



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

**LUDMILA ARAÚJO RODRIGUES LIMA**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA VITAMINA D NA DOENÇA DE PARKINSON: FOCO  
NA FUNÇÃO MITOCONDRIAL E ESTRESSE OXIDATIVO**

**FORTALEZA**  
**2023**

**LUDMILA ARAÚJO RODRIGUES LIMA**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA VITAMINA D NA DOENÇA DE PARKINSON: FOCO  
NA FUNÇÃO MITOCONDRIAL E ESTRESSE OXIDATIVO**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências Morfofuncionais. Área de Concentração: Neurociências.

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

**FORTALEZA**

**2023**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Sistema de Bibliotecas

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

---

- L698a Lima, Ludmila Araújo Rodrigues.  
AVALIAÇÃO DO EFEITO DA VITAMINA D NA DOENÇA DE PARKINSON: FOCO NA  
FUNÇÃO MITOCONDRIAL E ESTRESSE OXIDATIVO / Ludmila Araújo Rodrigues Lima. –  
2023.  
100 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa  
de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais, Fortaleza, 2023.  
Orientação: Profa. Dra. Glauce Socorro de Barros Viana.
1. Vitamina D. 2. Doença de Parkinson. 3. Mitocôndria. I. Título.

CDD 611

---

**LUDMILA ARAÚJO RODRIGUES LIMA**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA VITAMINA D NA DOENÇA DE PARKINSON: FOCO  
NA FUNÇÃO MITOCONDRIAL E ESTRESSE OXIDATIVO**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências Morfofuncionais. Área de Concentração: Neurociências.

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

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Glauce Socorro Barros Viana (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará – UFC

---

Prof. Dr. Heberly di Tarso Fernandes Facundo  
Universidade Federal do Cariri - UFCA

---

Prof. Dr. João Ananias Machado Filho  
Universidade Federal do Cariri - UFCA

---

Prof. Dr. Antonio José Lapa  
Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP

---

Prof. Dr. Cícero Francisco Bezerra Felipe  
Universidade Federal da Paraíba - UFPB



## RESUMO

A doença de Parkinson (DP) é caracterizada pela perda de neurônios da substância negra, depleção de dopamina e acúmulo de corpos de Lewy. Apresenta etiopatogenia complexa e envolvendo múltiplas vias, entre elas a disfunção mitocondrial, o estresse oxidativo e a neuroinflamação. Evidências científicas, endossam os efeitos neuroprotetores da vitamina D (VITD) na DP. O presente estudo objetiva avaliar os efeitos da suplementação de VITD sobre as alterações na função mitocondrial e estresse oxidativo, em modelo de DP induzido por injeção estereotáxica unilateral de 6-OHDA. Ratos *Wistar*, machos (250-300g), foram divididos nos grupos: FO (sham), 6-OHDA (12µg/µl), PRÉ-TTO (1µg/kg/dia, oral, 7dias + 6-OHDA) e PÓS-TTO (6-OHDA + 1µg/kg/dia, oral, 14 dias). Seguido o protocolo, os animais foram submetidos aos testes comportamentais, eutanasiados e realizadas as avaliações neuroquímicas e imuno-histoquímicas. Os dados foram analisados por ANOVA (Tukey ou Bonferroni ou Kruskal-Wallis e Dunn) e considerados significativos valores de  $p < 0,05$ . Ambos os protocolos de suplementação com VITD foram eficazes na restauração do comportamento motor, via comportamento rotacional induzido por apomorfina e teste de campo aberto, e do comportamento tipo depressivo, via teste de nado forçado. Ademais, o grupo PRE-TTO apresentou, para todos os analitos, a restauração da atividade bioenergética, *swelling* mitocondrial e potencial de membrana, bem como mitigou os efeitos oxidativos, por meio de aumento na concentração de superóxido dismutase (SOD) citosólico e diminuição dos níveis de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) mitocondrial. Além disso, a suplementação de VITD protegeu o cérebro hemiparkinsoniano de diminuições nas expressões de Tirosina hidroxilase (TH) e Transportador de dopamina (DAT) e diminuiu a regulação positiva de marcadores mitocondriais, como Canal aniônico dependente de voltagem 1 (VDAC 1) e Proteína de choque térmico 60 (Hsp60). Em conclusão, VITD apresentou ações neuroprotetoras em mitocôndrias cerebrais lesadas por 6-OHDA e deve estimular estudos translacionais com foco em seu uso como estratégia terapêutica para o tratamento de doenças neurodegenerativas como a DP

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

## ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) characterized by loss of neurons in the substantia nigra, dopamine depletion, and accumulation of Lewy bodies. It has a complex etiopathogenesis involving multiple pathways, including mitochondrial dysfunction, oxidative stress and neuroinflammation. Scientific evidence supports the neuroprotective effects of vitamin D (VITD) in PD. The present study aims to evaluate the effects of VITD supplementation on alterations in mitochondrial function and oxidative stress, in a model of PD induced by unilateral stereotaxic injection of 6-OHDA. Male Wistar rats (250-300g) were divided into the following groups: FO (sham), 6-OHDA (12 $\mu$ g/ $\mu$ l), PRE-TTO (1 $\mu$ g/kg/day, oral, 7days + 6-OHDA) and POST- TTO (6-OHDA + 1 $\mu$ g/kg/day, orally, 14 days). Following the protocol, the animals were submitted to behavioral tests, euthanized and neurochemical and immunohistochemical evaluations were performed. Data were analyzed by ANOVA (Tukey or Bonferroni or Kruskal-Wallis and Dunn) and  $p < 0.05$  was considered significant. Both VITD supplementation protocols were effective in restoring motor behavior, via apomorphine-induced rotational behavior and the open field test, and depressive-like behavior, via the forced swim test. In addition, the PRE-TTO group showed, for all analytes, restoration of bioenergetic activity, mitochondrial swelling and membrane potential, as well as mitigating oxidative effects, through an increase in the concentration of cytosolic superoxide dismutase (SOD) and a decrease in levels of mitochondrial hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). In addition, VITD supplementation protected the hemiparkinsonian brain from decreases in Tyrosine hydroxylase (TH) and Dopamine Transporter (DAT) expression and decreased the upregulation of mitochondrial markers such as Voltage-dependent Anion Channel 1 (VDAC 1) and Protein of thermal shock 60 (Hsp60). In conclusion, VITD showed neuroprotective actions in brain mitochondria damaged by 6-OHDA and should encourage translational studies focusing on its use as a therapeutic strategy for the treatment of neurodegenerative diseases such as PD.

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

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|                  |   |           |
|------------------|---|-----------|
| <b>FIGURA 1</b>  | Alterações morfológicas da DP na SNpc.  | <b>15</b> |
| <b>FIGURA 2</b>  | Corpos de Lewy  | <b>17</b> |
| <b>FIGURA 3</b>  | Mitocôndria   | <b>18</b> |
| <b>FIGURA 4</b>  | Cadeia respiratória.  | <b>20</b> |
| <b>FIGURA 5</b>  | Modelo quimiosmótico  | <b>20</b> |
| <b>FIGURA 6</b>  | Disfunção mitocondrial na DP  | <b>22</b> |
| <b>FIGURA 7</b>  | Biossíntese e metabolismo da VITD.  | <b>26</b> |
| <b>FIGURA 8</b>  | Representação esquemática representativa das 2 coordenadas estereotáxicas para injeção intracraniana de 6-OHDA no corpo estriado.                           | <b>37</b> |
| <b>FIGURA 9</b>  | Representação da perda parcial de receptores de neurônios dopaminérgicos estriatais   | <b>38</b> |
| <b>FIGURA 10</b> | 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.  | <b>45</b> |
| <b>FIGURA 11</b> | 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.             | <b>46</b> |
| <b>FIGURA 12</b> | Efeito da suplementação com vitamina D sobre o número de <i>rearing</i> no teste do Campo Aberto em ratos com lesão estriatal induzida por 6-OHDA.          | <b>46</b> |
| <b>FIGURA 13</b> | Efeito da suplementação com vitamina D sobre o número de <i>grooming</i> no teste do campo aberto em ratos com lesão estriatal induzida por 6-OHDA.         | <b>47</b> |
| <b>FIGURA 14</b> | Efeito da suplementação com vitamina D na avaliação do comportamento depressivo em ratos com lesão estriatal induzida por 6-OHDA                            | <b>48</b> |
| <b>FIGURA 15</b> | Avaliação do efeito da vitamina D no <i>swelling</i> mitocondrial durante a indução do mPPT das mitocondrias cerebrais na presença e na ausência de 6-OHDA. | <b>49</b> |

|                  |  |           |
|------------------|--|-----------|
| <b>FIGURA 16</b> | Análise do potencial transmembrânico de mitocôndrias cerebrais, na presença de 6-OHDA e VD3, por citometria de fluxo através do ensaio utilizando a Rodamina 123.            | <b>50</b> |
| <b>FIGURA 17</b> | Histograma representativo do ensaio com Rodamina 123, apresentando o grupo tratado com VD3 0,1 ng/mL.  | <b>51</b> |
| <b>FIGURA 18</b> | Histograma representativo do ensaio com Rodamina 123, apresentando o grupo tratado com VD3 1 ng/mL.  | <b>51</b> |
| <b>FIGURA 19</b> | Histograma representativo do ensaio com Rodamina 123, apresentando o grupo tratado com VD3 10 ng/mL.   | <b>52</b> |
| <b>FIGURA 20</b> | Análise do potencial transmembrânico de mitocôndrias cerebrais, na presença de rotenona e VD3, por citometria de fluxo através do ensaio utilizando a Rodamina 123.          | <b>53</b> |
| <b>FIGURA 21</b> | Histograma representativo do ensaio com Rodamina 123, apresentando o grupo tratado com rotenona + VD3 0,1 ng/mL.   | <b>53</b> |
| <b>FIGURA 22</b> | Histograma representativo do ensaio com Rodamina 123, apresentando o grupo tratado com rotenona + VD3 1 ng/mL.   | <b>54</b> |
| <b>FIGURA 23</b> | <b>FIGURA 24:</b> Histograma representativo do ensaio com Rodamina 123, apresentando o grupo tratado com rotenona + VD3 10 ng/mL.  | <b>54</b> |
| <b>FIGURA 24</b> | Efeitos da suplementação com vitamina D na respiração mitocondrial de ratos com lesão estriatal induzida por 6-OHDA.   | <b>58</b> |
| <b>FIGURA 25</b> | Efeitos da suplementação com vitamina D na respiração mitocondrial de ratos com lesão estriatal induzida por 6-OHDA.   | <b>59</b> |
| <b>FIGURA 26</b> | Efeito da suplementação com vitamina D no <i>swelling</i> mitocondrial durante a indução do mPPT das mitocôndrias cerebrais de ratos com lesão estriatal induzida por 6-OHDA | <b>60</b> |
| <b>FIGURA 27</b> | Efeitos da suplementação com vitamina D sobre o potencial transmembrânico de mitocôndrias cerebrais, de ratos com lesão estriatal induzida por 6-OHDA, por                   | <b>61</b> |

citometria de fluxo através do ensaio utilizando a Rodamina 123.

- FIGURA 28** Efeito da suplementação com vitamina D sobre os níveis de  $H_2O_2$  mitocondrial e SOD citosólico de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA. **62**
- FIGURA 29** Imunomarcção para TH no corpo estriado em animais parkinsonianos. **63**
- FIGURA 30** Imunomarcção para DAT no corpo estriado em animais parkinsonianos. **64**
- FIGURA 31** Imunomarcção para VDAC1 no corpo estriado em animais parkinsonianos. **65**
- FIGURA 32** Imunomarcção para Hsp60 no corpo estriado em animais parkinsonianos. **66**

## LISTA DE ESQUEMA

**ESQUEMA 1** Protocolo experimental

**35**

## **LISTA DE TABELAS**

|                 |   |           |
|-----------------|---|-----------|
| <b>TABELA 1</b> | Efeitos da suplementação com vitamina D na taxa respiratória em estado 3, estado 4, RCR e ADP/O de ratos com lesão estriatal induzida por 6-OHDA. | <b>55</b> |
|-----------------|---|-----------|

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                               |  |
|-------------------------------|--|
| 6-OHDA                        | 6-hidroxi-dopamina   |
| ANOVA                         | Análise de Variância   |
| ADP                           | Difosfato de adenosina   |
| ATP                           | Trifosfato de adenosina  |
| CE                            | Corpo estriado   |
| CEUA                          | Comissão de Ética em Uso Animal da Universidade Federal do Ceará |
| CONCEA                        | Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal           |
| DAT                           | Transportadores de dopamina                                      |
| DP                            | Doença de Parkinson  |
| DOPAC                         | Ácido 3,4-di-hidroxi-fenilacético                                |
| 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                              |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | Peróxido de hidrogênio   |
| Hsp60                         | Proteína de choque térmico 60                                    |
| HVA                           | Ácido homovalínico   |
| i.m                           | Intramuscular  |
| i.p                           | Intraperitônio   |
| KCl                           | Cloreto de potássio  |
| MDA                           | Malondialdeído   |
| MME                           | Membrana mitocondrial externa                                    |
| MMI                           | Membrana mitocondrial interna                                    |
| MPP+                          | 1-metil-4-fenilpiridínio   |
| mPTP                          | Poros de transição de permeabilidade mitocondrial                |
| NaNO <sub>2</sub>             | Nitrito de Sódio   |
| NO                            | Óxido nítrico  |
| NO <sub>2</sub>               | Nitrito  |



|                 |   |
|-----------------|---|
| NO <sub>3</sub> | Nitrato                                   |
| PKC-δ           | Proteína quinase C-δ                      |
| PÓS-TTO         | Pós-tratamento                            |
| PRÉ-TTO         | Pré-tratamento                            |
| RL              | Radicais livres                           |
| RXR             | Receptor retinóide X                      |
| SNpc            | Substância <i>nigra pars compacta</i>     |
| SOD             | Superóxido dismutase                      |
| TH              | Tirosina hidroxilase                      |
| UI              | Unidades internacionais                   |
| UPS             | Ubiquitina-proteassoma                    |
| UV              | Radiação ultravioleta                     |
| VDAC            | Canal aniônico dependente de voltagem 1   |
| VDR             | Receptor de vitamina D                    |
| VDRE            | Elementos de resposta à vitamina D        |
| VIT D           | Vitamina D                                |
| VMAT            | Transportadores vesiculares de monoaminas |

## SUMÁRIO

- 1. INTRODUÇÃO**15
  - 1.1. Doença de Parkinson**15
    - 1.1.1. Epidemiologia**15
    - 1.1.2. Fisiopatologia**15
    - 1.1.3. Etiologia**18
    - 1.1.4. Disfunção Mitocondrial**19
      - 1.1.4.1. Mitocôndrias e atividade bioenergética19
      - 1.1.4.2. Disfunção Mitocondrial e DP22
    - 1.1.5. Estresse Oxidativo e DP**24
  - 1.2. Vitamina D**25
    - 1.2.1. Biossíntese e metabolismo**25
    - 1.2.2. Vitamina D e Ações Biológicas**28
    - 1.2.3. Vitamina D e DP**29
- 2. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA**32
- 3. OBJETIVOS**34
  - 3.1. Objetivo Geral**34
  - 3.2. Objetivos Específicos**34
- 4. MATERIAIS E MÉTODOS**35
  - 4.1. Drogas e Reagentes**35
  - 4.2. Animais**35
  - 4.3. Protocolo experimental**35
  - 4.4. Cirurgia Estereotáxica (UNGERSTEDT, 1968)**37
  - 4.5. Testes Comportamentais**38
    - 4.5.1. Avaliação do comportamento rotacional induzido por apomorfina (UNGERSTEDT, 1971)**38
    - 4.5.2. Avaliação do comportamento motor via teste do Campo Aberto (Open Field) (BROADHURST, 1957)**39
    - 4.5.3. Avaliação do comportamento depressivo via teste do Nado forçado (Forced Swim test) (PORSOLT et al., 1978)**39
  - 4.6. Avaliação da Função Mitocondrial**40

- 4.6.1. **Isolamento Mitocondrial**<sup>40</sup>
- 4.6.2. ***Delineamento experimental do protocolo in vitro***<sup>40</sup>
- 4.6.3. ***Swelling mitocondrial***<sup>41</sup>
- 4.6.4. ***Determinação do potencial de membrana mitocondrial***<sup>41</sup>
- 4.6.5. ***Consumo de oxigênio mitocondrial***<sup>41</sup>
- 4.6.6. ***Razão de controle respiratório mitocondrial cerebral (RCR)***<sup>42</sup>
- 4.6.7. ***Síntese de ATP e razão de consumo de oxigênio (ADP/O)***<sup>42</sup>
- 4.7. **Avaliação do Estresse Oxidativo**<sup>42</sup>
- 4.7.1. ***Determinação da produção mitocondrial de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)***<sup>43</sup>
- 4.7.2. ***Determinação da concentração da enzima superóxido dismutase (SOD)***<sup>43</sup>
- 4.8. **Determinação da concentração de proteínas**<sup>43</sup>
- 4.9. **Imunohistoquímicas**<sup>44</sup>
- 4.9.1. ***Ensaio imunohistoquímico para tirosina hidroxilase (TH) e transportador de dopamina (DAT), em estriados de ratos hemiparkinsonianos***<sup>44</sup>
- 4.9.2. ***Ensaio de imuno-histoquímica para o canal aniônico dependente de voltagem 1 (VDAC1) e proteína de choque térmico 60 (Hsp60) no estriado de ratos hemiparkinsonianos***<sup>45</sup>
- 4.10. **Análise Estatística**<sup>45</sup>
- 5. **RESULTADOS**<sup>46</sup>
- 6. **DISCUSSÃO**<sup>70</sup>
- 7. **CONCLUSÃO**<sup>80</sup>
- 81
- 98

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Doença de Parkinson

#### 1.1.1. Epidemiologia

A doença de Parkinson (DP) é uma doença neurodegenerativa complexa e multifatorial, de caráter progressivo, e até então inevitável, que comumente afeta idosos em todo o mundo, sendo a idade o fator de risco mais significativo para o desenvolvimento desta patologia. Enfatiza-se que, o perfil demográfico global está mudando e a população mundial está envelhecendo. O Brasil vive uma rápida transição demográfica, em 2021, o número de brasileiros com 60 anos ou mais constituía, aproximadamente, 31,2 milhões de pessoas, representando 14,7% da população. Atualmente, a DP é uma das principais causas de incapacidade neurológica e a segunda doença neurodegenerativa mais comum, acometendo cerca de 1-3% da população com mais de 65 anos. O Global Burden of Disease Study estima que o número de casos de DP dobrará de cerca de 7 milhões em 2015 para cerca de 13 milhões em 2040 (DORSEY et al., 2007; IBGE, 2022; GBD, 2019).

A prevalência da DP é mais comum nos homens do que em mulheres, apresentando uma prevalência de aproximadamente 3:2, respectivamente. Acredita-se que tal fenômeno ocorra em vista da interconexão de agentes ambientais e sociais na DP e a sua interação com outras variáveis, fatores genéticos, hormonais, efeitos da gravidez e exposições ambientais (KAASINEN; VAHLBERG; SUOMINEN, 2015; LEES; HARDY; REVEZ, 2009).

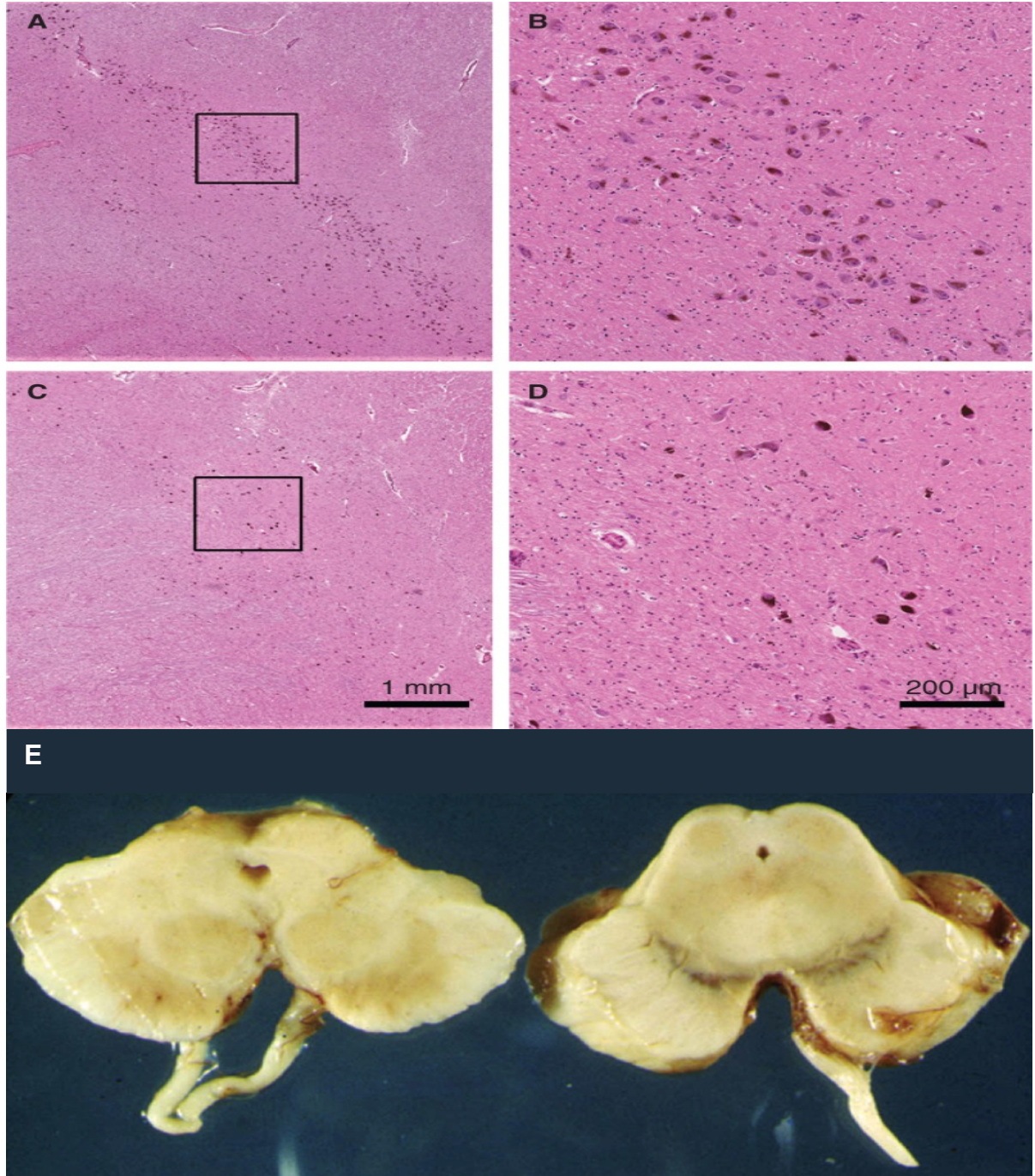
#### 1.1.2. Fisiopatologia

A DP é uma patologia degenerativa e progressiva, caracterizada como um distúrbio de movimento hipocinético proeminente, cuja caracterização fisiopatológica se revela, primordialmente, por meio da neurodegeneração dos neurônios dopaminérgicos, depleção de dopamina, pelo acúmulo de inclusões citoplasmáticas intraneuronais denominadas de corpos de Lewy e gliose (BRAAK et al., 2003; RAZA et al., 2019).

