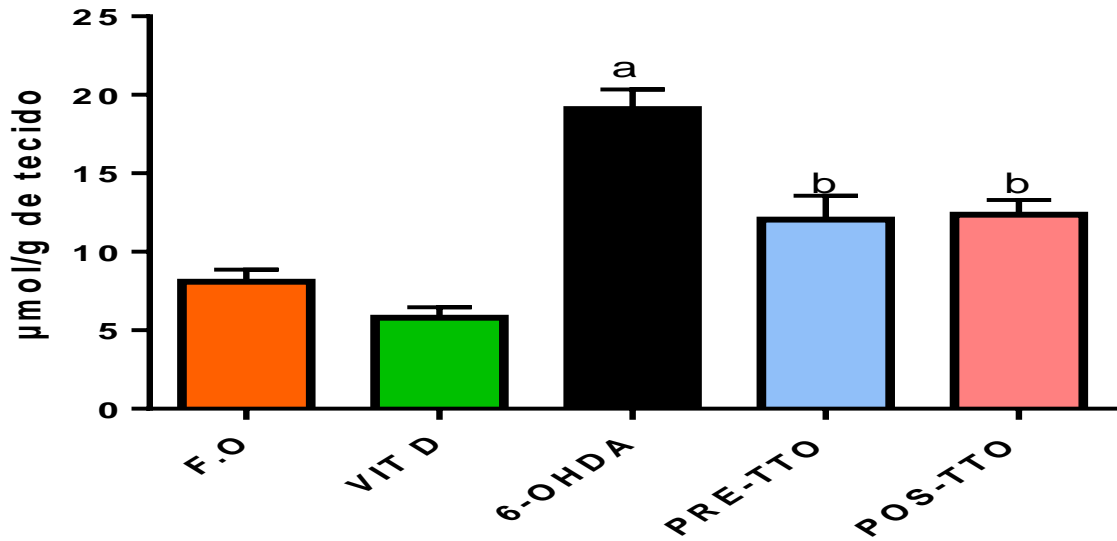
Os valores foram expressos como média  $\pm$  EPM ( $n=5-6$ ). a vs FO e b vs 6-OHDA,  $p<0,05$  (ANOVA e teste Student - Newman - Keul).

Figura 22: Efeito da suplementação com vitamina D sobre a dosagem de nitrito/nitrato em hipocampo (HP) de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA



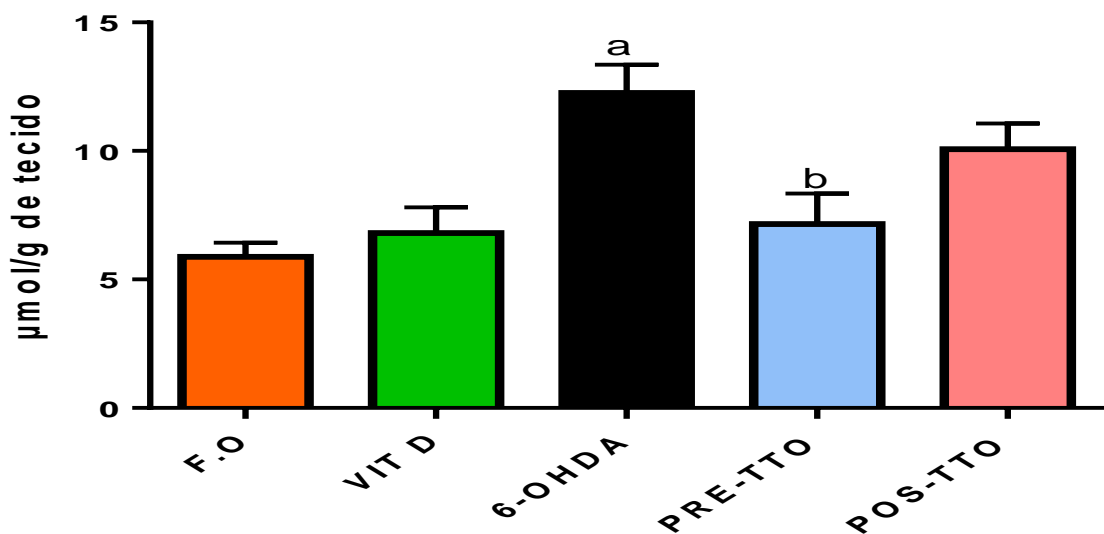
Os valores foram expressos como média  $\pm$  EPM ( $n=6$ ). a vs FO e b vs 6-OHDA,  $p<0,05$  (ANOVA e teste Student-Newman-Keul).

Figura 23: Efeito da suplementação com vitamina D sobre a dosagem de nitrito/nitrato em corpo estriado direito (CED) de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA.



Os valores foram expressos como média  $\pm$  EPM (n= 5 - 6). a vs FO e b vs 6-OHDA,  $p < 0,05$  (ANOVA e teste Student-Newman-Keul).

Figura 24: Efeito da suplementação com vitamina D sobre a dosagem de nitrito/nitrato em corpo estriado esquerdo (CEE) de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA.



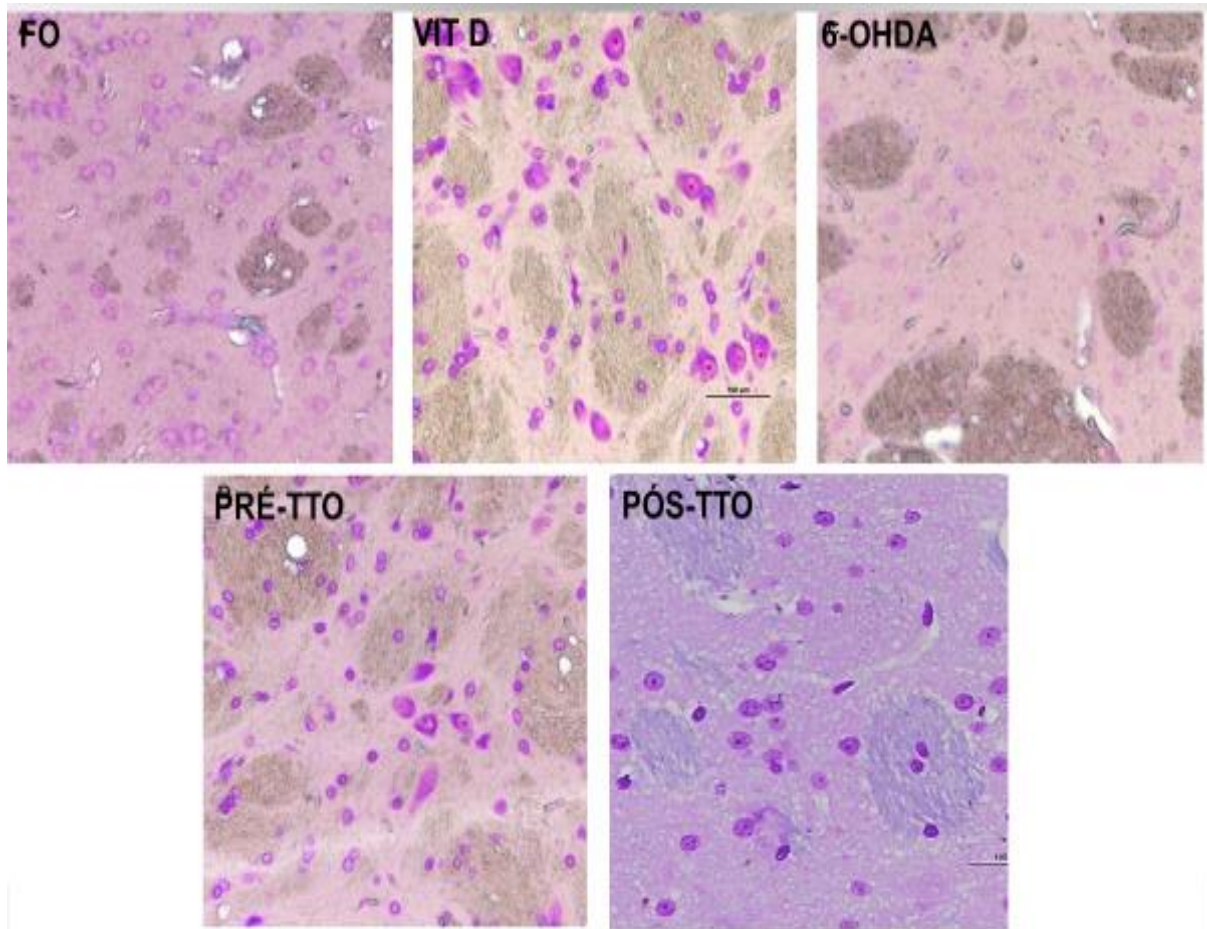
Os valores foram expressos como média  $\pm$  EPM (n=6). a vs FO e b vs 6-OHDA,  $p < 0,05$  (ANOVA e teste Student-Newman-Keul).

#### 4.4. Análises histológicas e imunohistológica

##### 4.4.1. Efeito da suplementação com vitamina D sobre a integridade neuronal de CED e CEE

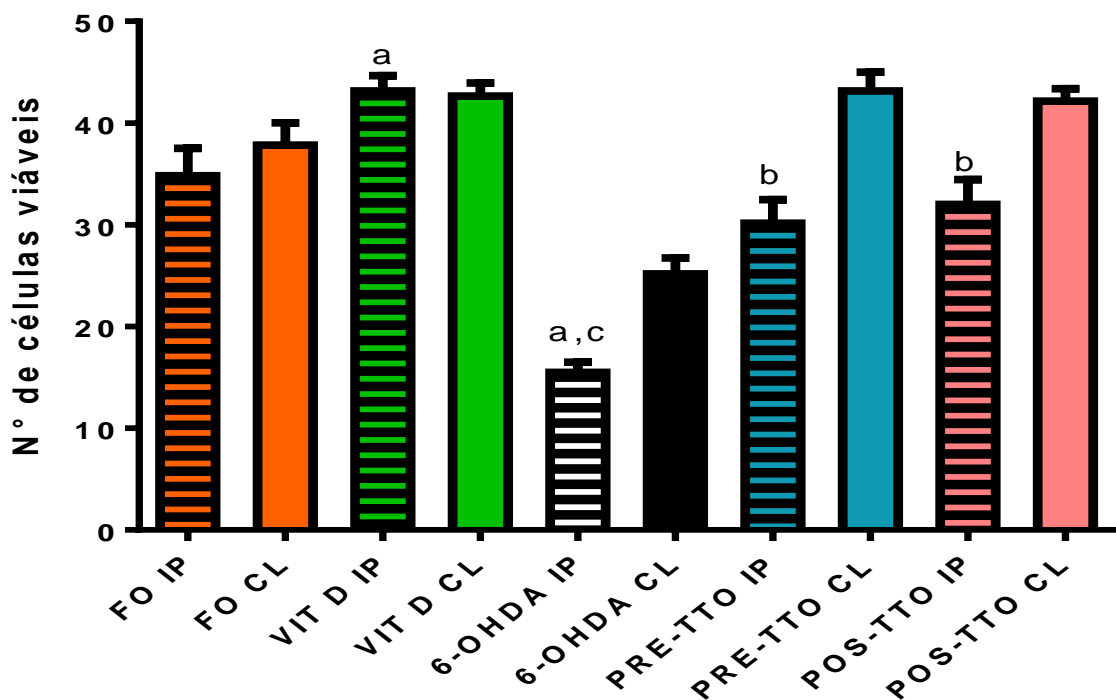
A avaliação do dano neuronal foi realizada através da técnica histológica violeta de cresil, por meio da qual podemos observar a morfologia de neurônios. A lesão por 6-OHDA acarretou em extensivo dano a morfologia estriatal como observado pela citoarquitetura celular anormal, com células vacuolizadas e picnóticas, sem visualização de nucléolos no estriado direito (**figura 25**).