A principal alteração morfológica do cérebro com DP é observada em cortes transversais do tronco encefálico, onde se evidencia a perda da área de pigmentação escura na substância negra *pars compacta* (SNpc) e *locus coeruleus* (figura 1). Tal perda de pigmentação está diretamente correlacionada com a morte de neurônios dopaminérgicos contendo neuromelanina na SNpc e de neurônios

noradrenérgicos no *locus coeruleus* (DICKSON, 2012; KOULI et al., 2018; REISNER, 2016).

Figura 1: Alterações morfológicas da DP na SNpc.



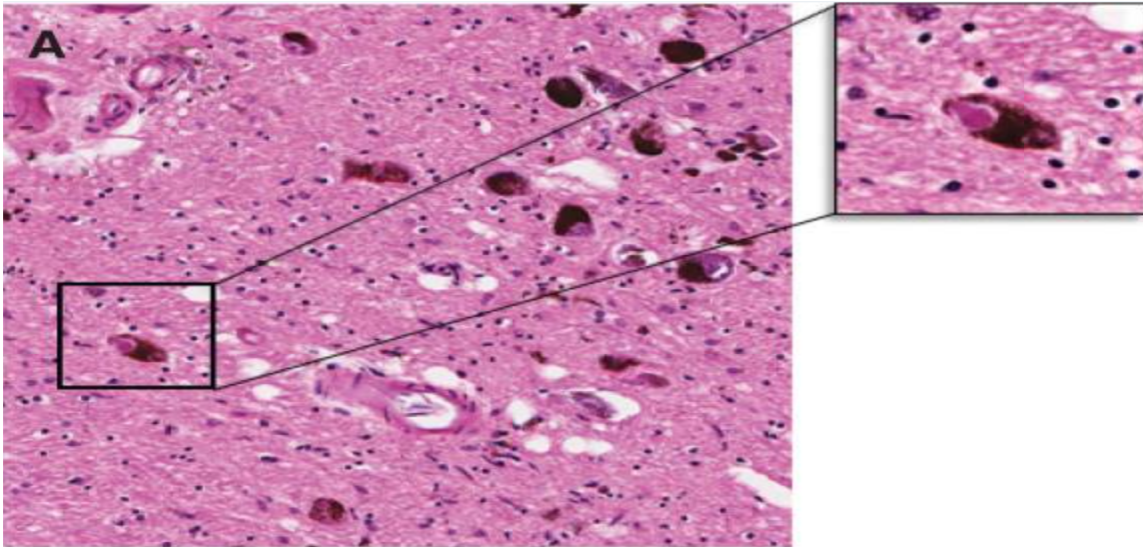
Fonte: KOULI et al.,2018; REISNER, 2016. Legenda: Corte coronal ao nível da substância nigra pars compacta (SNpc) em um cérebro controle (A e B) e um cérebro PD (C e D) corado por hematoxilina e eosina. A figura 1E apresenta as alterações macroscópicas na substância nigra na DP (imagem a esquerda).

A interconexão entre os gânglios da base e córtex motor viabiliza a computação da sinalização neuronal que controlam as funções motoras voluntárias, atividades prejudicadas na DP. Os núcleos da base do cérebro incluem o corpo estriado, composto por núcleo caudado, putâmen e globo pálido, e a substância negra, dividida em substância negra *pars compacta* (SNpc), a *pars reticulata* e núcleo subtalâmico. Localizada no mesencéfalo, e compondo parte do sistema nervoso extrapiramidal, a substância negra envia sinais para o corpo estriado, por meio da via nigroestriatal, desempenhando um papel importante no controle motor. Kordower et al. (2013) evidenciam em estudo morfométricos, *post-mortem*, quantitativos de cérebros com DP, que a perda de 30% dos neurônios dopaminérgicos da SNpc que promove o início das manifestações motoras típicas da DP, podendo, ao passo da progressão da patologia, culminar em uma neurodegeneração dopaminérgica nigral de 60% ou mais. Salienta-se que o resultado dessa contundente morte neuronal, promove a desnervação da via nigroestriatal, levando à diminuição dos níveis de dopamina no corpo estriado. Ademais, a redução da sinalização de dopamina tem como consequência um aumento da ação inibitória exercida via globo pálido ao tálamo, e indiretamente ao córtex, reprimindo, dessa forma, a iniciação de movimentos e levando assim às manifestações motoras características da DP, sendo assim responsável pelo aparecimento e agravamento dos sintomas motores cardinais na DP, sendo eles: tremor em repouso, bradicinesia, rigidez e instabilidade postural (KORDOWER et al., 2013; MA et al., 1997).

Os corpos de Lewy (figura 2) são acúmulos de inclusões citoplasmáticas filamentosas compostos principalmente por agregados de  $\alpha$ -sinucleína. A fosforilação e fibrilação da  $\alpha$ -sinucleína levam à formação de corpos de Lewy e induzem a morte neuronal. Os corpos de Lewy são encontrados em diferentes áreas do sistema nervoso central, como nos núcleos da base, no núcleo motor dorsal do vago, bulbo olfatório, *locus coeruleus* e o núcleo intermediolateral na medula espinal, bem como no sistema nervoso periférico, como por exemplo, nos gânglios celíacos e sistema nervoso entérico (BRAAK et al., 2006; GORBATYUK et al., 2008; VOLPICELLI-DALEY et al., 2011; WAKABAYASHI et al., 1989).



Figura 2: Corpos de Lewy



Fonte: KOULI et al., 2018.

O processo neurodegenerativo e a formação dos corpos de Lewy são evidenciados para além de tão somente o sistema dopaminérgico e áreas nigrais, sendo encontrado também nos sistemas noradrenérgico (*locus coeruleus*), serotoninérgico (núcleos da rafe) e colinérgico (núcleo basal de Meynert e no núcleo motor dorsal do vago), bem como no córtex cerebral (especialmente no córtex cingulado e entorrinal), bulbo óptico e sistema nervoso autônomo. A degeneração das estruturas hipocámpais e as entradas corticais colinérgicas contribuem para a alta taxa de demência que acompanha a DP, particularmente em pacientes mais idosos. O resultado de tais alterações neurofuncionais é traduzido na panóplia de sintomas clínicos não motores tais como: distúrbio do sono, hiposmia, constipação, depressão, ansiedade e entre outros (BRAAK et al., 2003; CABREIRA; MASSANO, 2019; POEWE, 2008; RAZA et al., 2019).

### 1.1.3. Etiologia

A etiopatogênese da doença de Parkinson é heterogênea e alicerçada na interação de fatores genéticos e ambientais. Cerca de 5–10% de todos os casos de DP são monogênicos, causados por mutações raras de alta penetrância. No entanto, acredita-se que a grande maioria dos casos de DP seja causada por uma combinação de dezenas e potencialmente centenas de efeitos moderadamente fracos variantes de sequência de DNA de tamanho que ocorrem na população em geral, bem como

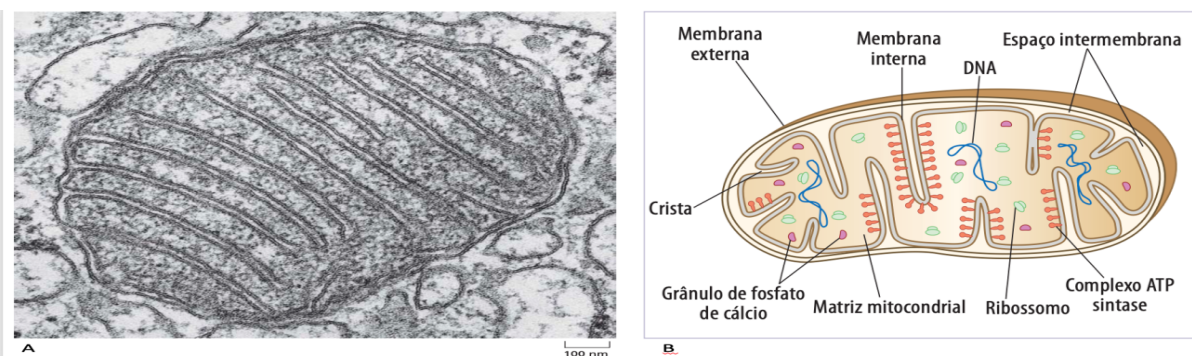
exposições ambientais e de estilo de vida e possivelmente até mesmo fatores epigenéticos. Os agentes implicados na patogênese da DP apresentam complexos mecanismos moleculares e envolvem uma infinidade de vias interconectadas destacando-se especialmente a disfunção mitocondrial, estresse oxidativo, alteração da homeostase do cálcio ( $\text{Ca}^{+2}$ ) e neuroinflamação (BANDRES-CIGA et al., 2020; KALIA; LANG, 2015; KOULI et al., 2018).

#### **1.1.4. Disfunção Mitocondrial**

##### 1.1.4.1. Mitocôndrias e atividade bioenergética

As mitocôndrias (figura 3) são organelas celulares que desempenham um papel fundamental na manutenção da homeostase celular. Elas estão envolvidas em inúmeras vias de sinalização, como metabolismo energético, imunidade, homeostase do cálcio, morte celular, entre outros. Desempenham um papel basilar no crescimento, diferenciação, sinalização celular, apoptose e controle do ciclo celular. Essas organelas são constituídas de duas membranas que são estrutural e funcionalmente distintas, a membrana mitocondrial externa (MME) e a membrana mitocondrial interna (MMI). Elas definem dois compartimentos na mitocôndria: o espaço intermembrana, que separa as membranas interna e externa, e a matriz mitocondrial, que está circundada pela membrana interna. Cada membrana é uma bicamada fosfolipídica com proteínas incorporadas. A membrana externa é lisa, enquanto a membrana interna tem muitas dobras invertidas chamadas cristas, que aumentam a área de superfície e os sítios onde se situam os complexos enzimáticos envolvidos no transporte de elétrons. Vale salientar que as mitocôndrias contêm o seu próprio DNA, que codifica parte das proteínas necessárias ao seu funcionamento. (CARVALHO; RECCO-PIMENTEL, 2013; HATEFI, 1985; OBESO et al. 2017).

Figura 3: Mitocôndria



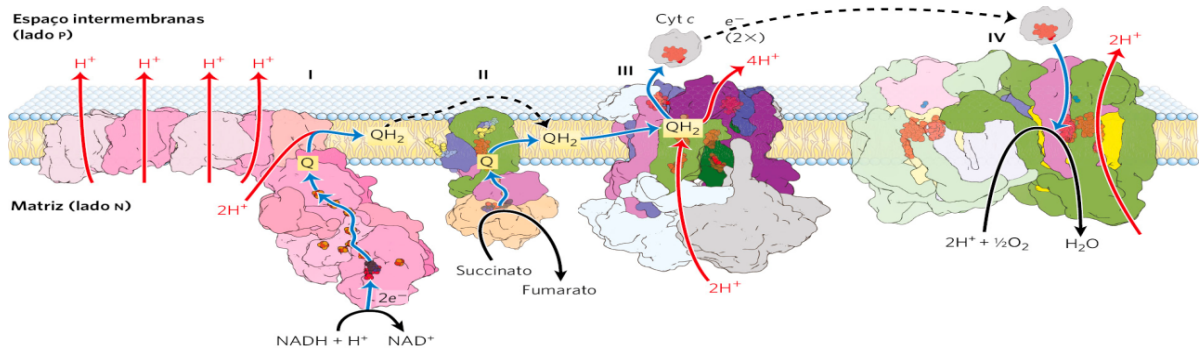


Fonte: CARVALHO; RECCO-PIMENTEL, 2013. Legenda: (A) Corte transversal de microscopia eletrônica de mitocôndria; (B): Esquema de mitocôndria mostrando suas membranas interna e externa, espaço intermembranas, crista, matriz, complexo ATP sintase (F1F0), molécula de DNA, ribossomos e precipitado de fosfato de cálcio.

A MME é permeável a moléculas de baixo peso molecular e a íons, uma vez que dispõe de numerosos canais formados por proteínas que respondem a alterações de voltagem da membrana mitocondrial, denominados de canais aniônicos dependente de voltagem (VDAC). Por meio dos VDAC ocorre a troca de metabólitos entre o citosol e o espaço intermembrana, viabilizando a translocação de íons e metabólitos, como o trifosfato de adenosina (ATP) e difosfato de adenosina (ADP). É imprescindível frisar que a MME está envolvida no elo biomolecular de morte celular mediada por mitocôndrias, modulado através de várias vias diferentes e da interação com várias proteínas reguladoras. A proteína X associada a Bcl-2 (Bax), por exemplo, se transloca do citosol para MME em resposta aos sinais apoptóticos, posteriormente oligomerizando na MME, promovendo a liberação de fatores apoptóticos, como o citocromo c e fator indutor de apoptose, e outros mediadores pró-apoptóticos (CAMARA; LESNEFSKY; STOWE, 2010; OKADA et al., 2004; ROSTOVTSEVA; TAN; COLOMBINI, 2005).

A MMI é uma estrutura convoluta, formadas por muitas dobras, conhecidas como cristas mitocondriais. A membrana mitocondrial interna, diferentemente da MME, é extremamente impermeável, inclusive a íons e moléculas polares. Essa contundente impermeabilidade é viabilizada pela cardiolipina, um tipo específico de fosfolípido que compõe a membrana interna. A MMI aloja os componentes da cadeia respiratória (figura 4) e a ATP-sintase, bem como apresenta o poro de transição de permeabilidade mitocondrial (mPTP), canal proteico de alta condutância dependente de voltagem e cálcio, que permite a entrada de solutos com até 1,5 kD através da membrana. A abertura persistente do mPTP inicia uma cadeia irreversível de eventos, como despolarização da membrana mitocondrial interna, fosforilação oxidativa desacoplada, produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs), *swelling* mitocondrial, desdobramento das cristas, liberação de  $Ca^{2+}$  e de proteínas apoptogênicas, através da membrana mitocondrial externa, o que acaba levando à morte celular (BRENNER; MOULIN 2012; NELSON, 2022; PINTO, 2017; VIANELLO et al. 2012).

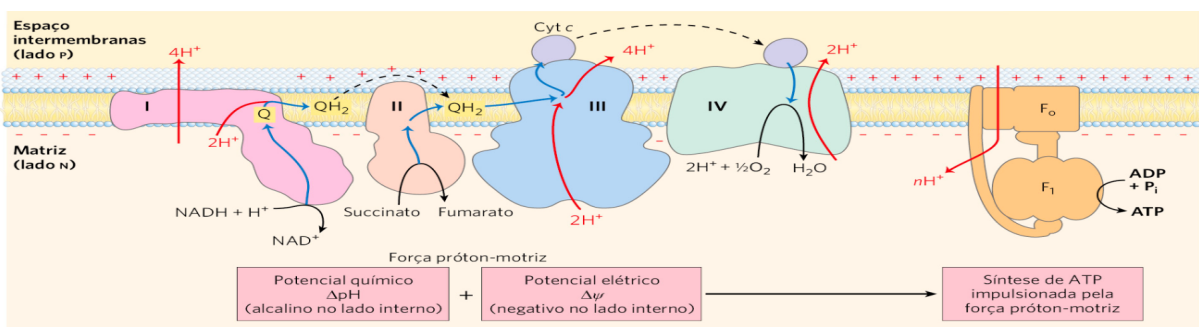
Figura 4: Cadeia respiratória.



Fonte: NELSON, 2022.

A cadeia respiratória é um complexo multiproteico, responsável pela fosforilação oxidativa, que engloba doadores de elétrons para um aceptor de elétrons (oxigênio), via reação redox, e sintetizando energia na forma de ATP. Os quatro complexos supramoleculares são: Complexo I: NADH – ubiquinona (Q) oxidorreductase; Complexo II: succinato desidrogenase; Complexo III: ubiquinona – citocromo C oxidorreductase; Complexo IV: citocromo C oxidase. Os complexos I e II catalisam a transferência de elétrons para a ubiquinona a partir de dois doadores de elétrons diferentes: NADH (Complexo I) e succinato (Complexo II). O Complexo III carrega elétrons da ubiquinona reduzida para o citocromo C. Já o Complexo IV completa a sequência, transportando os elétrons do citocromo C para o  $O_2$ . Graças a transferência de elétrons, os prótons são bombeados ativamente para o espaço intermembrana pelos complexos I, III e IV, suscitando na geração do potencial elétrico ( $\Delta\psi$ ) e uma razão de concentração de prótons. Essa energia é utilizada pelo complexo V ( $F_0/F_1$ -ATP-sintase) que provoca a depleção do gradiente de concentração dos prótons ao engendrar tal retorno para matriz mitocondrial, produzindo assim energia necessária para unir uma molécula de ADP com um fosfato inorgânico ( $P_i$ ), gerando ATP (figura 5) (NELSON, 2022; PINTO, 2017).

Figura 5: Modelo quimiosmótico



Fonte: NELSON, 2022.

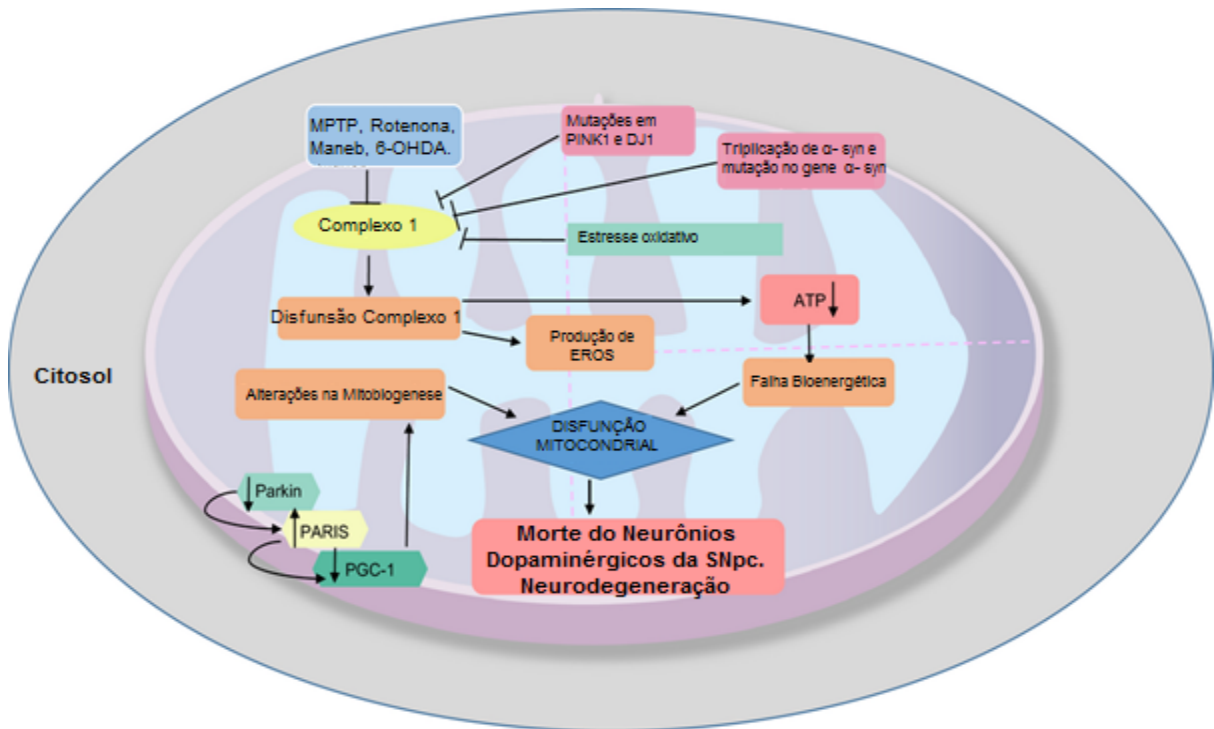
O cérebro é um órgão bioenergeticamente exigente, em contraste a baixa capacidade glicolítica dos neurônios, esse órgão é responsável pelo consumo de cerca de 25% da glicose e 20% do oxigênio. Ressalva-se que os neurônios dopaminérgicos apresentam demanda energética até 20 vezes maior que outros tipos celulares e que os neurônios nigrais possuem taxa mais alta de fosforilação oxidativa basal em comparação com os neurônios da área tegmental ventral. Tais fatores podem propiciar a níveis mais elevados de estresse oxidativo, devido à produção de espécies reativas de oxigênio pelos complexos da cadeia respiratória. Salienta-se que a elevada demanda energética neuronal ocorre visto a necessidade de manter o equilíbrio iônico nos neurônios, produzir potenciais de ação, gerar correntes pós-sinápticas e reciclar neurotransmissores. Por conseguinte, o cérebro é um órgão altamente vulnerável à disfunção mitocondrial, uma vez que pequenas alterações na homeostase mitocondrial podem ter um impacto substancial na função organelar e até mesmo na integridade de toda a célula (OLGUIN, et al., 2016; LIANG et al., 2007; MAMELAK, 2018; SHENG, 2017).

É válido de nota abalizar que as mitocôndrias são uma importante fonte de EROs, produzidas na cadeia respiratória. Durante a fosforilação oxidativa, os complexos I e III da cadeia respiratória liberam elétrons para o oxigênio, produzindo principalmente radicais superóxido e, subsequentemente, peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radicais hidroxila. Por conseguinte, disfunções na cadeia respiratória desencadeará comprometimento da fosforilação oxidativa, resultando não apenas em falha bioenergética, como também desequilíbrio redox. A geração substancial de EROs na mitocôndria pode levar ao aparecimento e progressão de doenças neurodegenerativas, como a doença de Parkinson (HATEFI, 1985; KUDIN, et al., 2004; OJALA; MONTOYA; ATTARD, 1981).

#### 1.1.4.2. Disfunção Mitocondrial e DP

A disfunção mitocondrial, caracterizada por alterações morfofuncionais como modificações no arcabouço mitocondrial, oscilações no processo de fissão e fusão, falhas bioenergéticas, mutações no DNA mitocondrial, mutações genéticas no DNA nuclear, síntese e liberação excessiva de EROs e ativação de mecanismos pró-apoptóticos (figura 6). Na DP a disfunção mitocondrial foi reportada tanto nas formas esporádica como genética, bem como em modelos da doença induzidos por toxinas (BOSE; BEAL, 2016; MANTLE; HARGREAVES, 2022; MACDONALD et al., 2018).

Figura 6: Disfunção mitocondrial na DP.



Fonte: BOSE; BEAL, 2016.

A relação etiológica entre a disfunção mitocondrial e a DP, remota a década de 1980 e se origina dos achados em que a exposição humana acidental ao 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), subproduto da síntese de heroína, promoveu a manifestação de sintomas semelhantes aos parkinsonianos, sendo endossado por várias pesquisas experimentais de morte celular neuronal dopaminérgica induzida por MPTP na região SNpc do cérebro de roedores de laboratório e primatas não humanos. Investigações mais extensas sobre o mecanismo da neurotoxicidade dopaminérgica induzida por MPTP revelaram que 1-metil-4-fenilpiridínio (MPP+), o metabólito bioativo do MPTP, inibe o complexo I da cadeia respiratória, impulsionando o aumento da síntese de EROs e culminando com a morte celular mediada por estresse oxidativo. Para mais, evidências epidemiológicas estabeleceram a associação entre o uso de pesticidas, como rotenona, maneb e paraquat, com a incidência de DP. Dois estudos meta-analíticos encontraram um aumento de 11 a 50% no risco de desenvolvimento de DP com a exposição a pesticidas. Estudos revelam que esses pesticidas também comprometem o complexo I e bloqueiam a cadeia transportadora de elétrons, inferindo ainda mais o papel singular das perturbações mitocondriais e do estresse oxidativo na etiologia da DP (BURNS et al., 1983; HEIKKILA et al., 1985; GUNNARSSON; BODIN, 2019; LANGSTON et al., 1983; POIRIER; BARBEAU, 1985; YAN et al., 2018).

Pesquisa realizada por Burbulla e colaboradores (2017) descreveu uma cascata patológica, dependente do tempo, iniciada pelo estresse mitocondrial levando ao acúmulo de dopamina oxidada que resultou em disfunção lisossômica, estresse oxidativo e acúmulo de  $\alpha$ -sinucleína em neurônios dopaminérgicos humanos derivados das formas de DP esporádica e familiar. Ademais, menor quantidade da subunidade do complexo I, bem como de sua atividade, foram relatadas em amostras de mesencéfalo de pacientes com DP pós-morte e de plaquetas derivadas de pacientes. Essas evidências, em combinação com o fato de que as mutações genéticas envolvidas na DP também estão associadas a perturbações mitocondriais, corrobora o papel fisiopatológico fundamental da disfunção mitocondrial na etiopatogênese da DP (KAUSAR et al., 2018; LIN et al., 2020; MANN et al., 1992; MIZUNO et al., 1989; PARKER et al., 1989; SCHAPIRA et al., 1990; SWERDLOW et al., 1996).

#### **1.1.5. Estresse Oxidativo e DP**

Espécies reativas de oxigênio são subprodutos do metabolismo aeróbico biológico, isso se deve ao fato de que o fluxo de elétrons através da cadeia respiratória ser um processo ineficiente, no qual apenas 0,4 a 4% do oxigênio é reduzido, propiciando assim à produção de EROs. Os complexos I e III são considerados os principais sítios envolvidos na produção das EROs, cujo arsenal consiste em radicais hidroxila, ânions superóxido e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), além das espécies reativas de nitrogênio, que inclui o radical livre de óxido nítrico e seu derivado, o ânion peroxinitrito (BALABAN; NEMOTO; FINKEL, 2014; DI MEO et al., 2016; JEONG et al., 2016; KALANI et al., 2018; KAUSAR et al., 2018; ZOROV; JUHASZOVA; SOLLOTT, 2014).

Faz necessário esclarecer que as EROs são essenciais para a manutenção da homeostase celular, mediando funções celulares essenciais, como expressão gênica, fosforilação de proteínas, ativação de fatores de transcrição, síntese de DNA ou proliferação celular. No entanto, as EROs desempenham um papel bivalente, pois se sua produção não for controlada, o resultado é um ataque oxidativo indiscriminado a lipídios, proteínas e DNA celular, favorecendo o dano tecidual, a resposta inflamatória e a morte celular. Em geral, o estresse oxidativo é resultado de um desequilíbrio nas taxas de produção de espécies oxidativas e nas taxas de remoção dessas espécies por fatores antioxidantes celulares. As células têm seus próprios

sistemas de defesa antioxidante para combater a geração excessiva de EROs que incluem proteínas antioxidantes, como glutathiona (GSH),  $\alpha$ -tocoferol, ácido ascórbico e enzimas sequestradoras de radicais de oxigênio, incluindo superóxido dismutase (SOD), catalase, peroxidase e tioredoxinas (DI MEO et al., 2016; JIANG et al., 2019; PUSPITA et al., 2017).

O estresse oxidativo representa um mecanismo primordial na patogênese da DP, este é capaz de perturbar a estabilidade dos ácidos nucleicos, a homeostase de proteínas, a funcionalidade dos canais iônicos e das autodefesas celulares. Isto ocorre, pois, o aumento substancial de espécies reativas de oxigênio 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 e da inativação dos receptores nicotínicos de acetilcolina, altera a homeostasia das proteínas DJ-1, PINK1 e Akt, e altera a síntese de mediadores inflamatórios. Pesquisas demonstram que o estresse oxidativo seja o mecanismo subjacente comum que leva à destruição celular, tanto para a forma esporádica quanto familiar da DP. Níveis aumentados de lipídios oxidados, proteínas e oxidação de DNA e níveis reduzidos de glutathiona reduzida são observados na substância negra de pacientes com DP. O próprio neurotransmissor dopamina pode ser uma fonte de estresse oxidativo. A dopamina quinona causa a inativação do transportador de dopamina e da tirosina hidroxilase (CACABELOS, 2017; CHEN et al., 2016; DIONÍSIO et al., 2021; HWANG 2013).

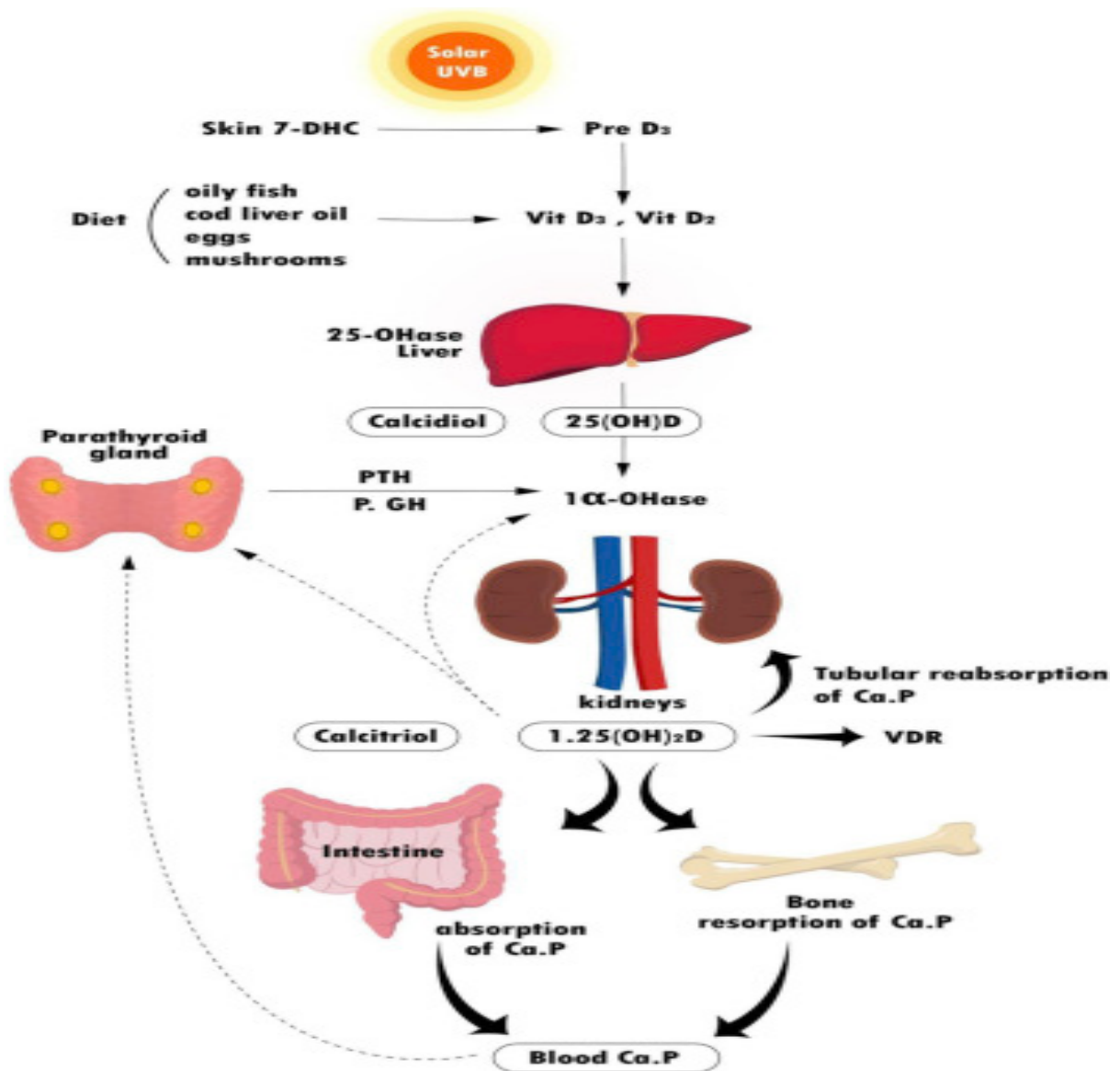
É importante frisar que os neurônios dopaminérgicos da SNpc apresentam maior susceptibilidade a produção de EROs, isto ocorre uma vez que estes possuem: axônios particularmente longos, não mielinizados, com grande número de sinapses e que apresentam elevada atividade metabólica; atividade de marca-passo 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 (SURMEIER et al., 2017; YU, 1994).

## **1.2. Vitamina D**

### **1.2.1. Biossíntese e metabolismo**

A vitamina D (VITD) foi caracterizada pela primeira vez como uma vitamina no século 20 e agora é reconhecida como um pró-hormônio esteroide. As duas apresentações da vitamina D são a vitamina D2 (ergocalciferol) e a vitamina D3 (colecalciferol), de origens vegetal e animal respectivamente. Todavia, poucos alimentos contêm naturalmente vitamina D (exemplo de alimentos ricos em vitamina D: sardinha, atum, cavala, salmão e óleo de fígado de bacalhau; gema de ovo; cogumelos shiitake; fígado), portanto, a síntese dérmica após a radiação ultravioleta B (UVB) (comprimento de onda 290-315 nm) continua sendo a principal forma para obtenção de vitamina D. O 7-deidrocolesterol, presente nas células epidérmicas da pele, é convertido, após radiação UVB por um processo termosensível, não enzimático de isomerização, a pré-vitamina D3. Tanto a vitamina D3 quanto a D2 são biologicamente inativas, necessitando de conversão enzimática para suas formas biologicamente ativas. Inicialmente, a VIT D inativa é transportada para o fígado pela proteína de ligação da vitamina D (DBP). No fígado, a VIT D é convertida em 25-hidroxivitamina-D3 pela hidroxilação no carbono 25 mediada pela 25-hidroxilase- D3, via CYP2R1. Em seguida, é convertida nos rins por meio da 1-alfa-hidroxilação em sua forma mais ativa, 1,25(OH)<sub>2</sub>D (calcitriol), com meia-vida de 4 a 6 horas. É importante destacar que esse processo é modulado pelo hormônio da paratireoide e outros mediadores, incluindo hipofosfatemia e hormônio do crescimento (figura 7). Salienta-se que a 1-alfa-hidroxilação também é encontrada em locais não renais, como macrófagos alveolares, osteoblastos, linfonodos, placenta, colo, mamas e queratinócitos, sugerindo possível papel autócrino-parácrino de 1,25(OH)<sub>2</sub>D (ADAMS; HEWISON, 2008; BIKLE, 2014; HOLICK et al., 1979; HOLICK et al., 1980).

Figura 7: Biossíntese e metabolismo da VITD.



Fonte: CHANG; LEE, 2019.

Os efeitos da vitamina D3 são mediados principalmente por sua interação com o receptor nuclear de vitamina D (VDR), que atua como um constituinte da superfamília de receptores nucleares de fatores de transcrição ativados por ligantes. O VDR forma um dímero com o receptor retinóide X (RXR) e se liga aos elementos de resposta à vitamina D (VDRE) no DNA, interagindo assim com vários fatores de acoplamento e transcrição essenciais para ativar promotores e controlar a expressão gênica. 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. Além disso, a vitamina D3 exerce ações rápidas e não genômicas na ativação de moléculas de sinalização, na abertura de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Cl}^-$  e na interação com o esteroide de



resposta rápida associado à membrana (MARRS), entre outros (BIVONA, et al., 2019; DELUCA, 2008; DOROUDI; LEBLANC; NEMERE, 2014; SCHWARTZ; BOYAN, 2015; NORMAN, 2006).

### **1.2.2. Vitamina D e Ações Biológicas**

A suficiência de VITD é definida como um nível sérico de 25-hidroxivitamina D (25(OH)D) maior ou igual a 30 ng/mL (75 nmol/L), enquanto a insuficiência é definida como 20 a 30 ng/mL (50–75 nmol/L), e a deficiência é um nível inferior a 20 ng/mL (50 nmol/L). Um baixo nível de VITD é comum em idosos e tem sido associado à mortalidade por todas as causas. Israel et al. (2022) evidenciaram potencial papel protetor da VITD no COVID-19, evidenciando uma associação inversa entre as concentrações séricas de vitamina D e a prevalência e mortalidade do COVID-19 na população em geral. Além de fatores geográficos e climáticos, a deficiência de VITD também é mais prevalente entre indivíduos com pele mais escura do que aqueles com cor de pele mais clara, devido ao fato de que a pigmentação intensa reduz a produção dela na pele (CHIODINI et al., 2022; CHOWDHURY et al., 2014; HOLICK, 2009; ISRAEL et al., 2022; LI et al., 2019).

Estudos sobre as funções biológicas da VITD começaram em 1822, quando o médico polonês Dr. Jędrzej Sniadecki descobriu que a falta de exposição à luz solar contribuía diretamente para o aparecimento do raquitismo. Posteriormente, em 1918, Sir Edward Mellanby expos que a intervenção nutricional com óleo de fígado de bacalhau pode substituir a luz solar na cura e prevenção do raquitismo. Em seguida, o Dr. Elmer McCollum et al. (1922) denominaram oficialmente esse fator nutricional como vitamina D. A descoberta do receptor VDR, e a confirmação de sua presença em vários tecidos, abriu o elo mecanístico entre a VITD e múltiplos processos celulares, incluindo: proliferação, diferenciação e sobrevivência celular; regulação de outros hormônios; modulação da 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 trato gastrointestinal, diabetes tipo 1 e doenças neurodegenerativas como a DP (DZIK; KACZOR, 2019; GARLAND et al. 2006; HAUSSLER et al. 1969; MCCOLLUM et al. 1922; MELLANBY 1918; MOZOLOWSKI, 1939; SILVA; CASTRO, 2022).

### **1.2.3. Vitamina D e DP**

A VITD modula um amplo espectro de sistemas e tecidos, incluindo o sistema nervoso, indo muito além de tão somente promover a regulação da homeostase do cálcio e do metabolismo ósseo. Por ser um hormônio lipossolúvel, a VITD, é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica, sendo o próprio tecido nervoso capaz de sintetizar sua própria VITD, produzindo, o neuroesteroide, ações auto ou parácrinas. Vale enfatizar que a vitamina D apresenta ação pleiotrópica no sistema nervoso, modulando a proliferação e diferenciação celular, sinalização de cálcio, ação neuroprotetora, sinaptogênica, síntese de fatores neurotróficos, incluindo a neurotrofina 3 e o fator neurotrófico derivado da glia (GDNF), liberação de neurotransmissores, atividade antioxidante, ações anti-inflamatórias e de prevenção da morte neuronal (BROWN et al., 2003; CUI; EYLES, 2022; EYLES et al., 2013; FULLARD; DUDA, 2020; NEVEU et al., 1994; WION et al., 1991).

O papel da VITD sobre doenças neurodegenerativa interconecta-se a ação da 1 $\alpha$ ,25-diidroxivitamina D para manutenção do funcionamento adequado neuronal, agindo sobre processos de imunomodulação e desintoxicação, bem como estando, seu receptor nuclear, presente em neurônios e células gliais. Estudos pré-clínicos, clínicos e epidemiológicos apontam uma íntima relação entre a vitamina D e gênese da DP, bem como a relação entre esse grau de deficiência e a gravidade da doença. Embora alguns estudos clínicos sustentem um papel para a neuroproteção de VITD na DP, pesquisa realizada por Shrestha et al. (2016) não corroborou nenhuma associação causal clara entre menor concentração de VITD e risco aumentado para DP. É digno de nota ressaltar o papel que esse pró-hormônio apresenta de regular alguns fatores envolvidos com a ontogenia do sistema dopaminérgico, onde ratos neonatos, cujas mães foram privadas de VITD, apresentaram uma diminuição do volume de dopamina. Além disso, a deficiência de VITD resultou em alteração do metabolismo dopaminérgico no prosencéfalo de ratos, com diminuição da conversão de ácido 3,4-diidroxifenilacético (DOPAC) em ácido homovalínico (HVA). Evidências indicam que o VITD pode não apenas reduzir a extensão da denervação dopaminérgica, mas também oferecer benefício funcional a animais submetidos a um modelo de DP (FULLARD; DUDA, 2020; KESBY et al., 2010; KNEKT et al., 2010; LIMA et al., 2018; LIMA et al., 2022; PERTILE et al., 2016; SHEN; JI, 2015; SHRESTHA et al., 2016; WANG et al., 2016).

A alta prevalência de deficiência de VITD na doença de Parkinson foi observada pela primeira vez por Sato et al. (1997). Desde então, vários estudos demonstraram uma maior prevalência de deficiência e insuficiência de VITD na DP em comparação com os controles. Newmark e Newmark (2007) concluíram que a deficiência crônica de VITD provavelmente está ligada à patogênese ou progressão da DP, em vez de ser apenas uma consequência da doença. Essa hipótese também foi apoiada por um estudo prospectivo realizado por Knekt et al. (2010) na Finlândia, que confirmou que aqueles que tinham concentrações mais altas de vitamina D eram menos propensos a desenvolver DP. Estudo realizado por Lv e colaboradores (2021) evidenciou níveis mais baixos de VITD em pacientes com DP em comparação com controles saudáveis ( $23,60 \pm 7,27$  vs.  $25,60 \pm 5,78$ ,  $p < 0,001$ ); um alto risco de DP foi detectado em indivíduos com deficiência de vitamina D ( $25\text{-(OH)-D} < 20$  ng/mL) (odds ratio, OR = 2,319); e que pacientes com DP e com hipovitaminose D tinham regiões cerebrais mais amplas com amplitude de fração alterada de flutuação de baixa frequência do que outros grupos de DP e os controles saudáveis correspondentes. Os resultados indicaram que baixos níveis de VITD em pacientes com DP têm um impacto na função da rede neural e no córtex cerebral (BARICHELLA et al., 2022; DING et al., 2013; EVATT et al., 2008; KNEKT et al., 2010; LV et al., 2021; NEWMARK; NEWMARK, 2007; PETERSON, 2014; SATO et al., 1997; ZHAO et al., 2013).