**Figura 25: Fotomicrografia (Violeta de Cresil) do CED de ratos submetidos a lesão unilateral pela 6-OHDA.**



O PRÉ-TTO e o PÓS-TTO com vitamina D demonstrou efetividade na ação citoprotetora, promovendo a manutenção a morfologia celular dos neurônios presentes no estriado direito (**figura 25**). Ressalta-se ainda que, embora a neurotoxina 6-OHDA promove a morte destes neurônios, a suplementação com vitamina D foi capaz de manter a população celular a valores próximos aos encontrados nos animais FO (**figura 26**).

**Figura 26:** Efeito da suplementação com vitamina D sobre o número de neurônios viáveis encontrados em CED e CEE de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA.



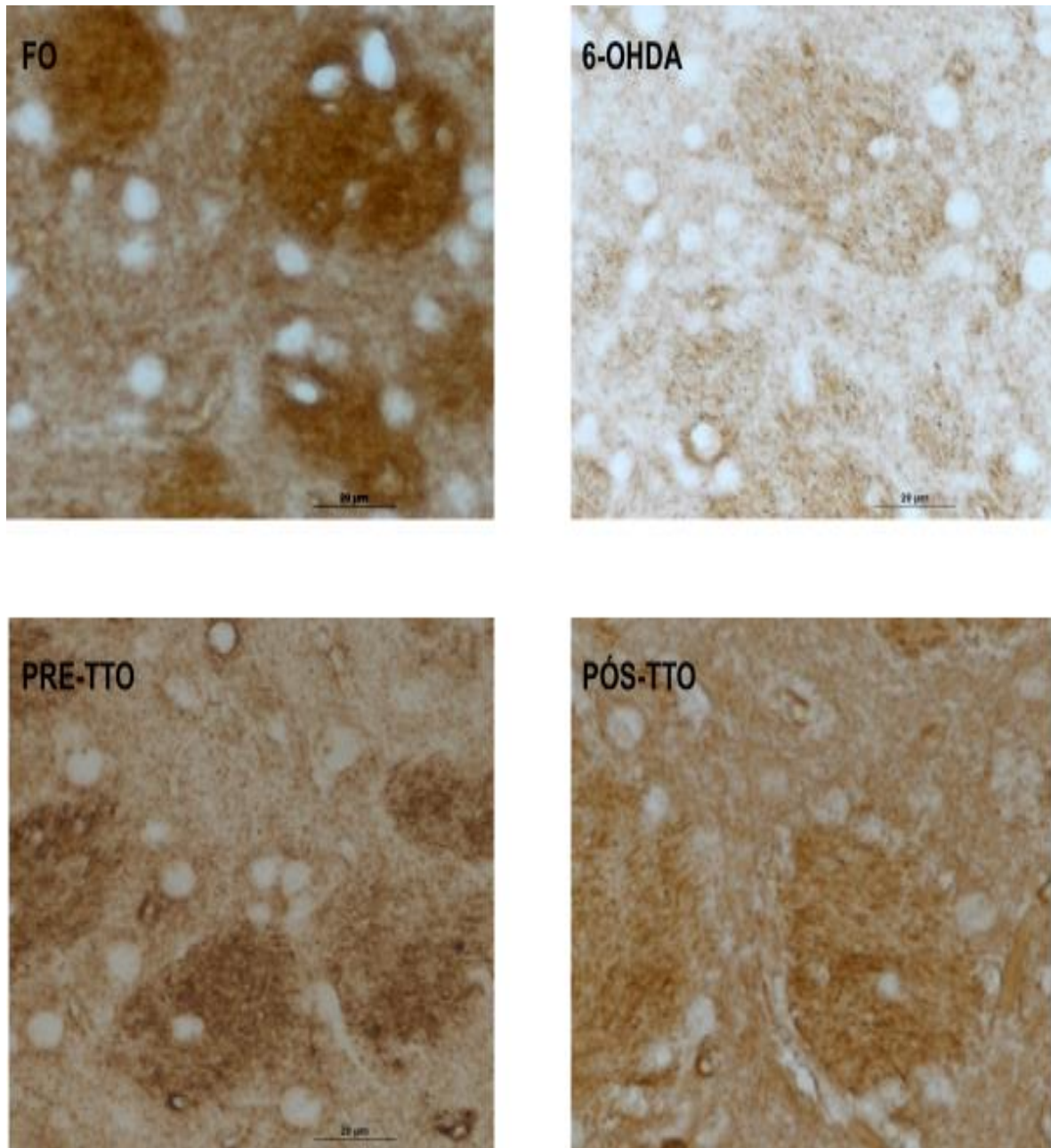
LEGENDA: <sup>a</sup>p<0,05 vs FO IP; <sup>b</sup>p<0,05 vs 6-OHDA IP; <sup>c</sup>p<0,05 vs 6-OHDA CL. Os valores foram expressos como média ± EPM (n=5-8) e significativos para p<0,05 (ANOVA e teste Student-Newman-Keul).

#### **4.4.2. Efeito da suplementação com vitamina D sobre a imunorreatividade para a TH no corpo estriado de ratos lesionados com 6-OHDA**

Como pode ser observado nas **figuras 27 e 28**, os animais pertencentes ao grupo 6-OHDA apresentaram uma redução significativa da área marcada para tirosina hidroxilase (TH) no estriado ipsilateral quando comparada ao grupo FO.

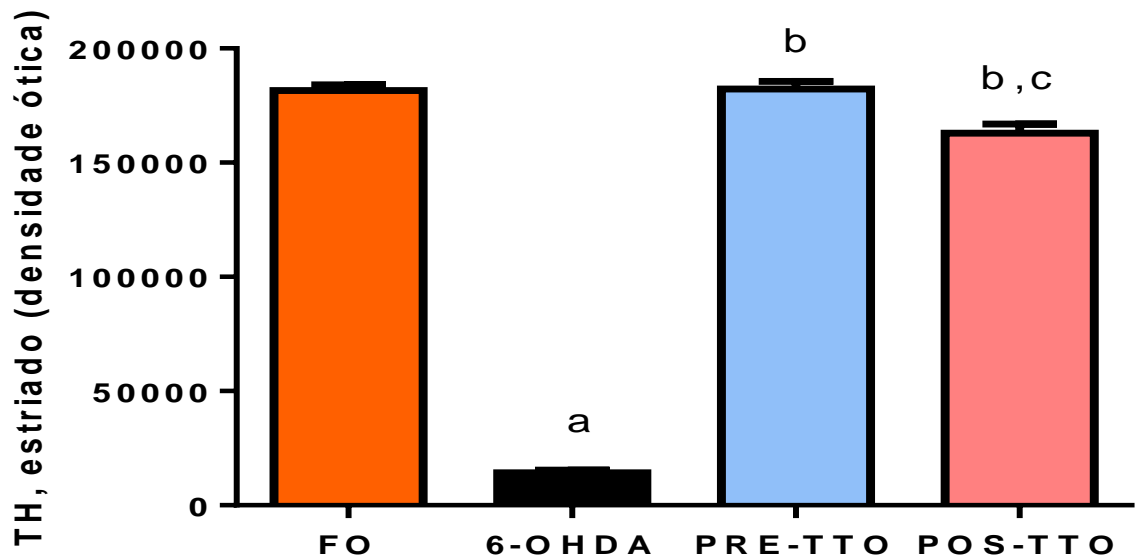
Todavia a suplementação com vitamina D (PRÉ-TTO e PÓS-TTO) promoveu neuroproteção a degeneração neuronal, suscitada pela toxicidade da 6-OHDA, verificado pelo aumento da imunorreatividade para TH (**figuras 27-28**).

**Figura 27: Fotomicrografia representativas de neurônios imunorreativos para tirosina-hidroxilase no estriado direito (lesionado) de ratos submetidos a lesão estriatal com 6-OHDA.**



Coloração marrom representa células imunorreativas a tirosina-hidroxilase no estriado.

**Figura 28:** Efeito da suplementação com vitamina D sobre a quantificação da imunomarcção para Tirosina Hidroxilase (TH) no estriado direito (CED) de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA.