Com o intuito de esclarecer o elo mecanístico entre a VITD e a DP uma diversidade de estudos clínicos e pré-clínicos iniciaram sua jornada para tal esclarecimento. Lima et al. (2018) verificaram que a VITD atenua a neurotoxicidade induzida por 6-hidroxidopamina em ratos, protegendo contra a depleção de dopamina e estresse oxidativo, bem como revertendo parcial ou completamente as reduções de imunorreatividades de TH, DAT e TNF- $\alpha$ . Evidências também indicam que a VITD além de abrandar o estresse oxidativo, também é capaz de minorar a extensão da perda de fibras dopaminérgicas e diminuir a disfunção mitocondrial em modelo animal induzido por 6-OHDA. Ademais, estudo realizado por Rcom et al. (2017) reforçou o papel neuroprotetor da vitamina D, que parece ser capaz de inibir a agregação da  $\alpha$ -sinucleína, através da expressão da calbindina-D28k, uma proteína de ligação ao cálcio. Magdy et al. (2022) evidenciaram que a VITD atenuou a neuroinflamação induzida por rotenona e a disfunção da autofagia em ratos com DP através da regulação positiva de Sirt1 e regulação dos níveis de expressão NF- $\kappa$ B. Outrossim, a VITD promoveu a diminuição do estresse oxidativo, da expressão de NF- $\kappa$ B e Nrf2 e

restaurou a função mitocondrial de astrócitos lesionados com rotenona. (ARAÚJO DE LIMA et al., 2022; AZZAM et al., 2022; FULLARD; DE SIQUEIRA, 2022; DUDA, 2022; KOSAKAI et al., 2011; LIMA et al., 2018; MAGDY et al., 2022; RCOM et al., 2017; SHINPO et al., 2000).

## 2. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

Segundo análises populacionais conduzidas pela Organização Mundial da Saúde (OMS), o número de idosos, ao redor do mundo, está crescendo exponencialmente. Estima-se que, até 2050, o número de indivíduos com 65 anos ou mais será de cerca de 1,5 bilhões de pessoas, e que a população mundial com 85 anos ou mais triplicará no mesmo período (DILLIN et al., 2014; NAÇÕES UNIDAS, 2020).

O envelhecimento é um processo intrínseco, ativo e progressivo, altamente complexo, entrelaçado a múltiplas vias e associado a carga gradual de danos moleculares e celulares, que deprimem as reservas morfofuncionais e homeostáticas do ser. A nível celular, a senescência cerebral apresenta várias características biomoleculares importantes que se sobrepõem aos mecanismos etiopatogênicos comuns a diversas doenças neurodegenerativas, como a DP, dentre eles destacam-se o aumento do estresse oxidativo, falha bioenergética, acúmulo intracelular de proteínas, ácidos nucleicos e lipídios danificados oxidativamente, alteração da homeostasia do  $Ca^{+2}$  e neuroinflamação. (LÓPEZ-OTÍN et al., 2016; MATTSON; ARUMUGAM, 2018).

Afetando entre 1-3% da população com mais de 65 anos, a DP é o distúrbio neurológico, que mais cresce globalmente, cujo crescimento ultrapassa o da doença de Alzheimer, estimando-se para o ano de 2040 o acometimento de 12,9 milhões de pessoas, vindo a ser a uma das principais causas de incapacidade neurológica. A DP é uma complexa e heterogênea doença multissistêmica do sistema nervoso, de um curso inevitável e progressivo, com etiopatogenia alicerçada na interação genética-ambiente e cujos mecanismos moleculares envolvem uma infinidade de vias interconectadas, incluindo agregação de  $\alpha$ -sinucleína, neuroinflamação, estresse oxidativo, disfunção mitocondrial e lisossomal, suscetibilidade neuronal seletiva e processos compensatórios inadequados. Evidências científicas apontam a disfunção mitocondrial como agente dominante no início e progressão da DP (BORSCHÉ et al., 2021; CABREIRA; MASSANO, 2019; DORSEY; BLOEM, 2018; FEIGIN et al., 2019; NGUYEN et al., 2019).

A hipovitaminose D é uma afecção prevalente em idosos em todo o mundo. Estudo realizado por Newmark e Newmark (2007), evidenciou que a deficiência crônica de VITD provavelmente está ligada à patogênese ou progressão da DP, em vez de ser apenas uma consequência da doença. O elo mecanístico entre a VITD e a

DP está relacionado com sua ação de regulação da proliferação celular, diferenciação, sinalização de cálcio, ação antioxidante, anti-inflamatórias e na função mitocondrial (CUI; EYLES, 2022; DAWSON-HUGHES et al., 2010; EYLES; BURNE; MCGRATH, 2013; GARCION et al., 2002; NEWMARK; NEWMARK, 2007; PIGNOLO et al., 2022).

Apesar da DP suscitar em o ônus econômico de 51,9 bilhões de dólares, no ano de 2017, as intervenções terapêuticas atualmente disponíveis no mercado são capazes de apenas promover o tratamento sintomático, com eficácia notoriamente mais elevada nos sintomas motores, não apresentando, até o momento, abordagens capazes de diminuir, retardar ou reverter o processo neurodegenerativo. Opções de tratamentos que propiciem tais ações são urgentemente necessárias, visto que à medida que a neurodegeneração progride, durante o curso da doença, o tratamento sintomático não é capaz de prevenir a incapacidade do paciente, levando-o a uma diminuição significativa na sua qualidade de vida (SAARNI et al., 2006; YANG et al., 2020).

Em vista da limitação dos recursos terapêuticos e da intensa prospecção por agentes neuroprotetores, que possam impedir ou retardar o avanço do processo neurodegenerativo, pesquisas sobre o potencial neuroprotetor da VITD, bem como ao entendimento dos mecanismos responsáveis por este, se tornam imprescindíveis para a viabilidade da substância como uma ferramenta neuroprotetora para a DP. Em vista do referido panorama, a presente pesquisa visa avaliar o efeito da suplementação com vitamina D, no modelo animal de DP induzida por lesão estriatal unilateral com 6-hidroxidopamina (6-OHDA), tendo como foco as alterações nas respostas sobre a função mitocondrial e no estresse oxidativo.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo Geral

- Investigar os efeitos da suplementação de VITD sobre as alterações na função mitocondrial e estresse oxidativo, em modelo de DP induzido por injeção estereotáxica unilateral de 6-OHDA.

#### 3.2. Objetivos Específicos

- Avaliar as alterações comportamentais mediadas pela suplementação de VITD, em animais submetidos ao modelo de DP por 6-OHDA, no comportamento rotacional induzido por apomorfina, teste do campo aberto e teste de nado forçado;
- Investigar, *in vitro*, a ação da VITD sobre a função mitocondrial cerebral, por meio da avaliação do *swelling* mitocondrial e do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi$ ).
- Analisar, *in vivo*, a ação da VITD sobre a atividade bioenergética mitocondrial de cérebros de animais submetidos ao modelo de DP por 6-OHDA;
- Examinar, *in vivo*, a ação da VITD sobre a função mitocondrial cerebral de animais submetidos ao modelo de DP por 6-OHDA, por meio da avaliação do *swelling* mitocondrial e do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi$ );
- Determinar os efeitos da VITD sobre a produção de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) mitocondrial e superóxido dismutase (SOD) de cérebros de animais submetidos ao modelo de DP por 6-OHDA;
- Avaliar a imunomarcação para a enzima tirosina hidroxilase (TH), transportador de dopamina (DAT), canal aniônico dependente de voltagem 1 (VDAC1) e proteína de choque térmico 60 (Hsp60) no corpo estriado de ratos hemiparkinsonianos.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Drogas e Reagentes

As drogas utilizadas foram: vitamina D (DePura, colecalciferol - Sanofi, São Paulo, SP, Brasil), suspensa em uma solução aquosa de 1% de Tween 80, antes do uso; 6-hidroxidopamina (6-OHDA) e apomorfina (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA); cetamina (Vetanarcol®, Laboratório König S/A) e; cloridrato de xilazina (Kensol®, Laboratório König S/A). Os anticorpos utilizados foram: tirosina hidroxilase (anti-TH), transportador de dopamina (anti-DAT), canal aniônico dependente de voltagem 1 (anti-VDAC1) e proteína de choque térmico 60 (anti-Hsp60). Com exceção do anticorpo anti-DAT, que foi adquirido da Santa Cruz Biotechnology (TX, EUA), todos os demais foram adquiridos da Sigma-Aldrich (MO, EUA). Para todos os anticorpos, foram utilizadas as diluições de 1:200, seguindo as instruções dos fabricantes. Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

### 4.2. 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 foram mantidos em caixas de polipropileno de 41 cm de comprimento x 34 cm de largura x 18 cm de altura, não sendo fornecido enriquecimento ambiental, com no máximo 6 animais por caixa, à temperatura média de  $24 \pm 2^\circ\text{C}$  em ciclos de alternância claro/escuro de 12 horas, umidade relativa do ambiente de 45-55%, recebendo ração padrão (Nuvilab®, Quimtia, Paraná, Brasil) e água *ad libitum*. As gaiolas foram limpas 2 vezes por semana ou sempre que necessário. Salienta-se que a escolha de utilizar animais machos para a condução do presente estudo é baseada nas evidências do papel neuroprotetor do estrógeno nas fêmeas, bem como nas evidências que sugerem que os genes dos cromossomos sexuais contribuem para o viés masculino na DP (LEE et al., 2019).

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). Os animais foram manuseados gentilmente por pesquisador treinado. O estudo foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará (CEUA-UFC), com protocolo sob nº 3397010219 (ID 001371) (anexo 1).

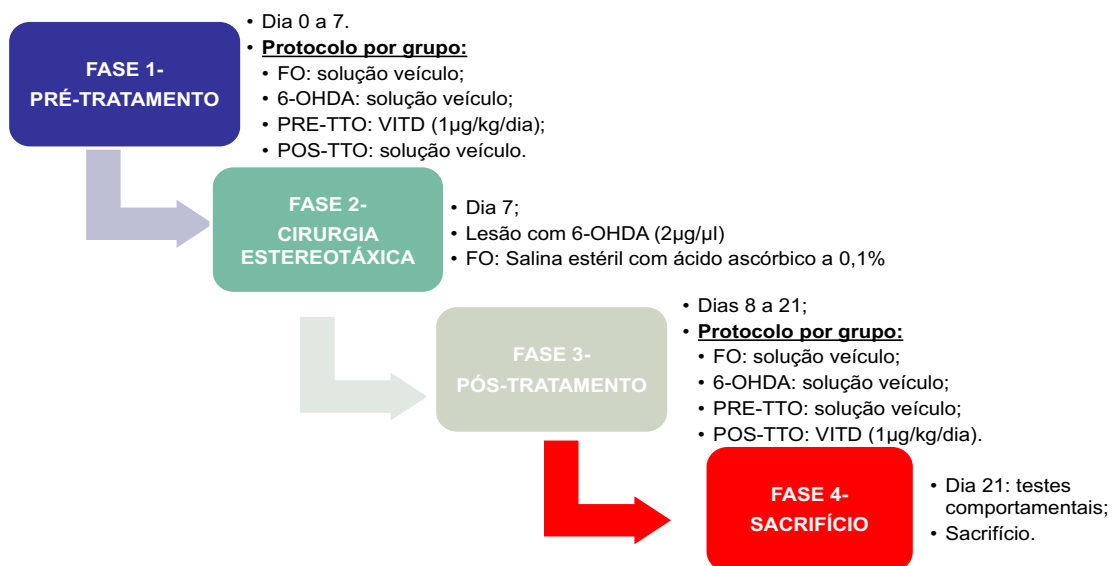
### 4.3. Protocolo experimental



Os animais foram divididos em 4 grupos experimentais: Falso Operado (FO), lesionado com 6-hidroxidopamina (6-OHDA), pré-tratamento com VITD + lesão com 6-OHDA (PRE-TTO) e lesão com 6-OHDA + pós-tratamento com VITD (POS-TTO). Após divisão, realizada de forma randomizada, os animais foram submetidos ao protocolo experimental.

O protocolo experimental foi subdividido em 4 fases, como demonstrado no esquema 1. Os grupos FO e 6-OHDA foram tratados diariamente, por gavagem, com 0,2 mL de soro fisiológico, contendo 0,5% de Tween 80 (solução veículo). O grupo PRE-TTO foi tratado com 1 µg/kg/dia de vitamina D (dissolvida no veículo), por 7 dias, antes da cirurgia. O grupo POS-TTO foi tratado com 1µg/kg/dia de vitamina D (dissolvida no veículo), por 14 dias, sendo o tratamento iniciado após a cirurgia. Todos os animais, no sétimo dia do protocolo experimental, foram submetidos a cirurgia estereotáxica e infusão da toxina 6-OHDA, exceto os do grupo FO, onde foi realizada infusão de soro fisiológico. Salienta-se que, todos os tratamentos foram realizados por via oral (gavagem), entre as 9:00 da manhã e as 10:00 da manhã, sendo os animais pesados diariamente e as doses ajustadas de acordo com às variações de peso. Ao vigésimo primeiro dia do protocolo experimental os animais de todos os grupos foram submetidos aos testes comportamentais, sendo posteriormente eutanasiados e as áreas de interesse retiradas para os estudos *ex-vivo* e ensaios imuno-histoquímicos.

Esquema 1: Protocolo experimental



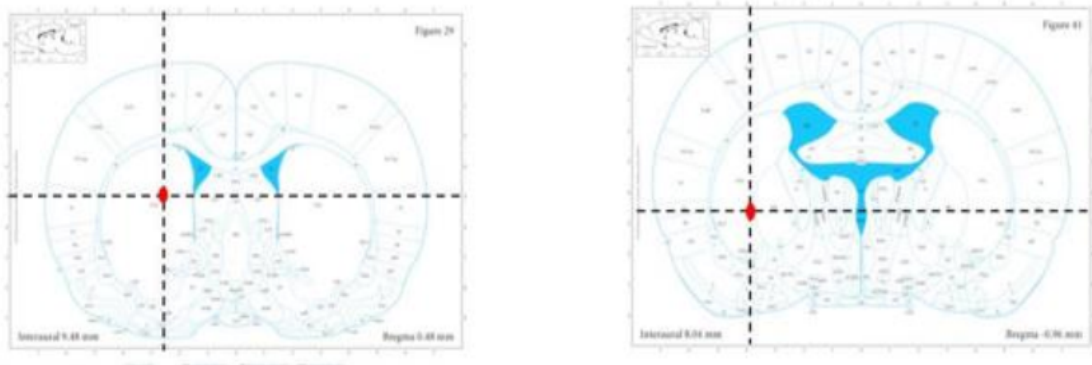
Além disso, neste protocolo experimental também utilizou-se ratos *naive* para experimentos *in vitro* da avaliação da função mitocondrial cerebral.

#### **4.4. Cirurgia Estereotáxica (UNGERSTEDT, 1968)**

O modelo experimental de lesão do corpo estriado foi proposto por Ungerstedt (1968). Os animais foram anestesiados com xilazina (20mg/kg via intraperitoneal, i.p.) e cetamina (80mg/kg via intraperitoneal, i.p.). Após sedação, foi realizada tricotomia da região superior da cabeça e, posteriormente, fixação do animal ao aparelho estereotáxico (Insight Instruments, Ribeirão Preto - SP, Brasil). Em seguida realizou-se incisão de aproximadamente 2 cm de comprimento com um bisturi, no alto do crânio, expondo-se as suturas ósseas cranianas, com o objetivo de localizar o bregma. Três coordenadas de acesso ao corpo estriado foram marcadas de acordo com o atlas de PAXINOS; WATSON (1984).

Após demarcação dos pontos, realizou-se perfurações no crânio do animal com uma broca de baixa rotação (Dremel) em cada marcação, permitindo assim entrada da seringa Hamilton diretamente no corpo estriado. As lesões foram feitas unilateralmente, apenas no corpo estriado direito dos animais (AP 0,9/1,4; ML 3,8; DV 3,3 a partir do bregma), de acordo com o atlas de Paxinos e Watson (2006) e ilustrado na figura 8. Os animais receberam duas micro injeções de 6-OHDA de 1µL de solução de 6-OHDA (dissolvida em salina 0,9%, contendo 0,2% de ácido ascórbico) na dose de 12µg/µL. A seringa foi deixada no local de aplicação por 5 minutos para assegurar que o seu conteúdo tenha sido injetado corretamente. Em seguida, os animais foram suturados com fio cirúrgico de algodão e o local desinfetado com iodo povidine. Salienta-se que 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, seguida de infusão de soro fisiológico com ácido ascórbico a 0,2 % (veículo para 6-OHDA).

Figura 8: Representação esquemática representativa das 2 coordenadas estereotáticas para injeção intracraniana de 6-OHDA no corpo estriado.



Fonte: PAXINOS; WATSON, 2006 (adaptado); Legenda: Os tracejados indicam as coordenadas médio-lateral e dorsoventral. Coordenadas anteroposteriores aproximadas, de acordo com as lâminas disponíveis no atlas.

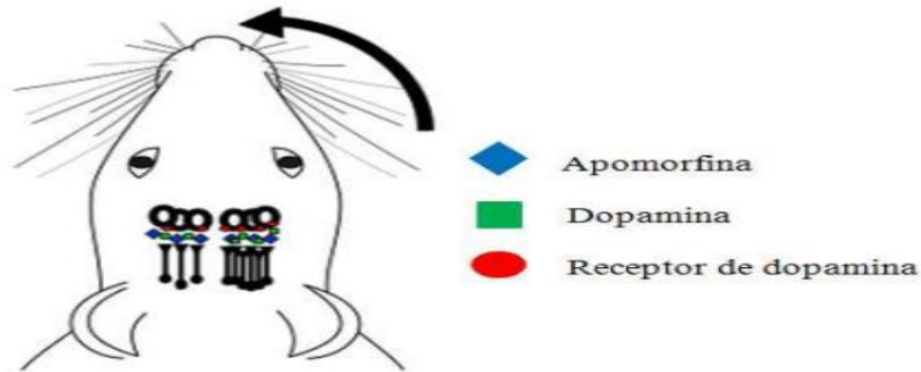
## 4.5. Testes Comportamentais

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

A gravidade da depleção de dopamina foi avaliada pelo comportamento rotacional induzido pelo agonista dopaminérgico apomorfina (figura 9). Este é um teste sensível para lesões estriatais com extensões maiores que 80%. A apomorfina induz o movimento rotacional para o lado contralateral a lesão causada pela injeção unilateral de 6-OHDA no corpo estriado (DEUMENS et al., 2002; UNGERSTEDT, 1971).

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).

Figura 9: Representação da perda parcial de receptores de neurônios dopaminérgicos estriatais.



Fonte: WIETZIKOSKI, 2006.

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

O teste de campo aberto é usado para analisar a locomoção, ansiedade e comportamentos estereotipados de roedores, tais como *grooming* e *rearing*. O aparato consiste em uma arena quadrada de acrílico preto (50 x 50 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.

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

O teste do nado forçado é um dos protocolos mais amplamente e frequentemente utilizados para avaliação 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 (CRYAN; HOLMES, 2005).

## **4.6. Avaliação da Função Mitocondrial**

### **4.6.1. Isolamento Mitocondrial**

As mitocôndrias cerebrais foram isoladas tanto de ratos *naives* (protocolo *in vitro*) como de ratos submetidos ao modelo de DP (protocolo *ex-vivo*). Após a realização dos testes comportamentais os animais foram eutanasiados, por decapitação com guilhotina (Harvard, USA), sendo o encéfalo do animal retirado rapidamente. Logo em seguida a estrutura foi acomodada sobre placa de gelo, para então isolar-se o cérebro, material utilizado para o protocolo de isolamento mitocondrial conforme descrito por Tahara e colaboradores (2009). A amostra foi então lavada e picotada, com auxílio de tesoura, em tampão contendo 125 mM de sacarose, 250 mM de manitol, 10 mM de HEPES, 10 mM de EGTA, 0,01% de BSA (pH 7,2; 4°C), sendo posteriormente a solução transferida para um triturador de tecido de vidro e homogeneizador.

Seguindo este procedimento inicial, o homogenato foi alocado em tubos *ependorf* frio e as amostras centrifugadas (2000 x g / 3 min). Após a primeira centrifugação, transferiu-se o sobrenadante para um novo tubo *ependorf* frio e submetendo a amostra a uma nova centrifugação (12.000 x g / 8 min). Ao fim da segunda centrifugação, ressuspendeu-se a fração precipitada em 200uL do tampão de isolamento e na presença de 0,1% de digitonina, para viabilizar a liberação das mitocôndrias de sinaptossomas. O sedimento resultante contendo mitocôndrias foi ressuspenso em tampão sem EGTA ao passo que o sobrenadante foi coletado como a fração citosólica e usado para aferir a atividade da SOD citosólica (TAHARA et al., 2009). A concentração de proteína mitocondrial foi determinada espectrofotometricamente de acordo com protocolo de Bradford (1976), com BSA como padrão.

### **4.6.2. Delineamento experimental do protocolo *in vitro***

Após o isolamento das mitocôndrias cerebrais dos ratos *naives*, o *pool* mitocondrial foi exposto a diferentes concentrações de solução de vitamina D (0, 1, 10 ou 100 ng/L) e/ou 6-OHDA (1 µg/mL) e/ou rotenona (1 µg/mL), durante um minuto,

sendo em seguida as amostras utilizadas para ensaios de teste de *swelling* mitocondrial e potencial de membrana mitocondrial.

#### **4.6.3. Swelling mitocondrial**

As alterações na dispersão da luz devido à absorção e inchaço via influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  foram medidas através da diminuição, ao longo do tempo, da densidade óptica, aferida por espectrofotometria e em comprimento de onda de 540 nm.

O *pool* mitocondrial foi incubado em tampão contendo 150mM de KCl, 10mM de Hepes, 2mM de succinato, 2mM de  $\text{MgCl}_2$ , 2mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$  de oligomicina, pH 7,2 (KOH). Para induzir a abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial, adicionou-se 2 $\mu\text{M}$  de  $\text{Ca}^{2+}$ . Salienta-se que a dispersão de luz foi aferida por 5 minutos.

#### **4.6.4. Determinação do potencial de membrana mitocondrial**

O potencial transmembrânico mitocondrial ( $\Delta\Psi\text{m}$ ) foi determinado pelas alterações na média da intensidade de fluorescência (FL2), para tal, as mitocôndrias foram marcadas com Rodamina (Rho123 - 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) por 15 minutos e analisadas em citômetro de fluxo. Os resultados foram representados como intensidade de fluorescência relativa, calculada dividindo os valores de intensidade de fluorescência dos grupos pela média da intensidade do grupo controle. Assim, o grupo controle recebeu valores de IRF arbitrários iguais a 1,0 (O'CONNOR et al., 1998).

Faz-se necessário salientar que, no protocolo *in vitro* os isolados mitocondriais foram tratados previamente com vitamina D em diferentes concentrações (0,1; 1,0 e 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e com rotenona 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (MATTIASSON, 2004) ou 6-OHDA 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

#### **4.6.5. Consumo de oxigênio mitocondrial**

O consumo de oxigênio, em suspensões mitocondriais, foi aferido por meio de eletrodo de oxigênio do tipo Clark conectado a um sistema de aquisição de dados de computador (Oxygraph-Hansatech, Reino Unido), em câmara fechada e termostaticada (1mL), equipada com agitador magnético. Esse tipo de eletrodo compreende um cátodo de platina e um ânodo de prata, imersos numa solução eletrolítica (KCl). A superfície do cátodo é revestida por uma fina membrana de teflon ou polietileno, que são permeáveis ao oxigênio. Quando uma pequena voltagem é

aplicada entre os eletrodos, a platina torna-se negativa em relação à prata, tornando-se polarizada. O oxigênio é então reduzido a peróxido de hidrogênio na superfície da platina, funcionando como aceptor de elétrons. A corrente gerada pela diferença dos eletrodos é relacionada estequiometricamente à concentração de O<sub>2</sub> na superfície do cátodo. Os impulsos elétricos são transmitidos ao oxígrafo, o qual é conectado a um computador onde é feita a leitura.

Para tal, os isolados mitocôndrias foram ressuspensos em tampão de respiração (75mM de manitol, 25mM de sacarose, 100mM de KCl, 20mM de Tris-HCl, 5mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 1mg/ml de BSA livre de ácidos graxos, pH 7,2). Utilizou-se succinato (10mM), rotenona (1μM) ou glutamato (5mM) e malato (2,5mM) como substratos metabólicos para os complexos I e II, respectivamente. Em seguida, o estado 3 foi induzido pela adição de 500μM de ADP que fornece o estado de capacidade de fosforilação oxidativa. Para induzir o estado 4, adicionou-se 1 μg/ml de oligomicina, agente inibidor do complexo V, ou complexo ATP sintase, da cadeia respiratória. A concentração média, em todos os experimentos, de proteína foi de 233,7 μg/mL.

#### ***4.6.6. Razão de controle respiratório mitocondrial cerebral (RCR)***

As taxas de respiração mitocondrial foram calculadas como a derivada temporal negativa da concentração de oxigênio para os estados 3 e 4. A razão do controle respiratório mitocondrial (RCR) foi calculada como sendo a razão do Estado 3 (induzido por ADP)/Estado 4 (induzido por oligomicina).

#### ***4.6.7. Síntese de ATP e razão de consumo de oxigênio (ADP/O)***

A relação entre a síntese de ATP e o consumo de oxigênio (ADP/O) em cada amostra foi calculada medindo-se a diminuição da concentração de oxigênio durante a rápida explosão da respiração do estado 3 após a adição de 80 μmol de ADP no tampão respiratório (75 mM de manitol, 25 mM de sacarose, 100 mM KCl, 20 mM Tris-HCl, 5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 1 mg/mL de BSA livre de ácidos graxos, pH 7,2). A razão ADP/O foi calculada utilizando-se a quantidade de ADP adicionada sobre o oxigênio consumido no estado 3, usando 10 mM de succinato como substrato energético.

### **4.7. Avaliação do Estresse Oxidativo**

#### **4.7.1. Determinação da produção mitocondrial de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ )**

As amostras foram preparadas em condições idênticas às do estudo polarográfico. As mitocôndrias, suspensas em tampão respiratório, foram incubadas (amostras protegidas da luz), durante 30 min a 37°C, na presença ou ausência de diferentes substratos ou inibidores usando os mesmos tempos de incubação do estudo polarográfico. O peróxido de hidrogênio convertido foi medido usando 5  $\mu$ M de Amplex red (Molecular Probes, Eugene, Oregon, EUA) e 1 U/ml de HRP, por meio de incubação. Após o período de incubação, os tubos foram centrifugados a 5000 x g durante 2 min e a absorbância medida a 560 nm. A absorbância do branco foi determinada incubando Amplex Red e HRP sem a amostra. A produção de  $H_2O_2$  foi calculada a partir de uma curva padrão gerada a partir de concentrações conhecidas de  $H_2O_2$ .

#### **4.7.2. Determinação da concentração da enzima superóxido dismutase (SOD)**

A atividade da enzima SOD foi avaliada medindo-se sua capacidade de inibir a redução fotoquímica do azul de nitrotetrazólio (NBT) (BEAUCHAMP; FRIDOVICH, 1971).

Para tal, utilizou-se o sobrenadante, resultante do processo de isolamento mitocondrial, foi utilizado para a determinação da atividade de SOD total, via ensaio NTB. O sobrenadante foi adicionado a um meio de reação contendo 0,1 mM de EDTA, 13 mM de L-metionina e 75 mM de nitro azul tetrazólio (NBT), em tampão fosfato de potássio (pH 7,8). A reação foi iniciada pela adição de 2  $\mu$ M de riboflavina e exposta uniformemente a uma luz branca não filtrada por 10 minutos. Ao término do tempo, o material foi lido em espectrofotômetro 560 nm. Os resultados serão expressos em unidades da enzima (U/mg de proteína), que é a quantidade de SOD necessária para inibir a taxa de redução do NBT em 50%.

#### **4.8. Determinação da concentração de proteínas**

O teor de proteína total em cada amostra foi estimado usando o método de Bradford (1976). O princípio do método baseia-se na determinação da concentração de ligações peptídicas através da medida da absorbância do complexo proteína-corante. Este complexo absorve em comprimento de onda de 595 nm. A absorbância foi considerada diretamente proporcional à concentração de proteína na solução



analisada, onde uma solução de albumina de soro bovino (BSA) foi utilizada como padrão.

#### **4.9. Imunohistoquímicas**

Essas medidas foram realizadas em 3 animais por grupo, e as fatias de estriado (5  $\mu\text{m}$ ) foram processadas para os ensaios imuno-histoquímicos. Após o processamento, os cortes foram observados em microscópio óptico, com objetivas de 20x ou 40x, e de cada lâmina foram capturadas de 4 a 6 imagens. Essas imagens foram analisadas pelo software ImageJ (NIH, EUA) e as medidas de densidade óptica foram realizadas a partir de cinco campos para cada imagem.

##### ***4.9.1. Ensaios imunohistoquímicos para tirosina hidroxilase (TH) e transportador de dopamina (DAT), em estriados de ratos hemiparkinsonianos***

A TH é a enzima limitante da taxa de biossíntese de catecolaminas, uma vez que ela converte a L-tirosina em L-3,4-diidroxifenilalanina (L-DOPA), que é um precursor da dopamina, enquanto o DAT é um transportador transmembranar que controla a recaptação de dopamina extracelular em neurônios pré-sinápticos e regula os níveis sinápticos de dopamina no corpo estriado. Assim, ambas as proteínas podem ser consideradas marcadores neuronais dopaminérgicos. Os cortes do corpo estriado foram lavados três vezes, com tampão de Tris 0,05 M (pH 7,6), e o bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com 3% de  $\text{H}_2\text{O}_2$  em 10% de metanol em tampão de Tris, por 15 min, lavando-os por 3 vezes. As fatias foram pré-incubadas por 30 min, com 5% de soro de cabra em 0,3% de Triton, sendo posteriormente incubadas com o anticorpo primário (anticorpo monoclonal não conjugado anti-TH produzido em camundongo, ou com o anticorpo policlonal não conjugado anti-DAT produzido em coelhos). Em seguida, após três lavagens com tampão de Tris, os cortes foram incubados com o anticorpo secundário (IgG de cabra anti-coelho biotilado - 1:200, DAKO), por 2 h, lavados novamente três vezes com tampão de Tris e então desenvolvidos com diaminobenzidina 0,05% em 0,03 %  $\text{H}_2\text{O}_2$  (5–10 min). Após lavagem com água destilada, as lâminas foram montadas em meio aquoso e cobertas com lamínula, para posterior exame em microscópio óptico (Nikon Eclipse da Nikon Corporation, Tóquio e NY, EUA).

#### **4.9.2. Ensaio de imuno-histoquímica para o canal aniônico dependente de voltagem 1 (VDAC1) e proteína de choque térmico 60 (Hsp60) no estriado de ratos hemiparkinsonianos**

O dobramento incorreto da  $\alpha$ -sinucleína e a disfunção mitocondrial são considerados dois dos principais contribuintes para a doença de Parkinson. VDAC1, componente principal da membrana mitocondrial externa, é reconhecido por regular funções mitocondriais, e regular negativamente a resposta ao acúmulo e agregação de  $\alpha$ -sinucleína (CHU et al., 2014; RISIGLIONE et. al., 2021). Além disso, foi demonstrado papel deletério das Hsp60 em neurônios dopaminérgicos (NOELKER et al., 2014). Esses dados nos levam a investigar a participação dessas proteínas na função mitocondrial de ratos hemiparkinsonianos. O procedimento foi o mesmo descrito para a TH e DAT, exceto para os anticorpos primários, anti-VDAC1 e anti-HSP60 não conjugados, produzidos em coelhos (Sigma-Aldrich, EUA), em 2% NGS/TB, durante a noite a 4 °C.

#### **4.10. Análise Estatística**

Todos os dados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. Para os testes comportamentais, de avaliação da função mitocondrial (exceto para potencial de membrana mitocondrial) e avaliação do estresse oxidativo, utilizou-se ANOVA de uma via, seguida do teste *post hoc* de Tukey para comparações múltiplas. Para os dados obtidos nos testes de potencial de membrana mitocondrial a análise deu-se usando o teste ANOVA de uma via, seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni. Ao passo que para os dados imunohistoquímicos (avaliados com o software Image J, do NIH, EUA, primeira versão), utilizou-se os testes de comparações múltiplas de Kruskal-Wallis e Dunn. O limite para significância estatística foi estabelecido em  $p < 0,05$ . Todas as análises estatísticas foram realizadas com o *GraphPad Prism* (Versão 9.0).

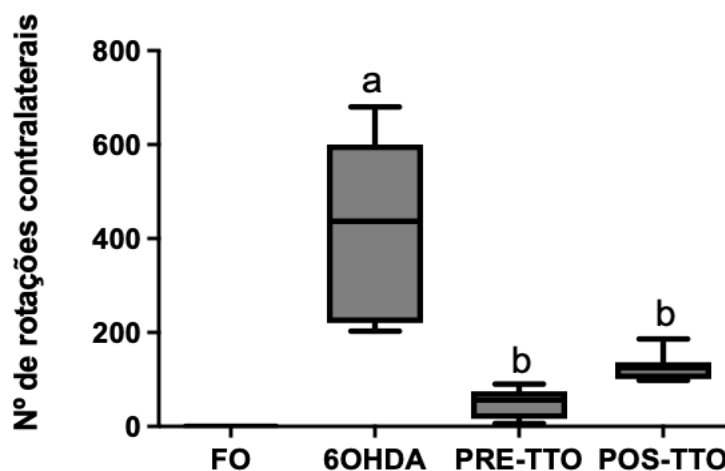
## 5. RESULTADOS

### 5.1. Estudos Comportamentais

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

Os animais que somente receberam as injeções de 6-OHDA no corpo estriado apresentaram um aumento significativo do número de movimentos estereotipados de rotação na direção contralateral induzidas pela administração de apomorfina (FO:  $0,0 \pm 0,0$ ; 6-OHDA:  $412,9 \pm 70,25$ ) (figura 10). Todavia, a suplementação com vitamina D, tanto nos animais do grupo PRE-TTO ( $49,0 \pm 11,88$ ) como nos POS-TTO ( $126,7 \pm 11,34$ ), promoveu redução no número de rotações contralaterais em relação aos animais somente lesionados (6-OHDA).

Figura 10: 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.



Legenda: As barras representam a média  $\pm$  E.P.M (n= 7 animais/grupo). A análise dos resultados foi feita através de ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey. Valores significativos: a  $p < 0,0001$  vs FO; b  $p < 0,0001$  vs 6OHDA.

#### 5.1.2 Efeito da suplementação com VIT D sobre a atividade locomotora em ratos submetidos ao modelo de DP induzido por 6-OHDA

Os animais pertencentes aos grupos de 6-OHDA ( $11,25 \pm 1,57$ ) apresentaram hipolocomoção, evidenciada pela redução no número de cruzamentos, em relação ao grupo controle (FO=  $20,75 \pm 1,46$ ). Entretanto, os grupos PRE-TTO ( $17,38 \pm 2,90$ ) e POS-TTO ( $15,38 \pm 3,00$ ) não apresentaram diferença estatística relevante quando comparados aos grupos FO e 6OHDA (figura 11).

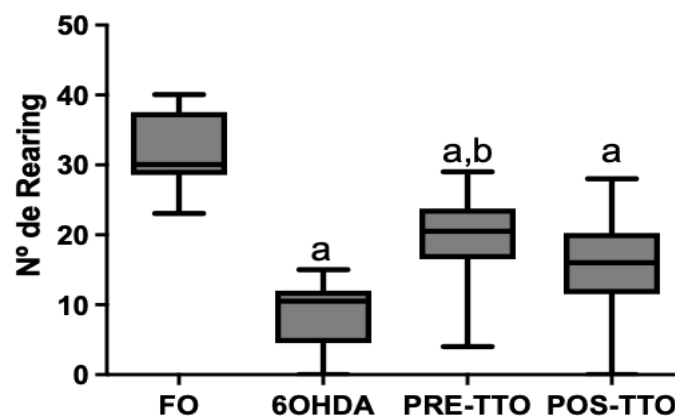
Figura 11: Efeito da suplementação com vitamina D sobre o número de cruzamentos no teste do campo aberto em ratos com lesão estriatal induzida por 6-OHDA.



Legenda: As barras representam a média  $\pm$  E.P.M ( $n= 8$  animais/grupo). A análise dos resultados foi feita através de ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey. Valores significativos: **a**  $p<0,0001$  vs FO; **b**  $p<0,0001$  vs 6OHDA.

A lesão promovida pela neurotoxina 6-OHDA promoveu redução na atividade exploratória vertical, avaliando-se o número de *rearing* no teste de campo aberto, ao comparar os animais lesionados com o grupo FO (FO =  $31,63 \pm 1,99$ ; 6OHDA =  $9,00 \pm 1,77$ ) (figura 12). Entretanto a suplementação preventiva com vitamina D (PRE-TTO =  $19,38 \pm 2,60$ ) desencadeou aumento significativo na atividade exploratória vertical comparado ao grupo 6-OHDA, comportamento não evidenciado nos animais submetidos a suplementação posterior a lesão estriatal (POS-TTO =  $15,38 \pm 2,87$ ).

Figura 12: 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.



Legenda: As barras representam a média  $\pm$  E.P.M (n= 8 animais/grupo). A análise dos resultados foi feita através de ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey. Valores significativos: **a**  $p < 0,001$  vs FO; **b**  $p < 0,05$  vs 6OHDA.

No que concerne ao comportamento de autolimpeza (*grooming*) (figura 13) tanto os animais lesionados, 6-OHDA ( $1,50 \pm 0,56$ ), como os POS-TTO ( $1,87 \pm 0,35$ ) aumentaram significativamente o número de *grooming* quando comparados aos do grupo FO ( $0,12 \pm 0,12$ ). O grupo PRE-TTO ( $1,37 \pm 0,18$ ) não distinguiu estatisticamente do grupo controle e 6OHDA.

Figura 13: 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.

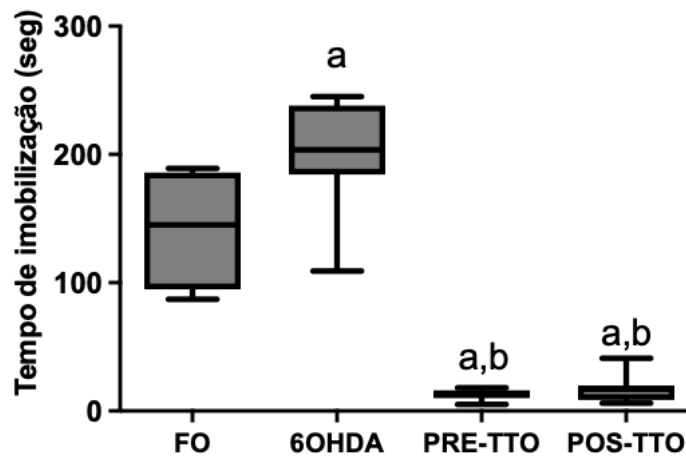


Legenda: As barras representam a média  $\pm$  E.P.M (n= 8 animais/grupo). A análise dos resultados foi feita através de ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey. Valores significativos: **a**  $p < 0,05$  vs FO.

### 5.1.3. Efeito da suplementação com VITD sobre o comportamento tipo depressivo em ratos com lesão unilateral por 6-OHDA

A lesão pela neurotoxina promoveu aumento no tempo de imobilidade (6-OHDA= $200,0 \pm 15,44$ ) em relação ao grupo controle (FO= $142,0 \pm 15,44$ ). Por sua vez, a suplementação com VITD, em ambos os protocolos, reverteu esse resultado, apresentando uma redução de 93,75% no grupo PRE-TTO ( $12,5 \pm 1,48$ ) e de 91,25% no grupo POS-TTO ( $17,50 \pm 3,84$ ) quando comparados aos ratos 6OHDA, como mostrado na figura 14.

Figura 14: Efeito da suplementação com vitamina D na avaliação do comportamento depressivo em ratos com lesão estriatal induzida por 6-OHDA



Legenda: As barras representam a média  $\pm$  E.P.M (n= 8 animais/grupo). A análise dos resultados foi feita através de ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey. Valores significativos: **a**  $p < 0,005$  vs FO; **b**  $p < 0,0001$  vs 6OHDA.

## 5.2. Avaliação da Função Mitocondrial – *in vitro*

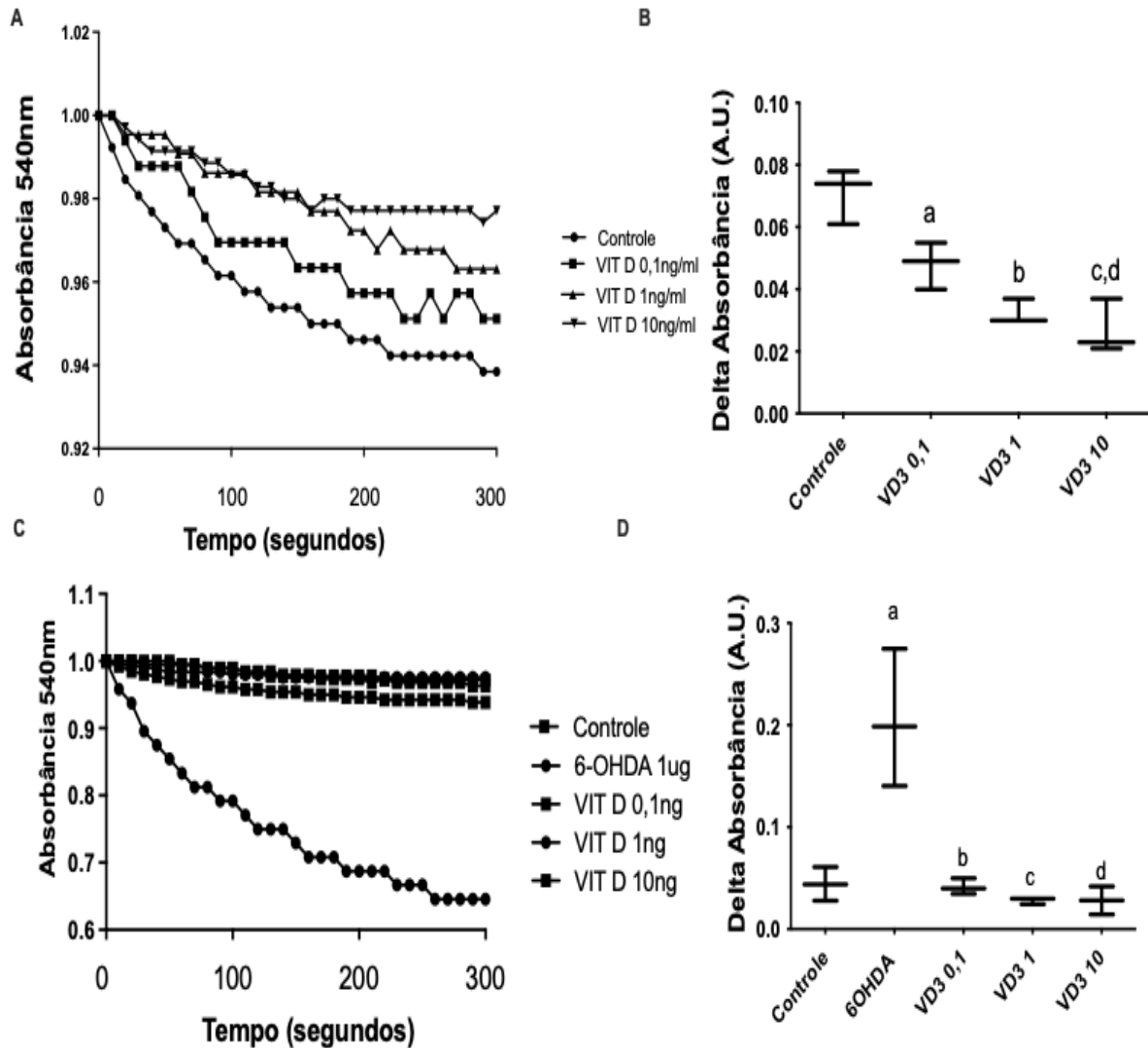
Foram avaliadas, *in vitro*, o efeito da vitamina D na suscetibilidade à abertura do mPTP, através da amplitude e taxa de *swelling* mitocondrial após a adição de cálcio, na presença e ausência de 6-OHDA, bem como o efeito nas flutuações de potencial elétrico transmembranar ( $\Delta\Psi$ ).