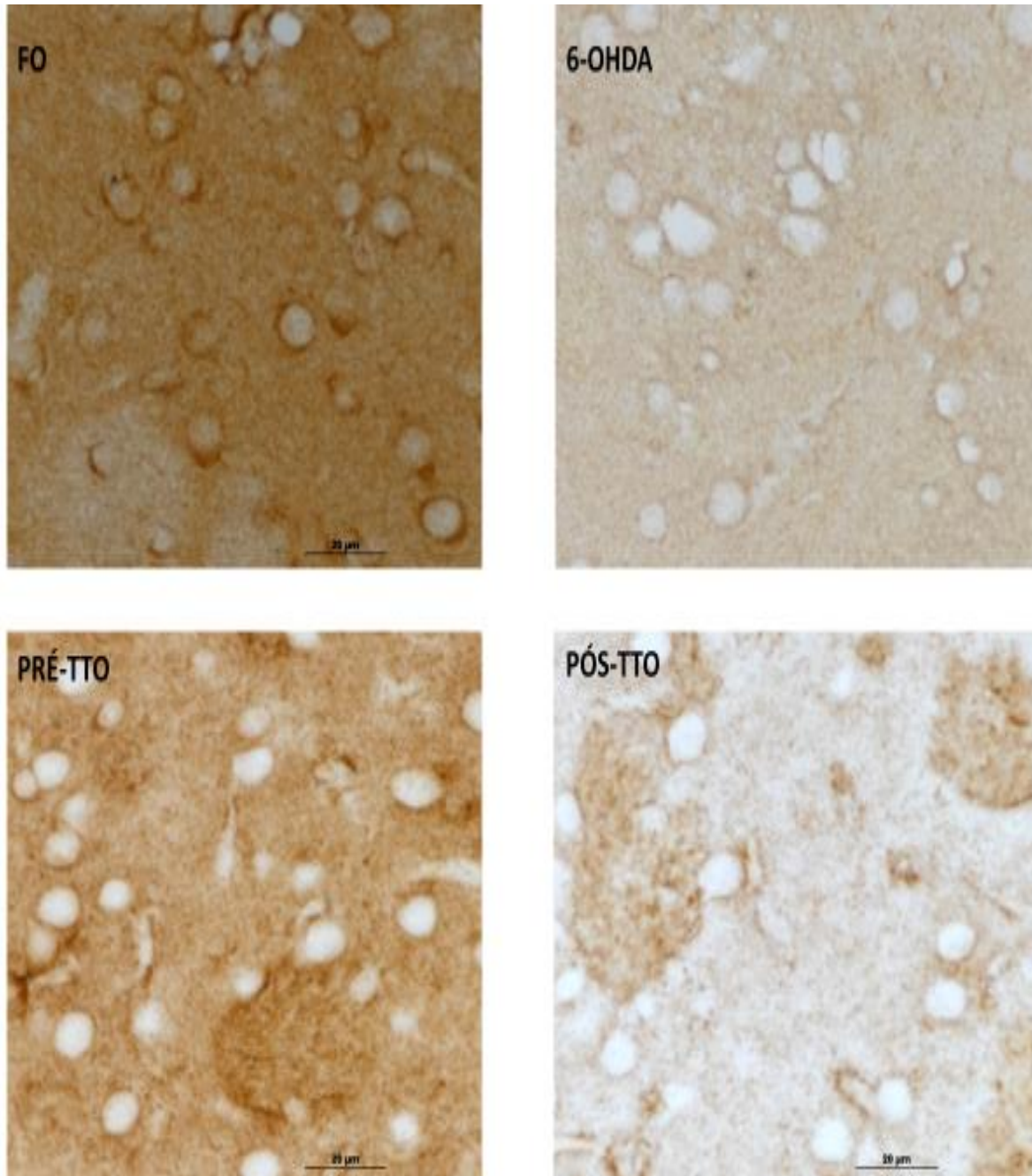


Os valores foram expressos como média  $\pm$  EPM (n=3). a vs FO, b vs 6-OHDA e c vs PRÉ-TTO,  $p < 0,05$  (ANOVA e teste Student-Newman-Keul).

#### 4.4.3. Efeito da suplementação com vitamina D sobre a imunorreatividade para a DAT no corpo estriado de ratos lesionados com 6-OHDA

Como evidenciado na **figura 29 e 30** o grupo 6-OHDA apresentou intensa redução na imunorreatividade para DAT quando contraposto aos animais FO demonstrando novamente o potencial neurodegenerativo desta toxina. Todavia tanto o PRÉ-TTO como o PÓS-TTO com vitamina D foram operativos no aumento da imunorreatividade para DAT. Faz-se indispensável salientar a diferença expressiva na imunomarcção entre o PRÉ-TTO e o PÓS-TTO (**figura 29-30**).

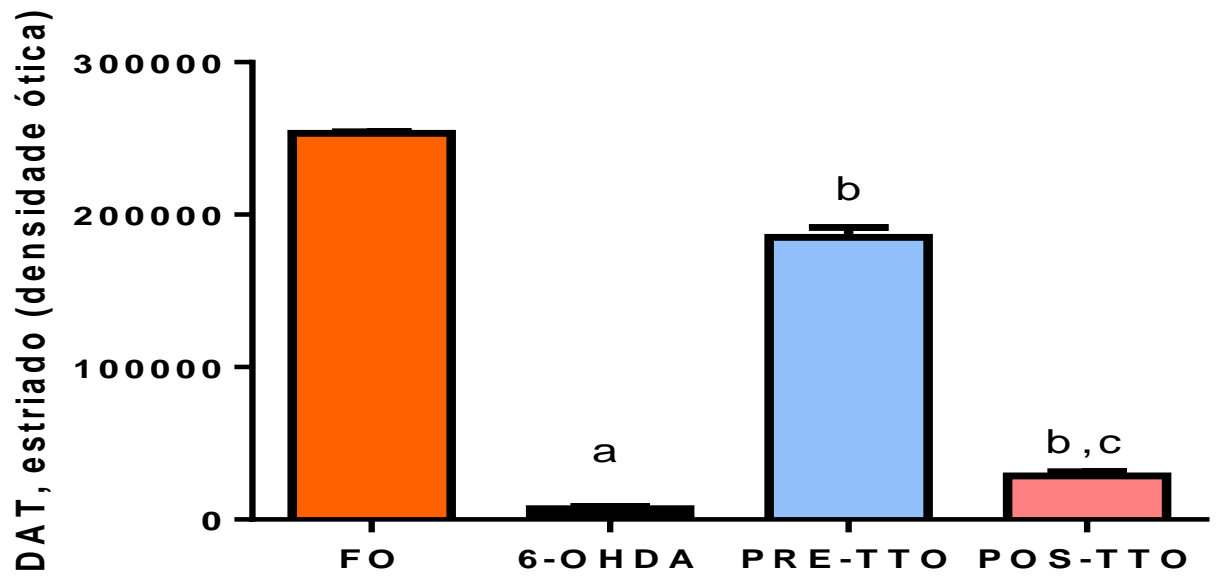
**Figura 29: Fotomicrografia representativas de neurônios imunorreativos para DAT no estriado direito (lesionado) de ratos submetidos a lesão estriatal com 6-OHDA.**



Coloração marrom representa células imunorreativas a DAT ao longo do estriado.



Figura 30: Efeito da suplementação com VIT D sobre a quantificação da imunomarcação para DAT no estriado direito (CED) de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA



Os valores foram expressos como média  $\pm$  EPM (n=3). a vs FO, b vs 6-OHDA e c vs PRÉ-TTO,  $p < 0,05$  (ANOVA e teste Student-Newman-Keul).

## 5. DISCUSSÃO

Na presente pesquisa avaliamos de modo comparativo o efeito neuroprotetor preventivo e terapêutico da suplementação com vitamina D sobre alterações comportamentais, neuroquímicas e imunohistopatológicas em modelo experimental de DP induzida por 6-OHDA.

Evidências científicas demonstram que os sintomas motores da DP se tornam evidentes quando a degeneração da via nigroestriatal excede 50%, o que acarreta uma redução de aproximadamente 70% da dopamina liberada no estriado. De acordo com Li e colaboradores (2010), a neurotoxina 6-OHDA promove o surgimento de déficits motores como consequência da depleção dopaminérgica, de maneira similar à hipocinesia que ocorre em humanos (DEUMENS et al., 2002).

Os resultados obtidos na presente pesquisa demonstram que a lesão por 6-OHDA desencadeou sensível hipolocomoção horizontal e vertical, ao passo que a prévia suplementação com vitamina D resultou em restauração da atividade motora em ambos os casos. Salienta-se ainda que o pós-tratamento promoveu restauração da atividade exploratória vertical. Por conseguinte, nossos resultados apresentam-se em congruência com os encontrados por Wang e colaboradores (2001) que também verificaram que o pré-tratamento com a vitamina D3 (metabólito ativo) aumentou a atividade locomotora e melhora da exploração vertical em animais parkinsonianos, sendo efetivo em atenuar a hipocinesia induzida por 6-OHDA.

Outro parâmetro avaliado no teste de campo aberto foi o comportamento de autolimpeza dos animais, verificando-se que todos os animais lesionados apresentaram redução desse comportamento, sendo a suplementação capaz de melhorar o *grooming*, porém não sendo suficiente para apresentar diferença estatística.

Embora o teste de campo aberto venha sendo utilizado na maioria dos estudos de neuroproteção para avaliar o comportamento motor, este procedimento foi desenvolvido por Hall (1934) com intuito de analisar comportamentos como medo e ansiedade em ratos, considerando que a diminuição da ambulação seria um indicativo de comportamento ansiolítico (CAROLA et al., 2002; SHOBANA et al., 2012).

Para avaliar o comportamento “tipo depressivo” em roedores se pode utilizar como ferramenta o teste do nado forçado que avalia o desespero emocional dos mesmos, onde o aumento no tempo de flutuação indica um estado emocional negativo. De acordo com Costa et al., (2013), o tempo de natação está relacionado com o sistema serotoninérgico e o tempo de imobilidade com os sistemas dopaminérgico e noradrenérgico (BORSINI; MELI, 1988; COSTA et al., 2013; PETIT-DEMOULIERE et al., 2005).

Ao submeter os animais ao teste de nado forçado se observa que a neurotoxina 6-OHDA promoveu aumento significativo no tempo de imobilização sendo a suplementação com vitamina D capaz de minimizar esse efeito a valores até mesmo inferior ao encontrado no grupo falso operado. Não há na literatura científica relatos neste tipo de análise em modelos animais de DP e a suplementação com vitamina D.

Torna-se indispensável frisar o comportamento atípico encontrado nos animais pertencentes ao grupo VIT D, em que o comportamento destes animais ao serem avaliados no teste de campo aberto e nado forçado apresentaram severa hipolocomoção e elevado tempo de imobilização. Entretanto, como citado anteriormente animais que no teste de campo aberto apresentam menor atividade locomotora podem em princípio estar demonstrando um comportamento de menor ansiedade a ambiente estranho. Paralelamente Kloet e Molendijk (2016) avaliam que o tempo de imobilização encontrado em teste de nado forçado relacionam-se com mecanismos de enfrentamento, adaptação e sobrevivência ao invés de comportamentos tipo depressivo. Em vista disso, pode-se sugerir que a suplementação com vitamina D apresenta ação ansiolítica quando averiguada sobre esta perspectiva.

Utilizado com o objetivo de avaliar o grau de degeneração da via nigroestriatal por meio da estereotipia motora e comportamento rotacional, o teste comportamental por apomorfina (agonista dopaminérgico) é uma referência primordial para a investigações sobre magnitude da morte de neurônios dopaminérgicos (BETARBET et al., 2002).

No presente estudo, os animais submetidos à lesão por 6-OHDA exibiram rotações contralaterais estereotipadas, o que validou o experimento, todavia tanto a suplementação anterior como a posterior a lesão promoveu substancial atenuação no comportamento rotacional, induzido por apomorfina, o que denota um possível efeito neuroprotetor da vitamina D provavelmente mediado pela restauração dos níveis de dopamina no estriado como pode ser comprovado pelo aumento ou restauração dos níveis estriatais de dopamina observados após a suplementação com vitamina D.

Além da restauração no teor de dopamina a suplementação com VIT D também promoveu aumento nos níveis de seus metabólitos, DOPAC e HVA. Apresentando deste modo concordância com os resultados obtidos por Wang et al. (2001), onde a pré-suplementação com vitamina D3 (1µg/kg/dia) foi capaz de suplantiar os níveis de DA, DOPAC e HVA em ratos com lesão por 6-OHDA, e por Smith e colaboradores (2006), que verificou o tratamento crônico com calcitriol (vitamina D3) também promoveu proteção aos níveis de DA estriatal, corroborando ainda mais os achados da presente pesquisa.

Uma vez que os resultados obtidos nos testes comportamentais e na dosagem da concentração de DA e DOPAC sugerem que a suplementação com vitamina D proporciona proteção aos neurônios dopaminérgicos, contra os mecanismos de neurodegeneração desencadeados pela 6-OHDA, fez-se necessário avaliar a possível preservação da morfologia estriatal. Isso deu-se, inicialmente, por meio da avaliação da viabilidade celular pela técnica histológica violeta de cresil, onde de forma contundente averiguou-se que tanto o pré-tratamento como o pós-tratamento foram eficazes na manutenção da citoarquitetura estriatal e sendo ratificada pelos testes imunohistoquímicos para TH e DAT onde novamente a suplementação com vitamina D se mostrou efetiva na neuroproteção contra a 6-OHDA.

Já bem documentado na literatura científica, o estresse oxidativo desempenha papel basilar na patogênese e fisiopatologia da DP, promovendo a perda do potencial de membrana mitocondrial, seguido da liberação do citocromo c para o citosol e na ativação da caspase 3 e 9, apresentando-se desta forma, como elemento chave na prospecção por novos agentes terapêuticos. Dentre os mecanismos de ação

da 6-OHDA o estresse oxidativo promove a produção de radicais superóxido,  $H_2O_2$ , hidroxil e quinonas por meio da sua ação inibitória sobre a cadeia respiratória mitocondrial (DEXTER et al., 1989; EMBORG, 2004; JENNER; OLANOW, 2006; JONES; GO, 2010; HAUSER; HASTINGS, 2013)

Diversas pesquisas evidenciam que a 6-OHDA apresenta efeitos oxidativos sobre múltiplas regiões do cérebro (CPF, cerebelo e HP) demonstrando assim que a destruição progressiva produzida por esta droga pode afetar outras áreas cerebrais e não somente aos neurônios da via nigroestriatal (FERRO, 2007; MATSUMOTO et al., 2011; ZHANG et al., 2011).

Na tentativa de verificar os efeitos benéficos da suplementação com vitamina D em relação à produção excessiva de EROs, realizamos a dosagem de 2 marcadores envolvidos na produção do estresse oxidativo. A partir destas quantificações, observamos que tanto os animais que receberam PRÉ-TTO e PÓS-TTO com vitamina D apresentaram atenuação na expressão dos marcadores de estresse oxidativo, que foram alteradas pela 6-OHDA e que desempenham um papel importante na patogênese da doença humana.

O MDA é um aldeído de cadeia curta, sendo o principal produto da peroxidação lipídica. No presente trabalho, a 6-OHDA promoveu o aumento substancial nas concentrações de MDA no córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado direito ao passo que a tanto o pré-tratamento com o pós-tratamento foram eficazes na redução da peroxidação lipídica em todas as áreas citadas. Pesquisas como as de Erbas et al. (2014) e Wiseman (1993) também evidenciam a redução de MDA por meio da suplementação com VIT D. De acordo com Lin e colaboradores (2002) este pró-hormônio atenua a peroxidação lipídica por meio da interrupção da reação em cadeia deste processo.

O óxido nítrico (NO) tem sido estudado em várias áreas das ciências e é reconhecido como uma importante molécula de sinalização em várias vias celulares. No entanto, devido a capacidade deste de produzir espécies reativas altamente prejudiciais que induzem ao desequilíbrio oxidativo ou nitrosativo, altas concentrações de NO são extremamente tóxica e apresenta papel importante nas doenças

neurodegenerativas. Estudos demonstram que o óxido nítrico (NO) apresenta alto potencial neurotóxico causando danos ao DNA, disfunção mitocondrial e alterações na estrutura de proteínas. Na DP, por exemplo, a neurodegeneração dopaminérgica, ativa as células microgliais aumentando a produção de NO, desencadeando um feedback positivo e promovendo a diminuição do potencial redox neuronal (DIAS; JUNN; MOURADIAN, 2013; ZHANG; DAWSON; DAWSON, 2006; TEGAN; MORAIS, 2017; VASUDEVAN et al., 2016).

A molécula de óxido nítrico pode ser quantificada de maneira indireta através da dosagem de seu metabólito nitrito/nitrato. Em nossa pesquisa averiguamos que a 6-OHDA intensificou a produção de nitrito/nitrato no córtex pré-frontal, hipocampo, corpo estriado direito e corpo estriado esquerdo ao passo que a suplementação com vitamina D foi eficaz em limitar a produção de nitrito/nitrato. Corroboram nossos achados, diferentes pesquisas evidenciaram que a vitamina D atenua a síntese de NO (DURZUN et al. 2013).

Atuando como um antioxidante de membrana e apresentando potencial antioxidante maior que a vitamina E e a melanina, a vitamina D, se apresenta como um importante antioxidante exógeno. Todavia, salienta-se que a redução do estresse oxidativo não se atem somente a redução do NO e da peroxidação lipídica, como apresentado nesta pesquisa, pois este pró-hormônio atua também nos sistemas antioxidantes endógenos tais como glutatona e superóxido desmutase (BAO et al., 2008; GAGO-DOMINGUEZ; JIANG; CASTELAO, 2007 SARDAR; CHAKRABORTY; CHATTERJEE, 1997).

Mediante o exposto, observa-se que a vitamina D se mostrou eficaz na redução da neurodegeneração mediada pela lesão unilateral de 6-OHDA por meio de mecanismos que envolvem sua atividade antioxidante. Evidenciando, deste modo, a importância clínica da suplementação como um possível novo agente terapêutico da DP.

## 6. CONCLUSÃO

- PRÉ-TTO e PÓS-TTO com vitamina D atenuaram a estereotipia motora e comportamento rotacional induzido por apomorfina em animais submetidos a modelo de DP por 6-OHDA;
- O grupo 6-OHDA apresentou comportamento tipo depressivo que foi revertido tanto pelo PRÉ-TTO e PÓS-TTO com vitamina D;
- Os animais pertencentes ao grupo VIT D apresentaram comportamentos tipo ansiolítico;
- O PRÉ-TTO e o PÓS-TTO com vitamina D foram eficazes na restauração da concentração estriatais de DA, DOPAC e HVA após lesão por 6-OHDA;
- A suplementação com vitamina D foi efetiva na redução dos níveis de nitrito/nitrato e MDA no CPF, HP e CED após lesão estriatal unilateral por 6-OHDA;
- O PRÉ-TTO e o PÓS-TTO com vitamina D promoveu a manutenção da citoarquitetura estriatal;
- O PRÉ-TTO e o PÓS-TTO com vitamina D aumentou a imunorreatividade para TH;
- O PRÉ-TTO com vitamina D aumentou a imunorreatividade para DAT.

## **7. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

A ação neuroprotetora observada pela suplementação com VD pode ser, comprovadamente, atribuída aos mecanismos antioxidantes. À medida que esta pode estar atrelados à redução de espécies reativas do oxigênio e nitrogênio, atenuação da disfunção mitocondrial, do processo neuroinflamatório e dos mecanismos pró-apoptóticos. Salienta-se ainda que, a preservação da citoarquitetura estriatal diminui a depleção dopaminérgica. Diante do exposto, podemos propor que a vitamina D é uma substância promissora a ser explorada como agente neuroprotetor e uma possível ferramenta terapia, adjuvante, para doença de Parkinson.



## REFERÊNCIAS

- ABELIOVICH, A ; GITLER, A.D. Defects in trafficking bridge Parkinson's disease pathology and genetics. **Nature.**, 539:207-16, 2016.
- ABOU-RAYA, S.; HELMII, M.; ABOU-RAYA, A. Bone and mineral metabolism in older adults with Parkinson's disease. **Age Ageing**, 38:675-680, 2009.
- AGUIAR, L.M.; NOBRE, H.V. JR.; MACÊDO, D.S.; OLIVEIRA, A.A.; FREITAS, R.M.; VASCONCELOS, S.M.; CUNHA, G.M.; SOUSA, F.C.; VIANA, G.S. Neuroprotective effects of caffeine in the model of 6-hydroxydopamine lesion in rats. **Pharmacol Biochem Behav**, 84(3): 415-419, 2006.
- ANNWEILER, C.; DURSUN, E.; FÉRON, F.; GEZEN-AK, D.; KALUEFF, A.V.; LITTLEJOHNS, T.; LLEWELLYN, D.J.; MILLET, P.; SCOTT, T.; TUCKER, K.L.; YILMAZER, S.; BEAUCHET, O. 'Vitamin D and cognition in older adults': updated international recommendations (Review). **J Intern Med**, 277(1): 45–57, 2015.
- ANSARI, K.N. The free radicals--the hidden culprits--an update. **Indian J Med Sci**, 51(9):319-36, 1997.
- ASEMI, Z.; HASHEMI, T.; KARAMALI, M.; SAMIMI, M.; ESMAILZADEH, A. Effects of vitamin D supplementation on glucose metabolism, lipid concentrations, inflammation, and oxidative stress in gestational diabetes: a double-blind randomized controlled clinical trial. **Am J Clin Nutr**, 98(6):1425–1432, 2013.
- BAKSI, S.N.; HUGHES, M.J. Chronic vitamin D deficiency in the weanling rat alters catecholamine metabolism in the cortex. **Brain Res**, 242(2):387-90, 1982.
- BALION, C.; GRIFFITH, L.E.; STRIFLER, L.; HENDERSON, M.; PATTERSON, C.; HECKMAN, G.; LLEWELLYN, D.J.; RAINA, P. Vitamin D, cognition, and dementia: A systematic review and meta-analysis. **Neurology**, 79(13):1397–1405, 2012.
- BANDEIRA, F.; GRIZ, L.; FREESE, E.; LIMA, D.C.; THÉ, A.C.; DINIZ, E.T. et al. Vitamin D deficiency and its relationship with bone mineral density among postmenopausal women living in the tropics. **Arq Bras Endocrinol Metabol.**,54(2):227-32, 2010.
- BAO, B.Y.; TING, H.J.; HSU, J.W.; LEE, Y.F. Protective role of 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 against oxidative stress in nonmalignant human prostate epithelial cells. **Int. J. Cancer**, 122(12): 2699–2706, 2008.
- BELLISSIMO, M.I.; KOUZMINE, I.; FERRO, M.M.; OLIVEIRA, B.H.; CANTERAS, N.N. Is the unilateral lesion of the left substantia nigra pars compacta sufficient to induce working memory impairment in rats? **Neurobiol. Learn. Mem.**, 82(2),150–8, 2007.