### 5.2.1. Ação da vitamina D sobre o inchamento de mitocôndrias cerebrais (*swelling* mitocondrial) na presença e ausência de 6-OHDA.

Como apresentado na figura 15, a adição de vitamina D (0,1, 1,0 e 10,0 ng/mL), em amostras de suspensão mitocondrial pré-incubada em meio contendo cálcio e succinato, atenuou a variação da absorbância inicial monitorada (figura 15.A), em relação ao grupo controle, diminuindo de modo dose dependente o *swelling* mitocondrial (32, 58 e 62%, respectivamente), em comparação com o grupo Controle (figura 15.B). Em contraste com o exposto acima, a adição de 6-OHDA, em suspensão mitocondrial nas mesmas condições experimentais, desencadeou diminuição abrupta da absorbância inicial monitorada, em relação ao grupo controle (figura 15.C), promovendo um inchamento osmótico mitocondrial com amplitude cerca de 5x maior (figura 15.D). Entretanto, as amostras foram incubadas com vitamina D, juntamente com 6-OHDA, apresentaram manutenção da absorbância (figura 15.C e D),

diminuindo contudentemente o inchaço das mitocôndrias para valores semelhantes (VD3: 0,1 ng/mL) ou até menores (VD3: 1 e 10 ng/mL) do que o apresentado pelo grupo Controle.

Figura 15: Avaliação do efeito da vitamina D no *swelling* mitocondrial durante a indução do mPTP das mitocôndrias cerebrais na presença e na ausência de 6-OHDA.

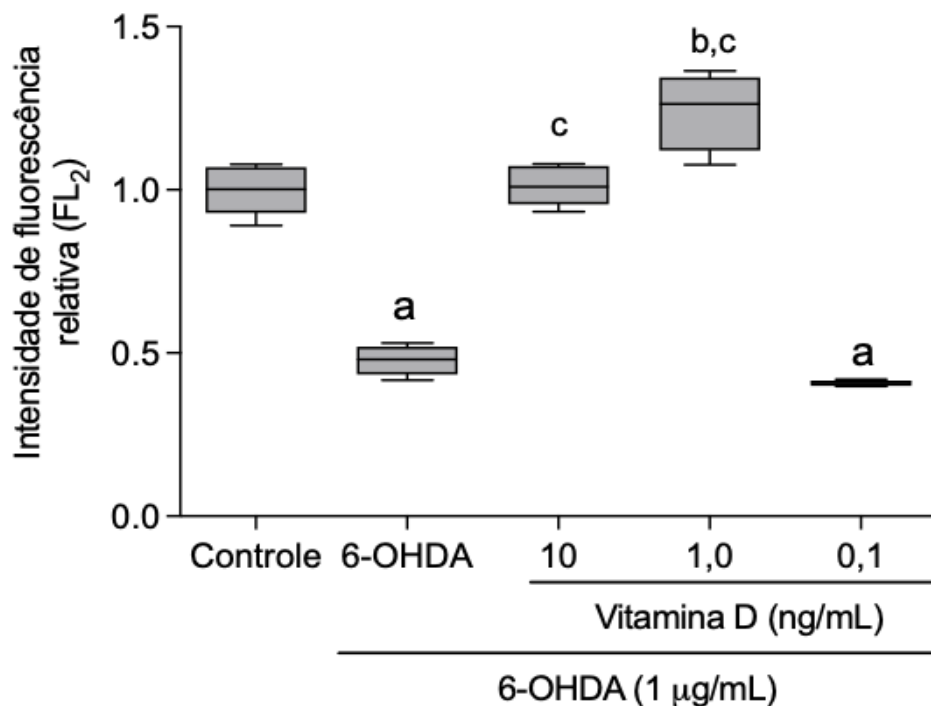


Legenda: As barras representam a média  $\pm$  E.P.M (n= 8 animais/grupo). A análise dos resultados foi feita através de ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey. Valores significativos: **a**  $p < 0,005$  vs FO; **b**  $p < 0,0001$  vs 6OHDA.

### 5.2.2. Ação da vitamina D sobre o $\Delta\Psi$ , de mitocôndrias cerebrais, na presença de 6-OHDA ou rotenona.

Com relação à análise da intensidade de fluorescência relativa, a indução com 6-OHDA reduziu a fluorescência relativa ao acúmulo de Rho123 nas mitocôndrias em torno da metade, reduzindo a IRF para  $0,48 \pm 0,02$  em comparação com o controle ( $1,00 \pm 0,03$ ). O tratamento com vitamina D foi capaz de reverter a despolarização do  $\Delta\Psi_m$  nas concentrações de 10 ng/mL ( $1,01 \pm 0,02$ ) e 1,0 ng/mL ( $1,24 \pm 0,04$ ). A análise estatística está representada na figura 16. Em seguida estão apresentados, respectivamente os histogramas representativos das populações de mitocôndrias analisadas na citometria. A linha preta representa a população do grupo controle, a linha vermelha representa o grupo induzido apenas com 6-OHDA e a linha azul representa os grupos tratados com VD3 0,1; 1,0 e 10 ng/mL, respectivamente figuras 17-19.

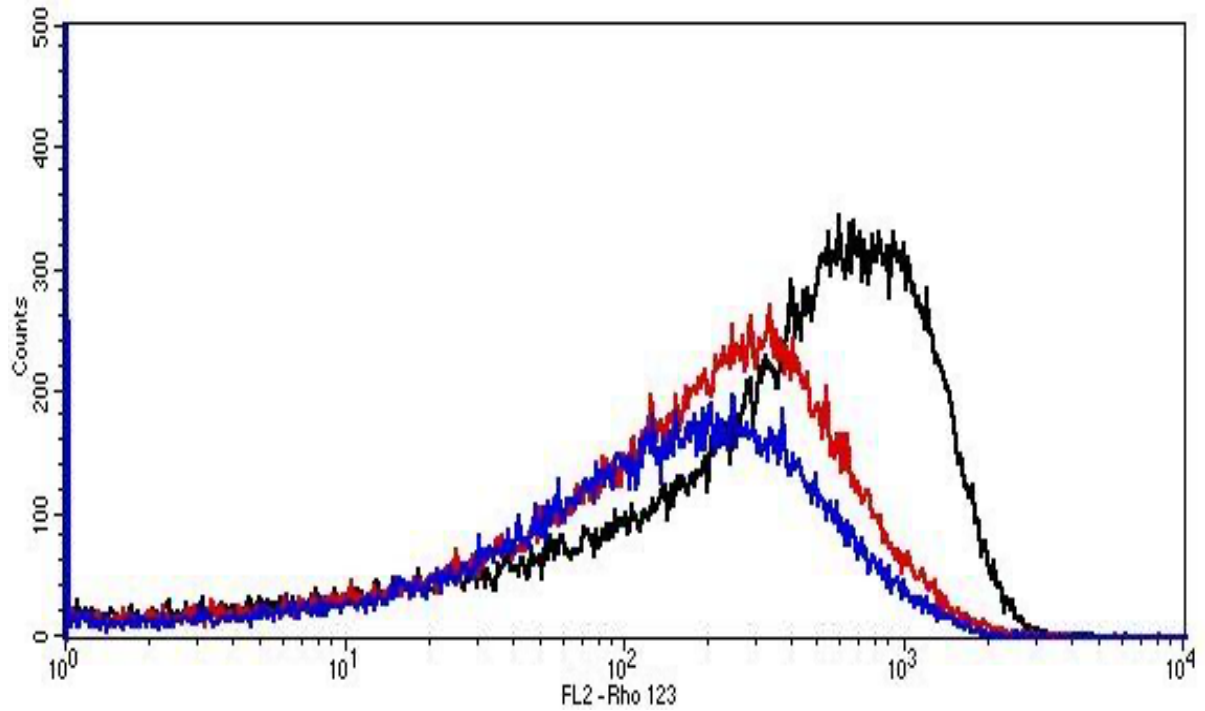
Figura 16: Análise do potencial transmembrânico de mitocôndrias cerebrais, na presença de 6-OHDA e VD3, por citometria de fluxo através do ensaio utilizando a Rodamina 123.



Legenda: Os dados são expressos como fluorescência relativa ao controle  $\pm$  E.P.M. A análise dos resultados foi feita através de ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Bonferroni. Valores significativos: **a**  $p < 0,0001$  vs FO; **b**  $p < 0,001$  vs FO; **c**  $p < 0,0001$  vs 6OHDA.

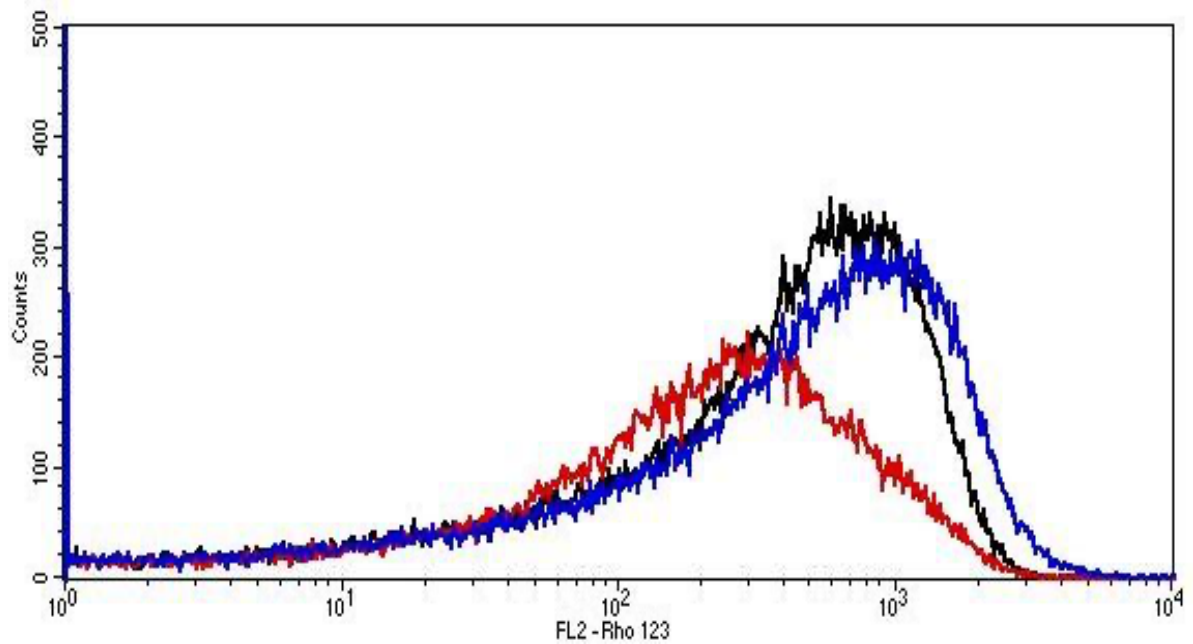


Figura 17: Histograma representativo do ensaio com Rodamina 123, apresentando o grupo tratado com VD3 0,1 ng/mL.



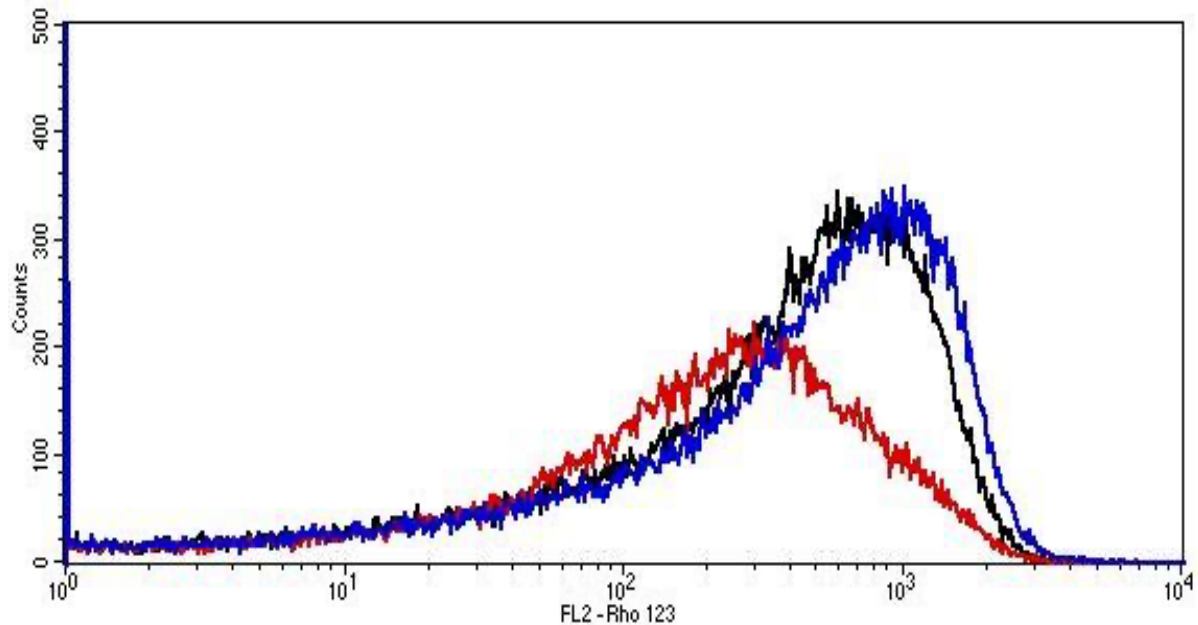
Legenda: A linha preta representa a população do grupo controle, a linha vermelha representa o grupo induzido apenas com 6-OHDA e a linha azul representa os grupos tratados com VD3 0,1 ng/mL.

Figura 18: Histograma representativo do ensaio com Rodamina 123, apresentando o grupo tratado com VD3 1 ng/mL.



Legenda: A linha preta representa a população do grupo controle, a linha vermelha representa o grupo induzido apenas com 6-OHDA e a linha azul representa os grupos tratados com VD3 1 ng/mL

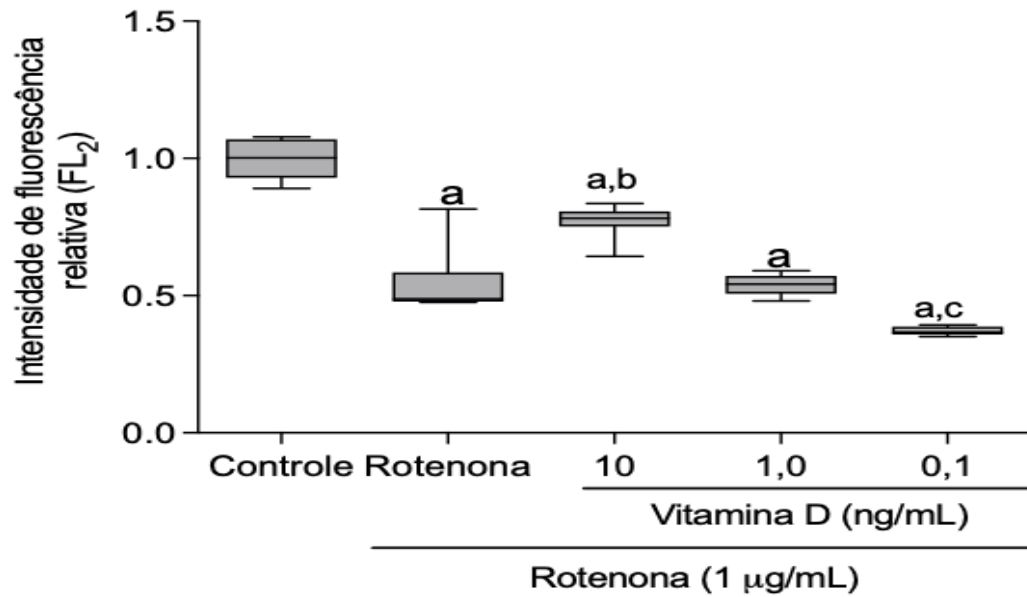
Figura 19: Histograma representativo do ensaio com Rodamina 123, apresentando o grupo tratado com VD3 10 ng/mL.



Legenda: A linha preta representa a população do grupo controle, a linha vermelha representa o grupo induzido apenas com 6-OHDA e a linha azul representa os grupos tratados com VD3 0,1 ng/mL.

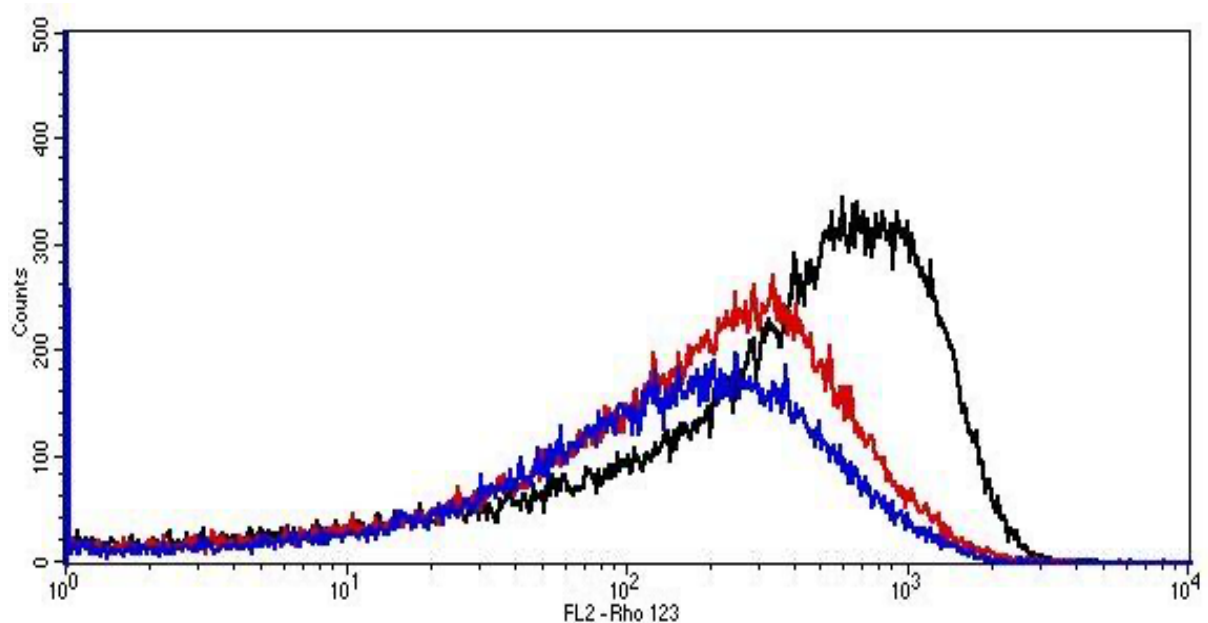
A indução de despolarização mitocondrial com rotenona foi capaz de reduzir a intensidade de fluorescência relativa ao  $\Delta\Psi_m$  em torno de 55 % (IRF =  $0,54 \pm 0,05$ ) em comparação com o controle ( $1,00 \pm 0,03$ ), conforme demonstrado na da figura 20. Neste modelo, apenas o tratamento com a vitamina D 10 ng/mL foi capaz de reverter a despolarização mitocondrial (IRF =  $0,77 \pm 0,02$ ). Nos histogramas representativos das populações de mitocôndrias analisadas na citometria, a linha preta representa a população do grupo controle, a linha vermelha representa o grupo induzido apenas com rotenona e a linha azul representa os grupos tratados com Vitamina D 0,1; 1,0 e 10 ng/mL, respectivamente figuras 21 - 23.

Figura 20: Análise do potencial transmembrânico de mitocôndrias cerebrais, na presença de rotenona e VD3, por citometria de fluxo através do ensaio utilizando a Rodamina 123.