- BETARBET, R.; SHERER, T.B.; DI MONTE, D.A.; GREENAMYRE, J.T. Mechanistic approaches to Parkinson's disease pathogenesis. **Brain Pathol**, 12(4): 499-510, 2002.
- BITTENCOURT, J. C. **Métodos em Neurociências**. Ed. Roca, 271, 2007.
- BORSINI, F.; MELI, A. Is the forced swimming test a suitable model for revealing antidepressant activity? **Psychopharmacology (Berl)** 94(2): 147-160, 1988.
- BOSE, A.; BEAL, M. F. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. **J. Neurochem**, 1:216-31, 2016. doi: 10.1111/jnc.13731.
- BOUILLON. R.; CARMELIET, G.; VERLINDEN, L.; VAN ETTEN, E.; VERSTUYF, A.; LUDERER, H.F. et al. Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice. **Endocr Rev**. 29(6):726-76, 2008.
- BOVE, J.; PERIER, C. Neurotoxin-based models of Parkinson's disease. **Neuroscience**, 211:51–76, 2012. doi:10.1016/j.neuroscience.2011.10.057.
- BRAAK, H.; RÜB, U.; GAI, W. P.; DEL TREDICI, K. Idiopathic Parkinson's disease: possible routes by which vulnerable neuronal types may be subject to neuroinvasion by an unknown pathogen. **J. Neural. Transm**, 110(5), 517–536, 2003.
- BROADHURST, P. L. Determinants of emotionality in the rat. I. Situational factors. **Br J Psychol**, 48(1): 1-12, 1957.
- CAMPUZANO, O.; CASTILLO-RUIZ, M. M.; ACARIN, L.; CASTELLANO, B.; GONZALEZ, B. Increased levels of proinflammatory cytokines in the aged rat brain attenuate injury-induced cytokine response after excitotoxic damage. **J. Neurosci. Res**, 87(11), 2484–2497, 2009. doi: 10.1002/jnr.22074
- CANTUTI-CASTELVETRI, I.; SHUKITT-HALE, B.; JOSEPH, J. A. Dopamine neurotoxicity: age-dependent behavioral and histological effects. **Neurobiol. Aging**, 24(5), 697–706, 2003.
- CAROLA, V.; D'OLIMPIO, F.; BRUNAMONTI, E.; MANGIA, F.; RENZI, P. Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behaviour in inbred mice. **Behav Brain Res**, 134(1-2): 49-57, 2002.
- CARVEY, P. M.; PUNATI, A.; NEWMAN, M. B. Progressive dopamine neuron loss in Parkinson's disease: the multiple hit hypothesis. **Cell Transplant**, 15(3): 239–250, 2006.

- CASS, W.A.; PETERS, L.E.; FLETCHER, A.M.; YUREK, D.M. Calcitriol promotes augmented dopamine release in the lesioned striatum of 6-hydroxydopamine treated rats. **Neurochemical research.**, 39(8):1467-76, 2014. doi:10.1007/s11064-014-1331-1.
- CAUDLE, W.M.; RICHARDSON, J.R.; WANG, M.Z.; TAYLOR, T.N.; GUILLOT, T.S.; MCCORMACK, A.L.; COLEBROOKE, R.E.; DI MONTE, D.A.; EMSON, P.C.; MILLER, G.W. Reduced vesicular storage of dopamine causes progressive nigrostriatal neurodegeneration. **J. Neurosci.** 27(3):8138–48, 2007.
- CHINTA, S. J.; LIEU, C. A.; DEMARIA, M.; LABERGE, R. M.; CAMPISI, J.; ANDERSEN, J. K. Environmental stress, ageing and glial cell senescence: a novel mechanistic link to Parkinson's disease? **J. Intern. Med.**, 273(5):429–36, 2013. doi: 10.1111/joim.12029
- CHONG, Z.Z.; SHANG, Y.C.; WANG, S.; MAIESE, K. SIRT1: new avenues of discovery for disorders of oxidative stress. **Expert Opin Ther Targets.**, 16(2):167–78, 2012.
- CHOONG, C.; MOCHIZUKI, H. Gene therapy targeting mitochondrial pathway in Parkinson's disease. **J Neural Transm**, 2016. doi:10.1007/s00702-016-1616-4
- CHRISTAKOS,S.; DHAWAN, P.; VERSTUYF, A.; VERLINDEN, L.; CARMELIET, G. Vitamin D: metabolism, molecular mechanism of action, and pleiotropic effects. **Physiol Ver.**, 96:365–408, 2016. DOI:10.1152/physrev.00014.2015.
- CHUN, R.F.; PEERCY, B.E.; ORWOLL, E.S.; NIELSON, C.M.; ADAMS, J.S.; HEWISON, M. Vitamin D and DBP: the free hormone hypothesis revisited. **J Steroid Biochem Mol Biol**, 144:132–137, 2014.
- COLLIER, T.; KANAAN, N.; KORDOWER, J. Ageing as a primary risk factor for Parkinson's disease: evidence from studies of non-human primates. **Nat. Rev. Neurosci.**, 12(6):359–66, 2011. doi: 10.1038/nrn3039.
- COSTA, A.P.R.; VIEIRA, C.; BOHNER, L.O.L.; SILVA, C.F.; SANTOS, E.C.S.; DE LIMA, T.C.M.; LINODE-OLIVEIRA, C. A proposal for refining the forced swim test in Swiss mice. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, 45:150–55, 2013. doi: 10.1016/j.pnpbp.2013.05.002.
- DE LAU, L.M.L.; M.M.B. BRETELER. Epidemiology of Parkinson's disease. **Lancet Neurol**, 5(6): 525–35, 2006. DOI:10.1016/S1474-4422(06)70471-9
- DEN HARTOG JAGER, W.A.; BETHLEM, J. The distribution of Lewy bodies in the central and autonomic nervous systems in idiopathic paralysis agitans. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, 23:283–90, 1960.

DEUMENS, R.; BLOKLAND, A.; PRICKAERTS, J. Modeling Parkinson's disease in rats: an evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. Review. **Exp Neuro**, 175(2): 303-17, 2002.

DEXTER, D.T.; WELLS, F.R.; LEES, A.J.; AGID, F.; AGID, Y.; JENNER, P.; MARSDEN, C.D. Increased nigral iron content and alterations in other metal ions occurring in brain in Parkinson's disease. **J Neurochem.**, 52(6): 1830–36, 1989.

DIAS, V.; JUNN, E.; MOURADIAN, M.M. The role of oxidative stress in Parkinson's disease. **J. Parkinsons Dis.**, 3(4):461–91, 2013. doi:10.3233/JPD-130230

DING, H.; DHIMA, K.; LOCKHART, K.C.; LOCASCIO, J.J.; HOESING, A.N.; DUONG, K.; SCHERZER, C. R. Unrecognized vitamin D<sub>3</sub> deficiency is common in Parkinson disease: Harvard Biomarker Study. **Neurology**, 81(17):1531–7, 2013. doi.org/10.1212/WNL.0b013e3182a95818

DRAPER, H.H.; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. **Methods Enzymol.**, 186:421-31, 1990.

DOROUDI, M.; SCHWARTZ, Z.; BOYAN, B.D. Membrane-mediated actions of 1,25-dihydroxy vitamin D<sub>3</sub>: A review of the roles of phospholipase A<sub>2</sub> activating protein and Ca<sup>(2+)</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.**, 147:81–84, 2015. doi: 10.1016/j.jsbmb.2014.11.002.

DURK, M.R.; CHAN, G.N.; CAMPOS, C.R.; PEART, J.C.; CHOW, E.C.; LEE, E.; CANNON, R.E.; BENDAYAN, R.; MILLER, D.S.; PANG, K.S. 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-liganded vitamin D receptor increases expression and transport activity of P-glycoprotein in isolated rat brain capillaries and human and rat brain microvessel endothelial cells. **J Neurochem.**, 123:944-953, 2012.

DURSUN, E.; GEZEN-AK, D.; YILMAZER, S. Beta amyloid suppresses the expression of the vitamin d receptor gene and induces the expression of the vitamin d catabolic enzyme gene in hippocampal neurons. **Dement Geriatr Cogn Disord.**, 36:76-86, 2013.

EMBORG, M. E. Evaluation of animal models of Parkinson's disease for neuroprotective strategies. **J Neurosci Met.**, 139(2):121–43, 2004. DOI:10.1016/j.jneumeth.2004.08.004

ERBAŞA, O.; VOLKAN, S.; DÜRDANE, A.; ALTUĞ, Y.; MUSTAFA, S.; DILEK, T. Cholecalciferol (vitamin D<sub>3</sub>) improves cognitive dysfunction and reduces inflammation in a rat fatty liver model of metabolic syndrome. **Life Sciences.**, 103(2): 68–72, 2014. doi.org/10.1016/j.lfs.2014.03.035

EVATT, M.L.; DELONG, M.R.; KUMARI, M.; AUINGER, P.; MCDERMOTT, M.P.; TANGPRICHA, V. High Prevalence of Hypovitaminosis D Status in Patients With Early Parkinson Disease. **Arch Neurol.**, 68(3):314-319, 2011. doi:10.1001/archneurol.2011.30

EYLES, D.W.; BURNE, T.H.; MCGRATH, J.J. Vitamin D, effects on brain development, adult brain function and the links between low levels of vitamin D and neuropsychiatric disease. **Front Neuroendocrinol.**, 34:47–64, 2013.

EYLES, D.W.; SMITH, S.; KINOBE, R.; HEWISON, M.; MCGRATH, J.J. Distribution of the vitamin D receptor and 1 alpha hydroxylase in human brain. **J Chem Neuroanat.**, 29: 21-30, 2005

FERRO, M.M. **Caracterização neuroquímica e comportamental da lesão da via nigroestriatal com 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (mptp) e 6-hidroxiDA (6-ohda) em ratos.** Tese (Doutorado em Bioquímica). Universidade Federal do Paraná, 2007.

FISONE, G.; BEZARD, E. Molecular mechanisms of L-DOPA-induced dyskinesia. **Int Rev Neurobiol.**, 98:95-122, 2011. doi: 10.1016/B978-0-12-381328-2.00004-3.

FRANCO-IBORRA, S.; VILA, M.; PERIER, C. The Parkinson disease mitochondrial hypothesis: where are we at? **Neuroscientist**, 22(3): 266–77, 2016. doi: 10.1177/1073858415574600.

GABALLAH, H.H.; ZAKARIA, S.S.; ELBATSH, M.M.; TAHOON, N.M. Modulatory effects of resveratrol on endoplasmic reticulum stress-associated apoptosis and oxido-inflammatory markers in a rat model of rotenone-induced Parkinson's disease. **Chem Biol Interact.**, 5,251:10-6, 2016. doi: 10.1016/j.cbi.2016.03.023.

GAGO-DOMINGUEZ, M.; JIANG, X.; CASTELAO, J.E. Lipid peroxidation, oxidative stress genes and dietary factors in breast cancer protection: a hypothesis. **Breast Cancer Res.**, 9(1), 201, 2007.

GARCION, E.; WION-BARBOT, N.; MONTERO-MENEI, C.N.; BERGER, F.; WION, D. New clues about vitamin D functions in the nervous system. **Trends Endocrinol Metab.**, 13(3):100-5, 2002.

GARLAND, C.F.; GARLAND, F.C.; GORHAM, E.D., et al. The Role of Vitamin D in Cancer Prevention. **Am J Public Health.**, 96(2):252-61, 2006. doi:10.2105/AJPH.2004.045260.

GATTO, N.M.; SINSHEIMER, J.S.; COCKBURN, M.; ESCOBEDO, L.A.; BORDELON, Y.; RITZ, B. Vitamin D receptor gene polymorphisms and Parkinson's disease in a population with high ultraviolet radiation exposure. *Journal of the Neurological Sciences*, 352(1–2):88–93, 2015. doi:10.1016/j.jns.2015.03.043

GOEDERT, M.; SPILLANTINI, M.G.; DEL TREDICI, K.; BRAAK, H. 100 years of Lewy pathology. **Nat Rev Neurol.**, 9(1):13–24, 2012. doi: 10.1038/nrneurol.2012.242.

GONZALEZ-HERNANDEZ, T.; BARROSO-CHINEA, P.; DE LA CRUZ MUROS, I.; DEL MAR PEREZ-DELGADO, M.; RODRIGUEZ, M. Expression of dopamine and vesicular monoamine transporters and differential vulnerability of mesostriatal dopaminergic neurons. **J. Comp. Neurol.**, 479:198–215, 2004.

GRANT, W.B.; GARLAND, C.F.; GORHAM, E.D. An estimate of cancer mortality rate reductions in Europe and the US with 1,000 IU of oral vitamin D per day. **Recent Results Cancer Res**, 174:225-34, 2007.

GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. **Anal Biochem.**, 126(1):131-38, 1982.

GÜZEY, C.; ALLARD, P.; BRÄNNSTRÖM, T.; SPIGSET, O. Radioligand binding to brain dopamine and serotonin receptors and transporters in Parkinson's disease: relation to gene polymorphisms. **Int. J. Neurosci.**, 122(3):124–32, 2012. doi: 10.3109/00207454.2011.631716.

HADDAD, D.; NAKAMURA, K. Understanding the susceptibility of dopamine neurons to mitochondrial stressors in Parkinson's disease, **FEBS Letter**, 589 (24 Pt A):3702-13,2015. doi: 10.1016/j.febslet.2015.10.021

HALL, C.S. Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. **J Comp Psychol.**, 18(3): 385-403, 1934.

HALLIDAY, G.M.; STEVENS, C.H. Glia: initiators and progressors of pathology in Parkinson's disease. **Mov. Disord.**, 26:6–17, 2011. doi:10.1002/mds.23455

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. **Method Enzymol.**, 186:1–85, 1990.

HAUSER, D.N.; HASTINGS, T.G. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease and monogenic parkinsonism. **Neurobiol Dis.**, 51:35-42, 2013. doi:10.1016/j.nbd.2012.10.011.

HEIM, C.; KOLASIEWICZ, W.; KURZ, T.; SONTAG, K.H. Behavioral alterations after unilateral 6-hydroxydopamine lesions of the striatum. effect of  $\alpha$ -tocopherol. **Pol. J. Pharmacol.**, 53:435–48, 2001.

HESS, A.F.; On the induction of antirachitic properties in rations by exposure to light. **Science**, 60:269, 1924

HETZ, C.; MOLLEREAU, B. Disturbance of endoplasmic reticulum proteostasis in neurodegenerative diseases. **Nat. Rev. Neurosci.**, 15(4):233–49, 2014.

HOLICK, M.F. Vitamin D deficiency. **N Engl J Med.**, 357:266–81, 2007.

HOLICK, M. F. Vitamin D and brain health: the need for vitamin D supplementation and sensible sun exposure. **J Intern Med.**, 277:90–3, 2015. doi:10.1111/joim.12308

HUOT, P.; JOHNSTON, T.H.; KOPRICH, J.B.; FOX, S.H.; BROTCHE, J.M. The pharmacology of L-DOPA-induced dyskinesia in Parkinson's disease. **Pharmacol Ver.**, 65:171–22, 2013. DOI: 10.1124/pr.111.005678

HUME, E.M.; SMITH, H.H. The effect of irradiation of the environment with ultra-violet light upon the growth and calcification of rats, fed on a diet deficient in fatsoluble vitamins. The part played by irradiated sawdust. **Biochem J.**, 18:1334-1348, 1924.

IBI, M.; SAWADA, H.; NAKANISHI, M.; KUME, T.; KATSUKI, H.; KANEKO, S.; SHIMOHAMA, S.; AKAIKE, A. Protective effects of 1 alpha,25-(OH)(2)D(3) against the neurotoxicity of glutamate and reactive oxygen species in mesencephalic culture. **Neuropharmacology**, 40(6):761-71, 2001.

IWANAGA, K.; K. WAKABAYASHI, M.; YOSHIMOTO, I.; TOMITA, H.; SATOH, H.; TAKASHIMA, H. Lewy body-type degeneration in cardiac plexus in Parkinson's and incidental Lewy body diseases. **Neurology**, 52(6):1269–71, 1999.

JENNER, P.; OLANOW, C.W. The pathogenesis of cell death in Parkinson's disease. **Neurology**, 66:S24–S36, 2006.

JONES, D.P.; GO, Y.M. Redox compartmentalization and cellular stress. **Diabetes Obes. Metab.**, 12:116–25, 2010.

JOSHI, S.; PANTALENA, L.C.; LIU, X.K.; GAFFEN, S.L.; LIU, H.; ROHOWSKY-KOCHAN, C.; ICHIYAMA, K.; YOSHIMURA, A.; STEINMAN, L.; CHRISTAKOS, S.; YOUSSEF, S. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 ameliorates Th17 autoimmunity via transcriptional modulation of interleukin-17A. **Mol Cell Biol.**, 31:3653–69, 2011.

KALIA, L.V.; LANG, A.E. Parkinson's disease. **Lancet**, 6736(9996): 1–17, 2015. doi: 10.1016/S0140-6736(14)61393-3.

KANG, S.Y.; PARK, S.; OH, E.; PARK, J.; YOUN, J.; KIM, J.S.; KIM, J.U.; JANG, W. Vitamin D receptor polymorphisms and Parkinson's disease in a Korean population: Revisited. **Neurosci Lett.**, 628:230-5, 2016. doi: 10.1016/j.neulet.2016.06.041

KANNURPATTI, S.S.; JOSHI, P.G.; JOSHI, N.B. Calcium sequestering ability of mitochondria modulates influx of calcium through glutamate receptor channel. **Neurochem Res.**, 25:1527–36, 2000.

KASTNER, A.; HIRSCH, E.C.; AGID, Y.; JAVOY-AGID, F. Tyrosine hydroxylase protein and messenger RNA in the dopaminergic nigral neurons of patients with Parkinson's disease. **Brain Res.**, 606, 341–5, 1993.

KENBORG, L.; LASSEN, C.F.; RITZ, B, et al Outdoor work and risk for Parkinson's disease: a population-based case–control study; **J Occup Environ Med.**, 68:273-8, 2011.

KIM, M.; NA, W.; SOHN, C. Correlation between vitamin D and cardiovascular disease predictors in overweight and obese Koreans. **J Clin Biochem Nutr.**, 52:167–71, 2013.

KLOET, E.R.; MOLENDIJK, M. L. Coping with the Forced Swim Stressor: Towards Understanding an Adaptive Mechanism. **Neural Plast.**, 6503162, 2016. doi: 10.1155/2016/6503162

KNEKT, P.; KILKKINEN, A.; RISSANEN, H.; MARNIEMI, J.; SÄÄKSJÄRVI, K.; HELIÖVAARA, M. Serum vitamin D and the risk of Parkinson's disease. **Archives of neurology**, 67(7):808-811, 2010. doi:10.1001/archneurol.2010.120.

KOWAL, S.L.; DALL, T.M.; CHAKRABARTI, R.; STORM, M.V.; JAIN, A. The current and projected economic burden of Parkinson's disease in the United States. **Mov. Disord.**, 28: 311–18, 2013.

KRAVIETZ, A.; KAB, S.; WALD, L.; DUGRAVOT, A.; SINGH-MANOUX, A.; MOISAN, F.; ELBAZ, A. Association of UV radiation with Parkinson disease incidence: A nationwide French ecologic study. **Environ Res J.**, 154:50-6, 2017. doi.org/10.1016/j.envres.2016.12.008.

KUPERSHMIDT, L.; OKUN, Z.; AMIT, T.; MANDEL, S.; SALTSMAN, I.; MAHAMMED, A.; BAR-AM, O.; GROSS, Z.; YODIM, M.B. Metalloporphyrins as cytoprotective agents against oxidative and nitrosative stress in cellular models of neurodegeneration. **J Neurochem.**, 113:363–73, 2010.

KUPFERSCHMIDT, K. Uncertain verdict as vitamin D goes on trial. **Science**, 337:1476–1478, 2012.

LANDEL, V; ANNWEILER, C; MILLETA, P; MORELLO, M; FERON, F. Vitamin D, Cognition and Alzheimer's Disease: The Therapeutic Benefit is in the D-Tails. **J Alzh Disease**, 53:419–444, 2016. DOI 10.3233/JAD-150943



LERLER, A.; BAGIC, A. Olfactory pathogenesis of idiopathic Parkinson disease revisited. **Mov Disord.**, 23:1076–84, 2008.

LESAGE, S.; BRICE, A. Parkinson's disease: from monogenic forms to genetic susceptibility factors. **Hum Mol Genet.**, 18:48–59, 2009.

LEVY, N.; MELAMED, E.; OFFEN, D. Apoptosis and Parkinson's disease. **Prog. Neuropsychopharmacol.**, 27: 245-50, 2003.

LI, CR.; HUANG, G.; SUI, Z.Y.; HAN, E.; CHUNG, Y. Effects of 6-hydroxydopamine lesioning of the medial prefrontal cortex on social interactions in adolescent and adult rats. **Brain Research.**, 1346:183-6, 2010.