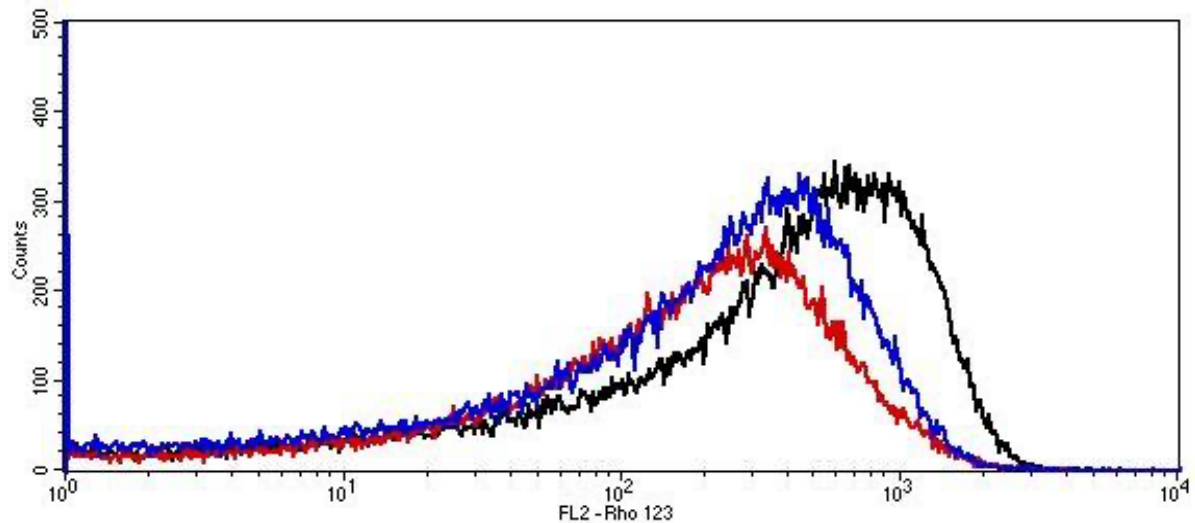
Legenda: Os dados são expressos como fluorescência relativa ao controle  $\pm$  E.P.M. A análise dos resultados foi feita através de ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Bonferroni. Valores significativos: **a**  $p < 0,0001$  vs FO; **b**  $p < 0,001$  vs 6-OHDA; **c**  $p < 0,01$  vs 6OHDA.

Figura 21: Histograma representativo do ensaio com Rodamina 123, apresentando o grupo tratado com rotenona + VD3 0,1 ng/mL.



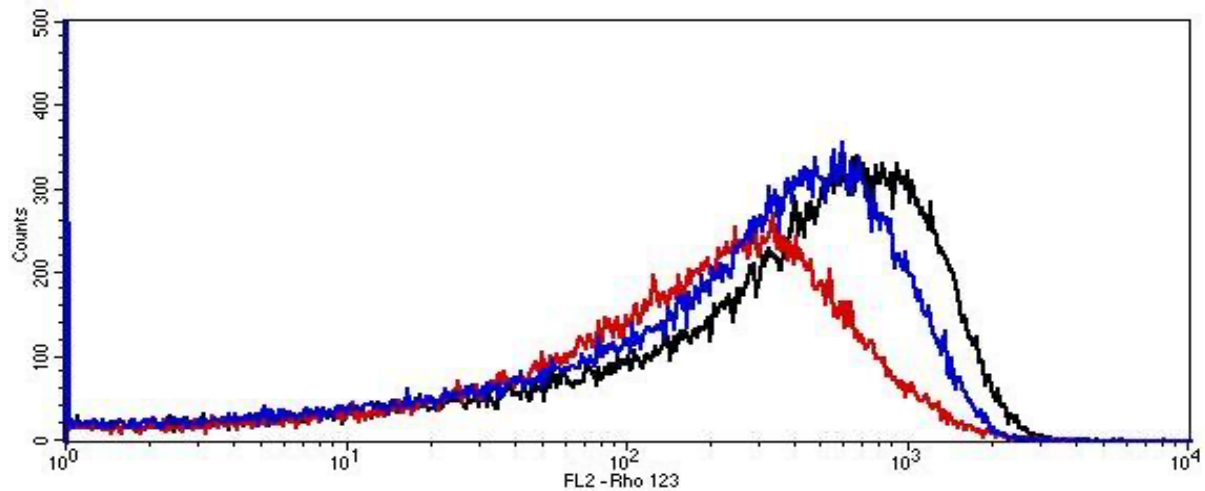
Legenda: A linha preta representa a população do grupo controle, a linha vermelha representa o grupo induzido apenas com 6-OHDA e a linha azul representa os grupos tratados com VD3 0,1 ng/mL

Figura 22: Histograma representativo do ensaio com Rodamina 123, apresentando o grupo tratado com rotenona + VD3 1 ng/mL.



Legenda: A linha preta representa a população do grupo controle, a linha vermelha representa o grupo induzido apenas com 6-OHDA e a linha azul representa os grupos tratados com VD3 1 ng/mL

Figura 23: Histograma representativo do ensaio com Rodamina 123, apresentando o grupo tratado com rotenona + VD3 10 ng/mL.



Legenda: A linha preta representa a população do grupo controle, a linha vermelha representa o grupo induzido apenas com 6-OHDA e a linha azul representa os grupos tratados com VD3 1 ng/mL.

### 5.3. Avaliação da Função Mitochondrial – *in vivo*

#### 5.3.1. Ação da vitamina D sobre a respiração mitocondrial em ratos submetidos ao modelo de DP induzido por 6-OHDA

Os efeitos da suplementação com vitamina D, em ratos com hemiparkinsonismo, sobre a atividade bioenergética mitocondrial, ativada com

diferentes substratos (glutamato + malato; succinato e; succinato + rotenona) (tabela 1).

Tabela 1: Efeitos da suplementação com vitamina D na taxa respiratória em estado 3, estado 4, RCR e ADP/O de ratos com lesão estriatal induzida por 6-OHDA.

|                                   |   | <b>FO</b>  | <b>6-OHDA</b>           | <b>PRE-TTO</b>            | <b>POS-TTO</b>            |
|-----------------------------------|---|------------|-------------------------|---------------------------|---------------------------|
| <b>Sucinato</b>                   | <b>ESTADO 3</b><br>(mMol O <sub>2</sub> / mg<br>proteína/min) | 15,62±1,56 | 8,03±0,46 <sup>a</sup>  | 15,04±0,54 <sup>b</sup>   | 10,66±1,03 <sup>a,c</sup> |
|                                   | <b>ESTADO 4</b><br>(mMol O <sub>2</sub> / mg<br>proteína/min) | 2,55±0,49  | 4,44±0,61 <sup>a</sup>  | 1,04±0,09 <sup>b</sup>    | 3,70±0,48 <sup>c</sup>    |
|                                   | <b>RCR</b>  | 6,94±0,43  | 1,95±0,34 <sup>a</sup>  | 15,59±1,77 <sup>a,b</sup> | 2,95±0,28 <sup>a,c</sup>  |
|                                   | <b>ADP/O</b>  | 3,22±0,11  | 1,08±0,09 <sup>a</sup>  | 2,63±0,25 <sup>b</sup>    | 1,33±0,11 <sup>a,c</sup>  |
| <b>Malato<br/>+<br/>Glutamato</b> | <b>ESTADO 3</b><br>(mMol O <sub>2</sub> / mg<br>proteína/min) | 14,70±1,78 | 2,30±0,59 <sup>a</sup>  | 25,07±2,68 <sup>a,b</sup> | 6,64±1,10 <sup>a,c</sup>  |
|                                   | <b>ESTADO 4</b><br>(mMol O <sub>2</sub> / mg<br>proteína/min) | 1,64±0,25  | 0,85±0,18               | 1,50±0,24                 | 2,09±0,48                 |
| <b>Succinato<br/>+</b>            | <b>RCR</b>  | 9,24±0,83  | 1,95±0,18 <sup>a</sup>  | 18,00±1,63 <sup>a,b</sup> | 3,58±0,66 <sup>a,c</sup>  |
|                                   | <b>ESTADO 3</b><br>(mMol O <sub>2</sub> / mg                  | 17,40±1,19 | 24,26±1,68 <sup>a</sup> | 16,10±0,99 <sup>b</sup>   | ---                       |

| <b>Rotenona</b> | proteína/min)   |            |                        |                           |     |
|-----------------|---|------------|------------------------|---------------------------|-----|
|                 | <b>ESTADO 4</b><br>(mMol O <sub>2</sub> / mg<br>proteína/min) | 0,70±0,10  | 3,18±0,31 <sup>a</sup> | 1,19±0,02 <sup>b</sup>    | --- |
|                 | <b>RCR</b>  | 25,53±3,04 | 7,73±0,42 <sup>a</sup> | 14,52±0,08 <sup>a,b</sup> | --- |

Legenda: As barras representam a média ± E.P.M (n= 3-5 animais/grupo). A análise dos resultados foi feita através de ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey. Valores significativos: **a** p<0,005 vs FO; **b** p<0,005 vs 6OHDA; **c** p<0,005 vs PRE-TTO.

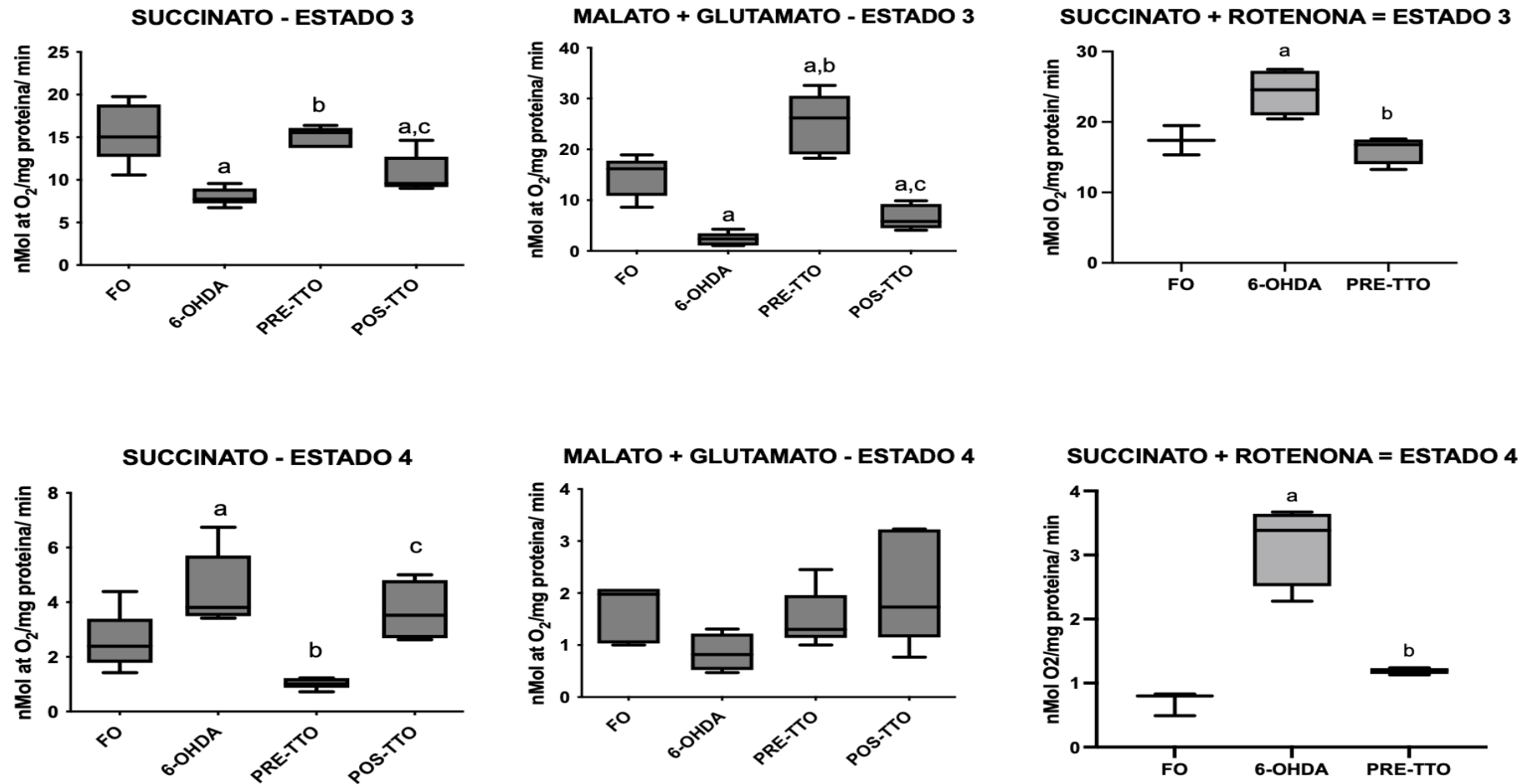
Na figura 24 observa-se que, a 6-OHDA foi um potente inibidor do estado 3 da respiração energizada com succinato, substrato do complexo II, bem como com malato e glutamato, substratos do complexo I, viabilizando um decréscimo no consumo de oxigênio de ~49% e ~83%, respectivamente. Já o consumo de oxigênio durante o estado 4 da respiração mitocondrial aumentou nos animais 6-OHDA, para as frações mitocondriais energizadas com succinato, todavia as frações mitocondriais energizadas com malato e glutamato, não apresentaram diferenças significativas no estado 4 da respiração mitocondrial, entre todos os grupos experimentais.

Todavia, o pré-tratamento com vitamina D promoveu a manutenção no consumo de oxigênio no estado 3 da respiração mitocondrial, após estimulação do complexo I (figura 24) e aumento do consumo de oxigênio após estimulação do complexo II (figura. 24). Fato não evidenciado nos animais POS-TTO. Já o estado 4 da respiração mitocondrial, do grupo PRE-TTO, foi inibido 4,26x, quando comparado ao grupo 6-OHDA. Não houve diferença significativa entre o estado 4 dos animais 6-OHDA e POS-TTO.

A figura 24 exhibe o efeito da suplementação com vitamina D, em ratos com hemiparkinsonismo, sobre a taxa de consumo de oxigênio não mitocondrial, viabilizado por meio da adição de succinato como substrato oxidável juntamente com a adição de rotenona para inibição do complexo I. Como demonstrado na figura 24 observa-se que, de modo controverso, o grupo 6-OHDA apresentou um discreto aumento do consumo de oxigênio tanto no estado 3 ( $24,26 \pm 1,68$ ) como no estado 4 ( $3,18 \pm 0,31$ ), quando comparado aos grupos FO (estado 3 =  $17,40 \pm 1,19$ ; estado 4 =  $0,70 \pm 0,10$ ). Os animais PRE-TTO apresentaram redução de 33,63% da velocidade de consumo de oxigênio em estado 3 e de 62,57% em estado 4.



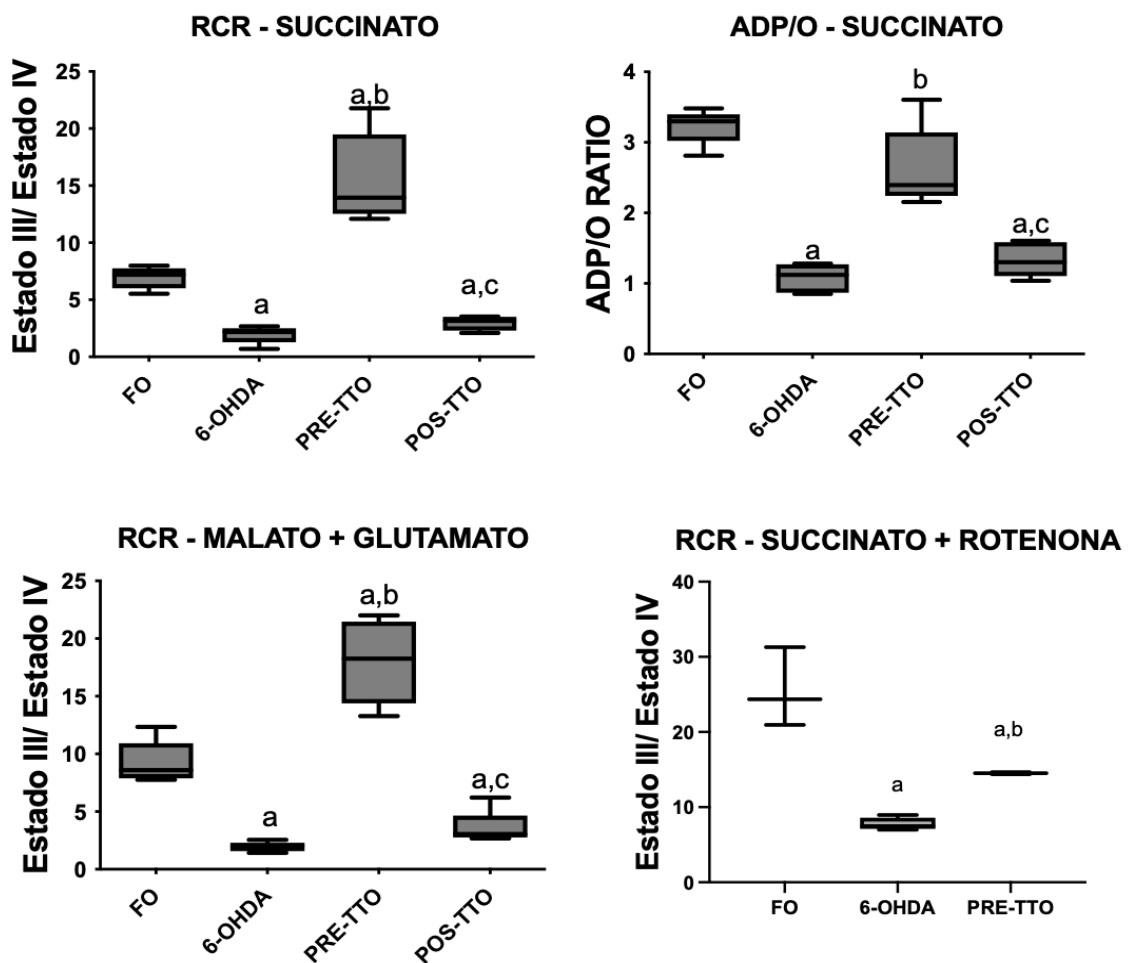
Figura 24: Efeitos da suplementação com vitamina D na respiração mitocondrial de ratos com lesão estriatal induzida por 6-OHDA.



Legenda: As barras representam a média  $\pm$  E.P.M (n= 3-5 animais/grupo). A análise dos resultados foi feita através de ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey. Valores significativos: a  $p < 0,005$  vs FO; b  $p < 0,005$  vs 6OHDA; c  $p < 0,005$  vs PRE-TTO.

A figura 25 mostra que o RCR, isto é, o quociente entre o consumo de oxigênio do estado 3 e do estado 4, evidenciando assim a qualidade da preparação mitocondrial em termos da integridade estrutural e funcional. A neurotoxina 6-OHDA afetou o acoplamento entre respiração e síntese de ATP, diminuindo em 71,9% (succinato), 78,8% (malato+glutamato) e 69,7% (succinato+rotenona) quando comparado aos animais FO.

Figura 25: Efeitos da suplementação com vitamina D na razão de controle respiratório (RCR) e ADP/O de ratos com lesão estriatal induzida por 6-OHDA.



Legenda: As barras representam a média  $\pm$  E.P.M (n= 3-5 animais/grupo). A análise dos resultados foi feita através de ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey. Valores significativos: a  $p < 0,005$  vs FO; b  $p < 0,005$  vs 6OHDA; c  $p < 0,005$  vs PRE-TTO.

Em consonância com os resultados anteriores, o grupo PRE-TTO melhorou significativamente a RCR na DP induzida por 6-OHDA. No entanto, esse efeito benéfico não foi observado com o grupo POS-TTO, indicando que os efeitos da 6-

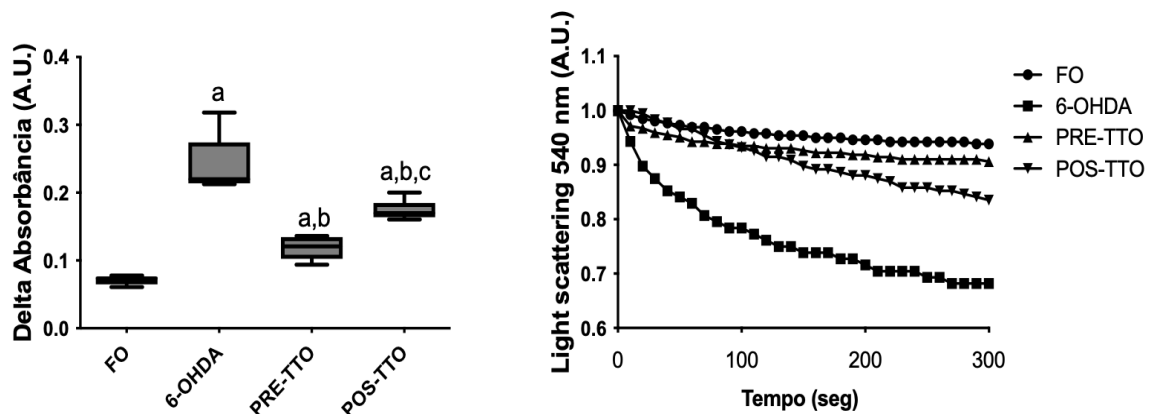
OHDA nas mitocôndrias cerebrais são evitáveis, mas não tratáveis pela suplementação de vitamina D, pelo menos nesses regimes de tratamento de 14 dias. Resultados semelhantes foram demonstrados no RCR, com malato mais glutamato e succinato mais rotenona como substratos energéticos.

A razão ADP/O traduz o quociente entre a quantidade de ADP adicionada e o O<sub>2</sub> consumido, para fosforilar o ADP adicionado, e indica a eficiência da fosforilação oxidativa. Enfatiza-se que para esse estudo a razão ADP/O foi aferida apenas na presença de succinato. O grupo 6-OHDA apresentou uma redução de 66,4% na razão ADP/O, quando comparado ao grupo FO. Ao passo que, as frações mitocondriais dos animais grupo PRE-TTO apresentaram manutenção da eficiência da fosforilação do ADP, apresentando aumento significativo da razão ADP/O quando comparado com os animais 6-OHDA. No entanto, no grupo POS-TTO, não foi evidenciado melhora da função mitocondrial.