LIN, R.; NAGAI, Y.; SLADEK, R.; BASTIEN, Y.; HO, J.; PETRECCA, K. Expression profiling in squamous carcinoma cells reveals pleiotropic effects of vitamin D3 analog EB1089 signaling on cell proliferation, differentiation, and immune system regulation. **Mol. Endocrinol.**, 16:1243–1256, 2002. DOI:10.1210/mend.16.6.0874

LV, Z et al.. Vitamin D status and Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. **Neurol Sci.**, 35(11):1723-30, 2014.

MAEDA, S.S. **Análise dos fatores determinantes para as concentrações de 25-hidroxi-vitamina D em diferentes populações da cidade de São Paulo: the São Paulo Vitamin D Evaluatio Study (SPADES)**. Tese de doutorado. Universidade Federal de São Paulo. 2010.

MARGOLIS, R.N.; CHRISTAKOS, S. The nuclear receptor superfamily of steroid hormones and vitamin D gene regulation. An update. **Ann NY Acad Sci.**, 1192:208–14, 2010.

MATSUMOTO Y, MURAKAMI H, HATTORI N, YOSHIMOTO K, ASANO S, INDEN M. Excessive expression of hippocampal ezrin is induced by intrastriatal injection of 6-OHDA. **Biol Pharm Bull.**, 34(11):1753-58, 2011.

MENEGAZ, D.; MIZWICKI, M.T.; BARRIENTOS-DURAN, A.; CHEN, N.; HENRY, H.L.; NORMAN, A.W. Vitamin D receptor (VDR) regulation of voltage-gated chloride channels by ligands preferring a VDR-alternative pocket (VDR-AP). **Mol. Endocrinol.**, 25:1289–1300, 2011.

MILLER, D.B.; O'CALLAGHAN J.P. Biomarkers of Parkinson's disease: Present and future. **Metabolism.**, 64:S40–S46, 2015. doi: 10.1016/j.metabol.2014.10.030.

MILLET, P.; LANDEL, V.; VIRARD, I.; MORELLO, M.; FÉRON, F. Role of vitamin D in the physiopathology of neurodegenerative diseases. **Biol Aujourd'hui.**, 208(1):77-88, 2014.

MITHAL, A.; WAHL, D.A.; BONJOUR, J.P. et al. Global vitamin D status and determinants of hypovitaminosis D. **Osteoporos Int.**, 20:1807–20, 2009.

MORAIS, V.A.; HADDAD, D.; CRAESSAERTS, K.; DE BOCK, P.J.; SWERTS, J.; VILAIN, S.; AERTS, L.; OVERBERGH, L.; GRUNEWALD, A.; SEIBLER, P. PINK1 loss-of-function mutations affect mitochondrial complex I activity via NdufA10 ubiquinone uncoupling. **Science**, 344(6180):203–7, 2014. doi: 10.1126/science.1249161.

MORALES, I.; SABATE, M.; RODRIGUEZ, M. Striatal glutamate induces retrograde excitotoxicity and neuronal degeneration of intralaminar thalamic nuclei: their potential relevance for Parkinson's disease. **Eur. J. Neurosci.**, 38: 2172–82, 2013. doi: 10.1111/ejn.12205

MOSHAROV, E.V. et al. Interplay between cytosolic dopamine, calcium, and alpha-synuclein causes selective death of substantia nigra neurons. **Neuron**, 62:218–229, 2009.

MOSS, J.; BOLAM, J.P. **The relationship between dopaminergic axons and glutamatergic synapses in the striatum: structural considerations.** In: Iversen LL, Iversen SD, Dunnett SB, Björklund A, editors. Dopamine Handbook, New York Oxford University Press, 2010.

NANDHAGOPAL, R.; KURAMOTO, L.; SCHULZER, M.; MAK, E.; CRAGG, J.; MCKENZIE, J.; MCCORMICK, S.; RUTH, T.J.; SOSSI, V.; DE LA FUENTE-FERNANDEZ, R.; STOESSL, A.J. Longitudinal evolution of compensatory changes in striatal dopamine processing in Parkinson's disease. **Brain.**, 134:3290–3298, 2011.

NAIJI, G et al. Effect of vitamin D3 in reducing metabolic and oxidative stress in the liver of streptozotocin-induced diabetic rats. **Br J Nutr.**, 108:1410–8, 2012.

NEVEU, I.; NAVEILHAN, P.; JEHAN, F.; BAUDET, C.; WION, D.; DE LUCA, H.F.; BRACHET, P. 1,25-dihydroxyvitamin D3 regulates the synthesis of nerve growth factor in primary cultures of glial cells. **Brain Res Mol Brain Res.**, 24:70-6, 1994.

NEWMARK, H. L.; NEWMARK, J. Vitamin D and Parkinson's disease—A hypothesis. **Mov. Disord.**, 22:461–8, 2007. doi:10.1002/mds.21317

NIU, M.Y.; WANG, L.; XIE, A.M. Apal, Bsm1, Fok1, and Taq1 Polymorphisms in the Vitamin D Receptor Gene and Parkinson's Disease. **Chin Med J.**, 128(13):1809–14, 2015. <http://doi.org/10.4103/0366-6999.159358>

NORMAN, A.W. Minireview: vitamin D receptor: new assignments for an already busy receptor. **Endocrinology**, 147:5542-8, 2006.

NOYCE, A.J.; BESTWICK, J.P.; SILVEIRA-MORIYAMA, L.; HAWKES, C.H.; GIOVANNONI, G.; LEES, A.J. Meta-analysis of early nonmotor features and risk factors for Parkinson disease. **Ann Neurol.**, 72:893–901, 2012.

OERTEL, W.; SCHULZ, J. B. Current and experimental treatments of Parkinson disease: A guide for neuroscientists. **J. Neurochem.**, 2016. doi:10.1111/jnc.13750

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Anal Biochem.**, 95(2):351-8, 1979.

ORME, R.P.; BHANGAL, M.S.; FRICKER, R.A. Calcitriol Imparts Neuroprotection In Vitro to Midbrain Dopaminergic Neurons by Upregulating GDNF Expression. **PLoS ONE.**, 8(4):e62040, 2013. doi:10.1371/journal.pone.0062040.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates**. 5th edition San Diego: Academic Press, 2005.

PEARCE, S.H.; CHEETHAM, T.D. Diagnosis and management of vitamin D deficiency. **BMJ.**, 340: b5664, 2010.

PERIER, C.; VILA, M. Mitochondrial Biology and Parkinson's Disease. **Cold Spring Harb Perspect Med.**, 2(2):a009332, 2012. doi:10.1101/cshperspect.a009332.

PETERS, B.S.; VERLY, E.JR.; MARCHIONI, D.M.; FISBERG, M.; MARTINI, L.A. The influence of breakfast and dairy products on dietary calcium and vitamin D intake in postpubertal adolescents and young adults. **J Hum Nutr Diet.**, 25:69-74, 2011. DOI: 10.1111/j.1365-277X.2011.01166.x.

PETERSON, A.L.; MANCINI, M.; HORAK, F.B. The relationship between balance control and vitamin D in Parkinson's disease – a pilot study. **Mov Disord.**, 28(8):1133–7, 2013. doi: 10.1002/mds.25405.

PETERSON, A.L. A review of vitamin D and Parkinson's disease. **Maturitas.**, 78:40–4, 2014.

PETIT-DEMOULIERE, B.; CHENU, F.; BOURIN, M. Forced swimming test in mice: a review of antidepressant activity. **Psychopharmacology**, 177(3):245–55, 2005.

POEWE W, ANTONINI A. Novel formulations and modes of delivery of levodopa. **Mov Disord.**, 30(1):114–20, 2015. doi: 10.1002/mds.26078.

POLITIS, M. Neuroimaging in Parkinson disease: from research setting to clinical practice. **Nat Rev Neurol.**, 10(12):708–22, 2014. doi:10.1038/nrneurol.2014.205

PORSOLT, R.D.; ANTON, G.; BLAVET, N.; JALFRE, M. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. **Eur J Pharmacol.**, 47(4): 379-91, 1978.

PREMAOR, M.O.; PALUDO, P.; MANICA, D.; PALUDO, A.P.; ROSSATTO, E.R.; SCALCO, R. et al. Hypovitaminosis D and secondary hyperparathyroidism in resident physicians of general hospital in Southern Brazil. **J Endocrinol Investigation.**, 31(11):991-5, 2008.

RACHAKONDA, V, PAN, T.H.; LE, W.D. Biomarkers of neurodegenerative disorders: How good are they? **Cell Reserch.**, 14(5):349-360, 2004. DOI: 10.1038/sj.cr.7290235.

RIEDEL, O.; BITTERS, D.; AMANN, U.; GARBE, E.; LANGNER, I. Estimating the prevalence of Parkinson's disease (PD) and proportions of patients with associated dementia and depression among the older adults based on secondary claims data. **Int. J. Geriatr. Psychiatry.**, 31:938–943, 2016.

RIMMELZWAAN, L.M.; VAN SCHOOR, N.M.; LIPS, P.; BERENDSE, W.H.; EEKHOFF, E.M. Systematic Review of the Relationship between Vitamin D and Parkinson's Disease. **J. Park. Dis.**, 6:29–37, 2016.

RODRIGUEZ, M.I.; MORALES, C.; RODRIGUEZ-SABATE, A.; SANCHEZ, R.; CASTRO, J.M., et al. The degeneration and replacement of dopamine cells in Parkinson's disease: the role of aging. **Front. Neuroanat.**, 8:1–7, 2014.

RODRÍGUEZ-NOGALES, C.; GARBAYO, E.; CARMONA-ABELLÁN, M.M.; LUQUIN, M.R.; BLANCO-PRIETO, M.J. Brain aging and Parkinson's disease: New therapeutic approaches using drug delivery systems. **Maturitas**, 84:25–31, 2016.

RODRIGUEZ-OROZ, M.C.; JAHANSHAHI, M.; KRACK, P.; LITVAN, I.; MACIAS, R.; BEZARDE, E.; OBESO, J.A. Initial clinical manifestations of Parkinson's disease: features and pathophysiological mechanisms. **Lancet Neurol.**, 8(12):1128–39, 2009.

ROSNER, S.; GILADI, N.; ORR-URTREGER, A. Advances in the genetics of Parkinson's disease. **Acta Pharmacol Sin.**, 29(1):21–34, 2008.

ROSS, A.C.; MANSON, J.E.; ABRAMS, S.A., et al. The 2011 Report on Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D from the Institute of Medicine: What Clinicians Need to Know. **J Clin Endocrinol Metab.**, 96(1):53-8, 2011. doi:10.1210/jc.2010-2704.

SARDAR, S.; CHAKRABORTY, A.; CHATTERJEE, M. Comparative effectiveness of vitamin D3 and dietary vitamin E on peroxidation of lipids and enzymes of the hepatic antioxidant system in Sprague–Dawley rats. **Int J Vitam Nutr Res.**, 66:39–45, 1996.

SATO, Y.; HONDA, Y.; IWAMOTO, J.; KANOKO, T.; SATOH, K. Abnormal bone and calcium metabolism in immobilized Parkinson's disease patients. **Mov Disord.**, 20(12): 1598–603, 2005.

SATO, Y.; HONDA, Y.; IWAMOTO, J. Risedronate and ergocalciferol prevent hip fracture in elderly men with Parkinson disease. **Neurology**, 68(12):911–5, 2007.

SATO, Y.; KAJI, M.; TSURU, T.; OIZUMI, K. Risk factors for hip fracture among elderly patients with Parkinson's disease. **J. Neurol. Sci.**, 182:89–93, 2001.

SCHAPIRA, A.H.V.; COOPER, J.M.; DEXTER, D. et al. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. **Lancet**, 1(8649):1269, 1989.

SHOBANA, C.; KUMAR, R.; SUMATHI, R. Alcoholic Extract of *Bacopa monniera* Linn. Protects Against 6-Hydroxydopamine-Induced Changes in Behavioral and Biochemical Aspects: A Pilot Study. **T. Cell Mol Neurobiol.**, 32:1099, 2012. doi:10.1007/s10571-012-9833-3

SHINPO, K.; KIKUCHI, S.; SASAKI, H.; MORIWAKA, F.; TASHIRO, K. Effect of 1,25-dihydroxyvitamin D(3) on cultured mesencephalic dopaminergic neurons to the combined toxicity caused by L-buthionine sulfoximine and 1-methyl-4-phenylpyridine. **J Neurosci Res.**, 62(3):374–82, 2000.

SHULMAN, J.M.; DE JAGER, P.L.; FEANY, M.B. Parkinson's disease: genetics and pathogenesis. **Annu Rev Pathol.**, 6:193-222, 2011. doi: 10.1146/annurev-pathol-011110-130242

SILVA, B.C.C.; CAMARGOS, B.M.; FUJII, J.B.; DIAS, E.P.; SOARES, M.M.S. Prevalência de deficiência e insuficiência de vitamina D e sua correlação com PTH, marcadores de remodelação óssea e densidade mineral óssea em pacientes ambulatoriais. **Arq Bras Endocrinol Metab.**, 52(3):482-8, 2008.

SMITH, M.P.; FLETCHER-TURNER, A.; YUREK, D.M.; CASS, W.A. Calcitriol protection against dopamine loss induced by intracerebroventricular administration of 6-hydroxydopamine. **Neurochem. Res.**, 31: 533-9, 2006.

SONG, Y. J.; HALLIDAY, G. M.; HOLTON, J. L.; LASHLEY, T., et al. Degeneration in different parkinsonian syndromes relates to astrocyte type and astrocyte protein expression. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.**, 68:1073–83, 2009. doi: 10.1097/NEN.0b013e3181b66f1b

STEENBOCK H. The induction of growth promoting and calcifying properties in a ration by exposure to light. **Science**, 60:224-225, 1924.

- STUMPF, W.E.; PRIVETTE, T.H. The steroid hormone of sunlight soltriol (vitamin D) as a seasonal regulator of biological activities and photoperiodic rhythms. **J Steroid Biochem Mol Biol.**, 39:283–9, 1991.
- SUBRAMANIAM, S.R.; CHESSELET, M.F. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease. **Prog neurobio.I**, 106-107:17-32, 2013. doi:10.1016/j.pneurobio.2013.04.004.
- SULZER, D. Multiple hit hypothesis for dopamine neuron loss in Parkinson's disease. **Trends Neurosci.**, 30, 244–50,2007.
- SURMEIER, D. J.; GUZMAN, J.N.; SANCHEZ-PADILLA, J.; SCHUMACKER, P.T. The role of calcium and mitochondrial oxidant stress in the loss of substantia nigra pars compacta dopaminergic neurons in Parkinson's disease. **Neuroscience.**, 198:221–231, 2011.
- SURMEIER, D.J. et al. Calcium and Parkinson's disease. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 483:1013–1019, 2017.
- TENGAN, C.H.; MORAES, C.T. NO control of mitochondrial function in normal and transformed cells. **Biochim Biophys Acta.**, S0005-2728(17): 30037-3, 2017. doi: 10.1016/j.bbabbio.2017.02.009.
- TOLSON, D.; ROLLAND, Y.; ANDRIEU, S.; AQUINO, J.P.; BEARD, J.; BENETOS, A.; BERRUT, G.; COLL-PLANAS, L.; DONG, B.; FORETTE, F.; FRANCO, A.; FRANZONI, S.; SALVÀ, A.; SWAGERTY, D., et al. The International Association of Gerontology and Geriatrics/World Health Organization/Society Française de Gériologie et de Gériatrie Task Force. International Association of Gerontology and Geriatrics: A Global Agenda for Clinical Research and Quality of Care in Nursing Homes. **J Am Med Dir Assoc.**,12(3):184-9, 2011. doi: 10.1016/j.jamda.2010.12.013.
- TOPAL, K.; PAKER, N.; BUGDAYCI, D.; OZER, F.; TEKDOS, D. Bone mineral density and vitamin D status with idiopathic Parkinson'sDisease. **Osteoporosis Int.**, 21:S141-S142, 2010.
- UNGERSTEDT, U. 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. **Eur J Pharmacol.**, 5: 107–10, 1968.
- UNGERSTEDT U. Striatal dopamine release after amphetamine or nerve degeneration revealed by rotational behavior. **Acta Physiol Stand.**, 367: 49-68, 1971.

VAN DEN BOS, F.; SPEELMAN, A.D.; VAN, N.M.; VAN DER SCHOUW, Y.T.; BACKX, F.J.; BLOEM, B.R.; MUNNEKE, M.; VERHAAR, H.J. Bone mineral density and vitamin D status in Parkinson's disease patients. **J Neurol.**, 260:754-760, 2013.

VASUDEVAN, D.; BOVEE, R.C.; THOMAS, D.D. Nitric oxide, the new architect of epigenetic landscapes. **Nitric Oxide Biol. Chem.**, 59:54-62, 2016.

WAKABAYASHI, K.; HANSEN, L.A.; MASLIAH, E. Cortical Lewy body-containing neurons are pyramidal cells: laser confocal imaging of double-immunolabeled sections with anti-ubiquitin and SMI32. **Acta Neuropathol.**, 89:404-08, 1995.

WANG, J.; YANG, D.; YU, Y.; SHAO, G.; WANG, Q. Vitamin D and Sunlight Exposure in Newly-Diagnosed Parkinson's Disease. **Nutrients**, 8(3):142, 2016.  
<http://doi.org/10.3390/nu8030142>

WANG, J.Y.; WU, J.N.; CHERNG, T.L.; HOFFER, B.J.; CHEN, H.H.; BORLONGAN, C.V.; WANG, Y. Vitamin D(3) attenuates 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity in rats. **Brain research.**, 904(1):67-75, 2001.

WANG, L.; EVATT, M.L.; MALDONADO, L.G.; PERRY, W.R.; RITCHIE, J.C.; BEECHAM, G.W., et al. Vitamin D from different sources is inversely associated with Parkinson disease. **Mov. Disord.**, 30(4):560-6, 2015.  
<http://doi.org/10.1002/mds.26117>.

WAMBERG, L.; KAMPMANN, U.; STODKILDE-JORGENSEN, H.; REJNMARK, L.; PEDERSEN, S.B.; RICHELSEN, B. Effects of vitamin D supplementation on body fat accumulation, inflammation, and metabolic risk factors in obese adults with low vitamin D levels – results from a randomized trial. **Eur J Intern Med.**, 24:644-9, 2013.

WEBSTER, R.G.; PETROVITCH, H.; ABBOTT, R.D. Serum vitamin D and risk of Parkinson's disease. **Movement Disorders**, 31(7):993, 2016.

WISEMAN H. Vitamin D is a membrane antioxidant. Ability to inhibit iron-dependent lipid peroxidation in liposomes compared to cholesterol, ergosterol and tamoxifen and relevance to anticancer action. **FEBS Lett.**, 326: 285-8, 1993.

YANG, H.; JIN, X.; KEI, LAM, C.W.; YAN, S.K. Oxidative stress and diabetes mellitus. **Clin Chem Lab Med.**, 49:1773-82, 2011.

ZHANG, L.; DAWSON, V.L.; DAWSON, T.M. Role of nitric oxide in Parkinson's disease. **Pharmacol Ther.**, 109(1-2): 33-41, 2006.

ZHANG, W.; WANG, T.; PEI, Z.; MILLER, D. S.; WU, X.; BLOCK, M. L., et al. Aggregated alpha-synuclein activates microglia: a process leading to disease

progression in Parkinson's disease. **FASEB J.**, 19, 533–42, 2005. doi: 10.1096/fj.04-2751com

ZHU, D. et al. Inverse associations of outdoor activity and vitamin D intake with the risk of Parkinson's disease. **J Zhejiang Univ Sci B.**, 15(10):923-7,2014.

ZITTERMANN, A. Vitamin D and disease prevention with special reference to cardiovascular disease. **Prog Biophys Mol Biol.**, 92 (1):39–48, 2006.  
DOI:10.1016/j.pbiomolbio.2006.02.001

## ANEXO







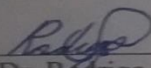
Universidade Federal do Ceará  
 Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA  
 Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo  
 Cep: 60430-970 Fortaleza-CE

### CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "AVALIAÇÃO DA AÇÃO PREVENTIVA E TEREAPÊUTICA DA 1-25, DIDROXIVITAMINA D3 EM MODELO ANIMAL DE DOENÇA DE PARKINSON PRODUZIDA PELA INJEÇÃO ESTEREOTÁXICA UNILATERAL DE 6-OHDA EM RATOS.", protocolo nº107/2015, sob responsabilidade do Prof. Dr. Glauce Socorro de Barros Viana, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de nº8 de outubro de 2008, do Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFC) da Universidade Federal do Ceará, em reunião em 29 de junho de 2016.

Vigência do projeto	07/10/2015 a 07/10/2016
Espécie/Linhagem	Ratos Wistar
Nº de Animais	192
Peso/Idade	250
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central da UFC

Fortaleza, 29 de junho de 2016

  
 Prof. Dr. Rodrigo Siqueira  
 Coordenador do CEUA - UFC

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
 RODRIGO JOSÉ BEZERRA DE SIQUEIRA  
 COORDENADOR DA COMISSÃO DE ÉTICA E DO USO COM  
 ANIMAIS - CEUA/UFC - Matrícula Sisaep: 1520734