### 5.3.2. Ação da vitamina D sobre o swelling mitocondrial, após a adição de cálcio, em ratos submetidos ao modelo de DP induzido por 6-OHDA

A suscetibilidade à abertura do mPTP foi avaliada através da variação da absorbância da suspensão mitocondrial induzida por cálcio. Nos resultados apresentados na figura 26, observar-se que a 6-OHDA promoveu um declínio intenso na absorbância, aumentando 70,3% o *swelling* mitocondrial em relação ao grupo FO ( $0,07 \pm 0,002$ ). Em contraste, os grupos PRE-TTO e POS-TTO apresentaram uma redução de 50,2% e 27,3%, respectivamente, do *swelling* mitocondrial, quando comparada ao grupo 6-OHDA.

Figura 26: Efeito da suplementação com vitamina D no *swelling* mitocondrial durante a indução do mPPT das mitocôndrias cerebrais de ratos com lesão estriatal induzida por 6-OHDA



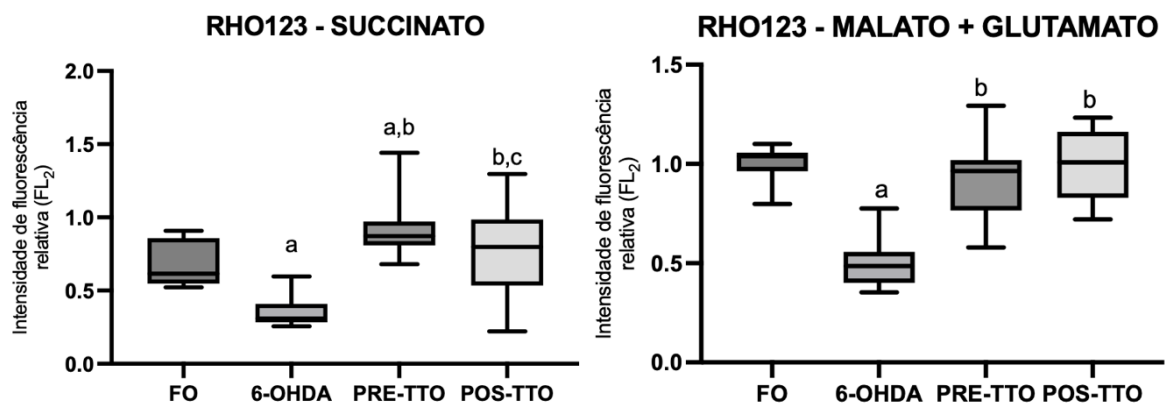
Legenda: As barras representam a média  $\pm$  E.P.M (n= 5 animais/grupo). A análise dos resultados foi feita através de ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey. Valores significativos: **a**  $p < 0,005$  vs FO; **b**  $p < 0,005$  vs 6OHDA; **c**  $p < 0,005$  vs PRE-TTO.

### 5.3.3. Ação da vitamina D sobre o $\Delta\Psi$ , de mitocôndrias cerebrais, em ratos submetidos ao modelo de DP induzido por 6-OHDA

O potencial transmembrânico mitocondrial foi determinado por citometria de fluxo utilizando o corante Rodamina 123 e a figura 27 apresenta os resultados em termos de intensidade de fluorescência relativa. Observa-se que as frações mitocondriais do grupo 6-OHDA, e energizadas tanto com succinato como com malato mais glutamato, apresentaram uma redução de 47,03% e 50,15%, respectivamente, do potencial de membrana mitocondrial, quando comparado ao grupo controle, fato indicado pela diminuição no acúmulo e, conseqüentemente, na marcação de Rho-123.

Nota-se que em consonância com os parâmetros da respiração mitocondrial, o tratamento com vitamina D estabilizou o  $\Delta\Psi_m$  dos grupos PRE-TTO e POS-TTO, resguardando a intensidade de fluorescência relativa destes com o do grupo controle. Outrossim, as suspensões mitocondriais pertencentes ao grupo PRE-TTO, e energizadas com succinato, apresentaram um resultado melhor, aumentando o  $\Delta\Psi_m$  cerca de 27% com relação ao grupo FO e 61,38% com relação aos animais 6-OHDA.

Figura 27: Efeitos da suplementação com vitamina D sobre o potencial transmembrânico de mitocôndrias cerebrais, de ratos com lesão estriatal induzida por 6-OHDA, por citometria de fluxo através do ensaio utilizando a Rodamina 123.

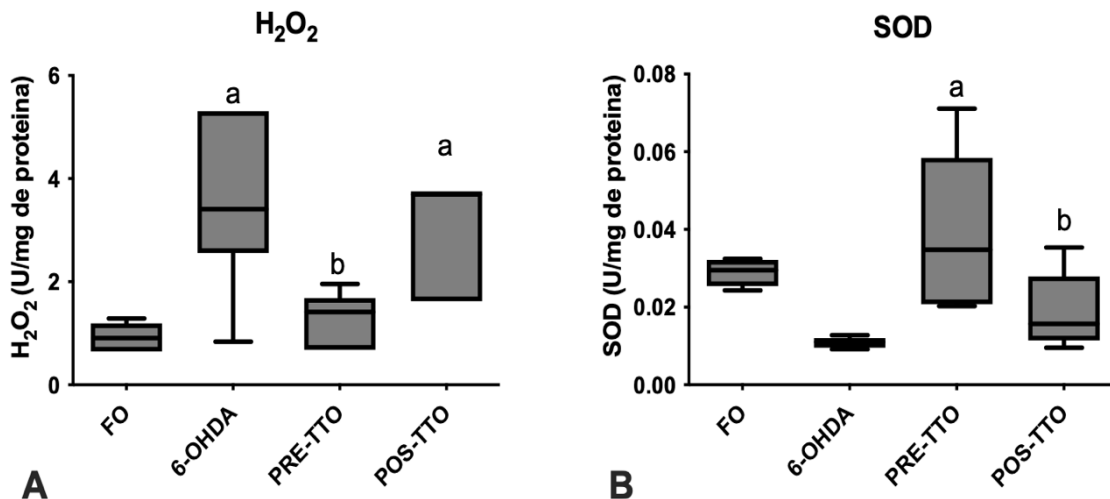


Legenda: Os dados são expressos como fluorescência relativa ao controle  $\pm$  E.P.M. A análise dos resultados foi feita através de ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Bonferroni. Valores significativos: a  $p < 0,005$  vs FO; b  $p < 0,005$  vs 6OHDA; c  $p < 0,005$  vs PRE-TTO

#### 5.4. Efeito da suplementação com vitamina D sobre o a produção de $H_2O_2$ e SOD citosólico de mitocondriais de cérebro de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA.

Como evidenciado na figura 28, a neurotoxina 6-OHDA reduziu os níveis cerebrais de enzima SOD citosólica em quase 62%, quando comparados aos do grupo FO. Após o tratamento com VD3, os animais PRE-TTO apresentaram 3,6 vezes mais SOD citosólica que os animais do grupo lesionado. Em contraste, as mitocôndrias cerebrais do grupo 6-OHDA mostraram um aumento de aproximadamente 3,9 vezes na produção de  $H_2O_2$ , em comparação com o grupo controle. Ao passo que, o tratamento com vitamina D anterior a lesão por 6-OHDA, efetuou uma redução de 65,56% dos níveis mitocondriais de  $H_2O_2$ . O grupo PÓS-TTO não apresentou diferença estatística nos índices de produção do referido analito.

Figura 28: Efeito da suplementação com vitamina D sobre os níveis de  $H_2O_2$  mitocondrial e SOD citosólico de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA.

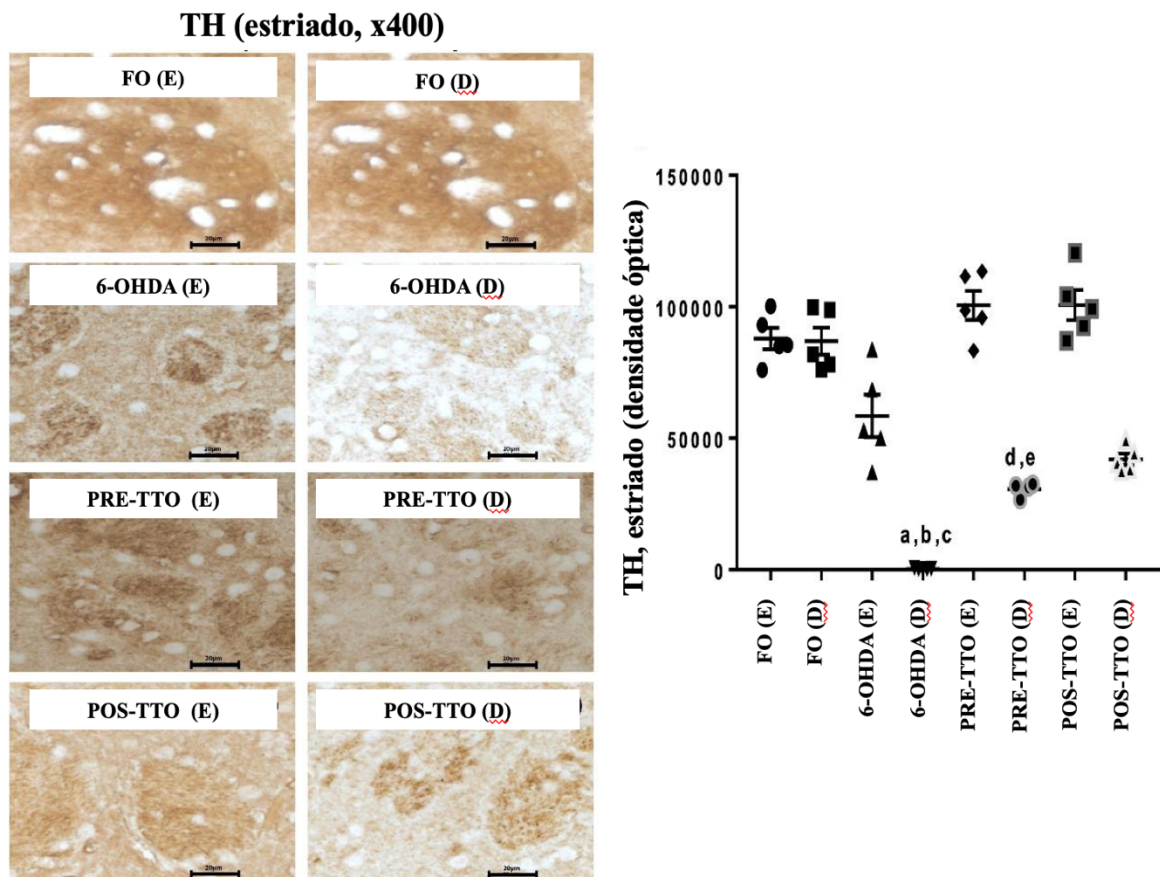


Legenda: As barras representam a média  $\pm$  E.P.M. ( $n = 5$  animais/grupo). A análise dos resultados foi feita através de ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey. Valores significativos: **A:** a  $p < 0,005$  vs FO; b  $p < 0,005$  vs 6OHDA; **B:** a  $p < 0,005$  vs FO; b  $p < 0,005$  vs PRE-TTO.

### 5.5. Efeito da suplementação com vitamina D sobre a expressão de TH e DAT, em estriados de ratos hemiparkinsonianos

Como pode ser evidenciado na figura 29, os animais submetidos à lesão com 6-OHDA apresentaram uma redução de 34 e 99%, respectivamente, na expressão TH, no estriado esquerdo (não lesionado) e direito (lesionado) quando comparados aos dos animais FO. Os protocolos de tratamento com VITD protegeram a área estudado, corpo estriado, contra a diminuição da imunorreatividade para TH causada pela 6-OHDA, apresentando os animais PRE-TTO e PÓS-TTO diminuições menores para a imunomarcagem de TH (64 e 52%, respectivamente), nos corpos estriados direitos, sugerindo assim um efeito neuroprotetor de VITD (figura 29). Ademais, não foram observadas diferenças significativas nos lados estriatais esquerdos, após os tratamentos com vitamina D em comparação com os grupos FO.

Figura 29: Imunomarcagem para TH no corpo estriado em animais parkinsonianos.

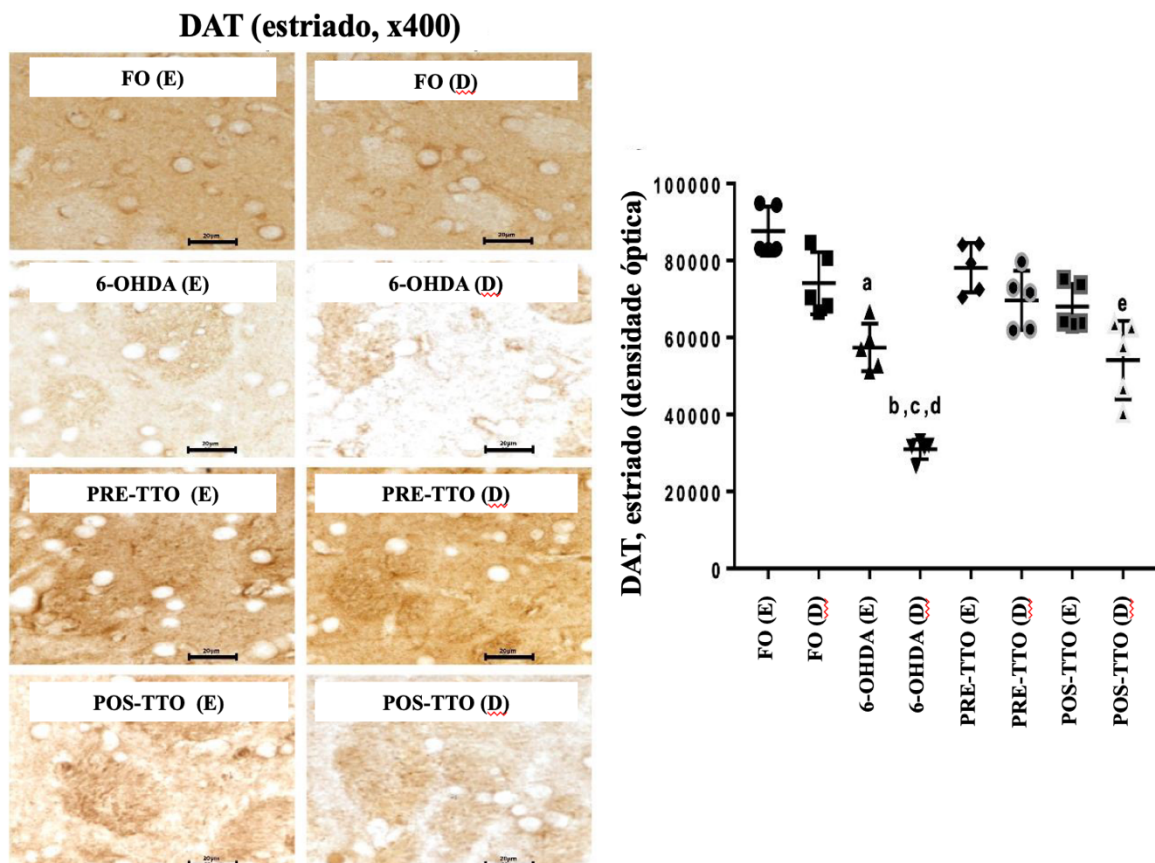


Legenda: O gráfico à direita mostra os resultados das análises Image J de 3 animais por grupo e 4 a 6 imagens por grupo. a. vs. FO(D),  $p = 0,0439$ ; b. vs. PRE-TTO (E),  $p = 0,0018$ ; c. vs. POS-TTO (E),  $p = 0,0011$ ; d. vs. PRE-TTO (E),  $p < 0,0417$ ; e. vs. POS-TTO (E),  $p = 0,0289$  (ANOVA de uma via e teste

não paramétrico de Kruskal-Wallis, estatística KW = 32,64, seguido pelo teste de Dunn para comparações múltiplas).

De modo semelhante que os achados para TH, à expressão de DAT, apresentou diminuições significativas no lado contralateral (35%) e no lado ipsilateral (58%) à lesão por 6-OHDA, quando comparada a dos animais controle. Da mesma forma, evidencia-se que a densidade óptica no corpo estriado direito nos grupos PRE-TTO e POS-TTO, promoveram aumento da imunomarcagem para DAT em 56 e 43%, respectivamente, quando comparadas ao grupo 6-OHDA. Embora nenhuma diferença significativa tenha sido observada no lado esquerdo do corpo estriado dos animais PRE-TTO, em relação a este mesmo lado do grupo FO, observa-se uma diminuição de 22% nesta mesma área para os animais POS-TTO (figura 30).

Figura 30: Imunomarcagem para DAT no corpo estriado em animais parkinsonianos.



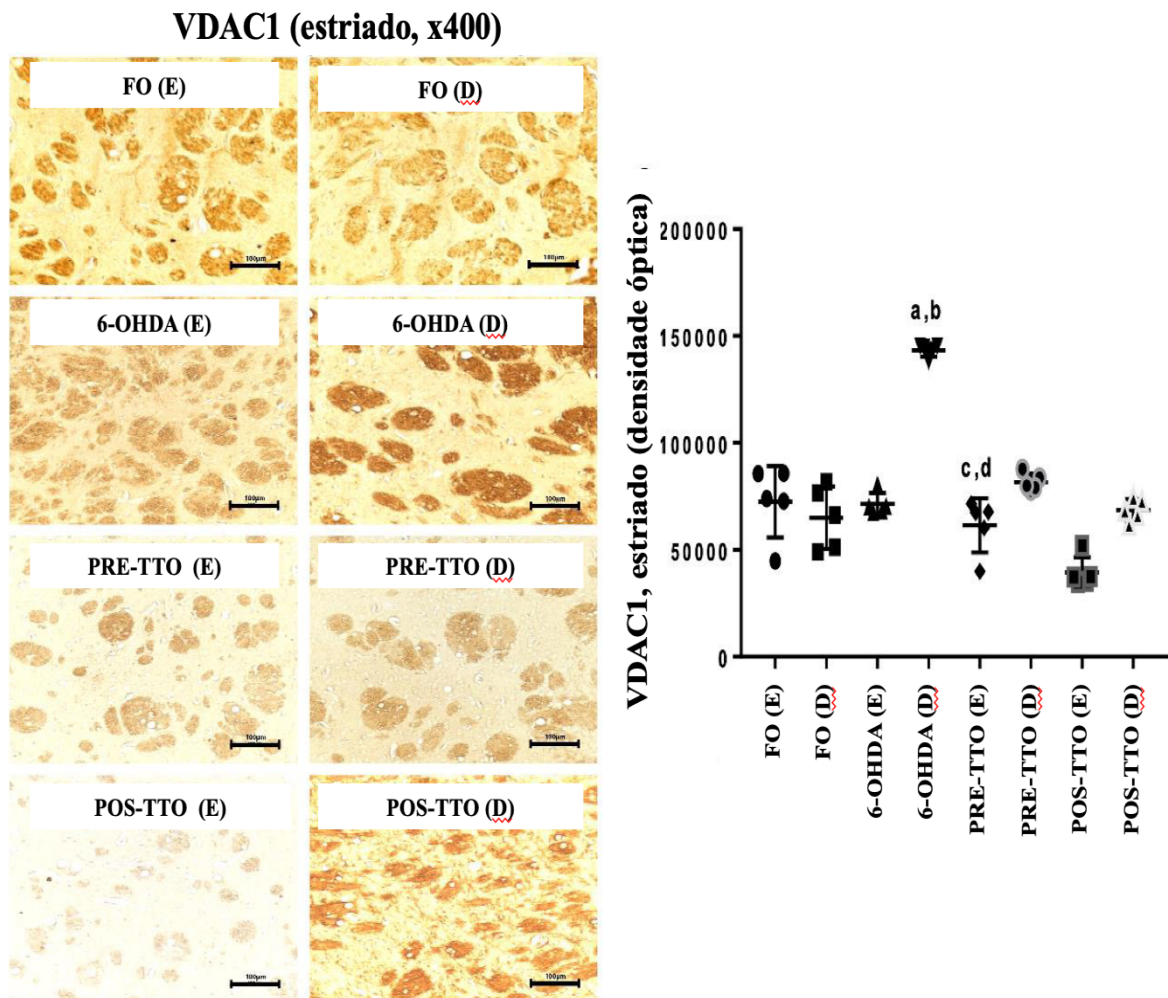
Legenda: O gráfico à direita mostra os resultados das análises Image J de 3 animais por grupo e 4 a 6 imagens por grupo. a. vs. FO (E)  $p = 0,0298$ ; b. vs. FO (E),  $p < 0,0002$ , c. vs. FO(D),  $p < 0,0328$ ; d. PRE-TTO (E),  $p = 0,0053$ ; e. vs. FO (E),  $p = 0,0183$  (ANOVA one-way e teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, estatística KW = 31,63, seguido do teste de Dunn para comparações múltiplas).



## 5.6. Efeito da suplementação com vitamina D sobre a expressão de VDAC1 e Hsp60, em estriados de ratos hemiparkinsonianos

Como pode ser observado na figura 31, os animais 6-OHDA aumentaram em torno 3 vezes a concentração de VDAC1, evidenciado pela imunorreatividade aumentada para VDAC1, em comparação com o grupo controle FO ou com seu próprio lado não lesionado (estriado esquerdo). Esses efeitos foram significativamente atenuados nos grupos PRE-TTO e POS-TTO, inclusive não sendo observadas diferenças significativas entre os animais PRE-TTO e FO, sugerindo, portanto, efeito neuroprotetor da vitamina D contra a lesão de 6-OHDA.

Figura 31: Imunomarcção para VDAC1 no corpo estriado em animais parkinsonianos.

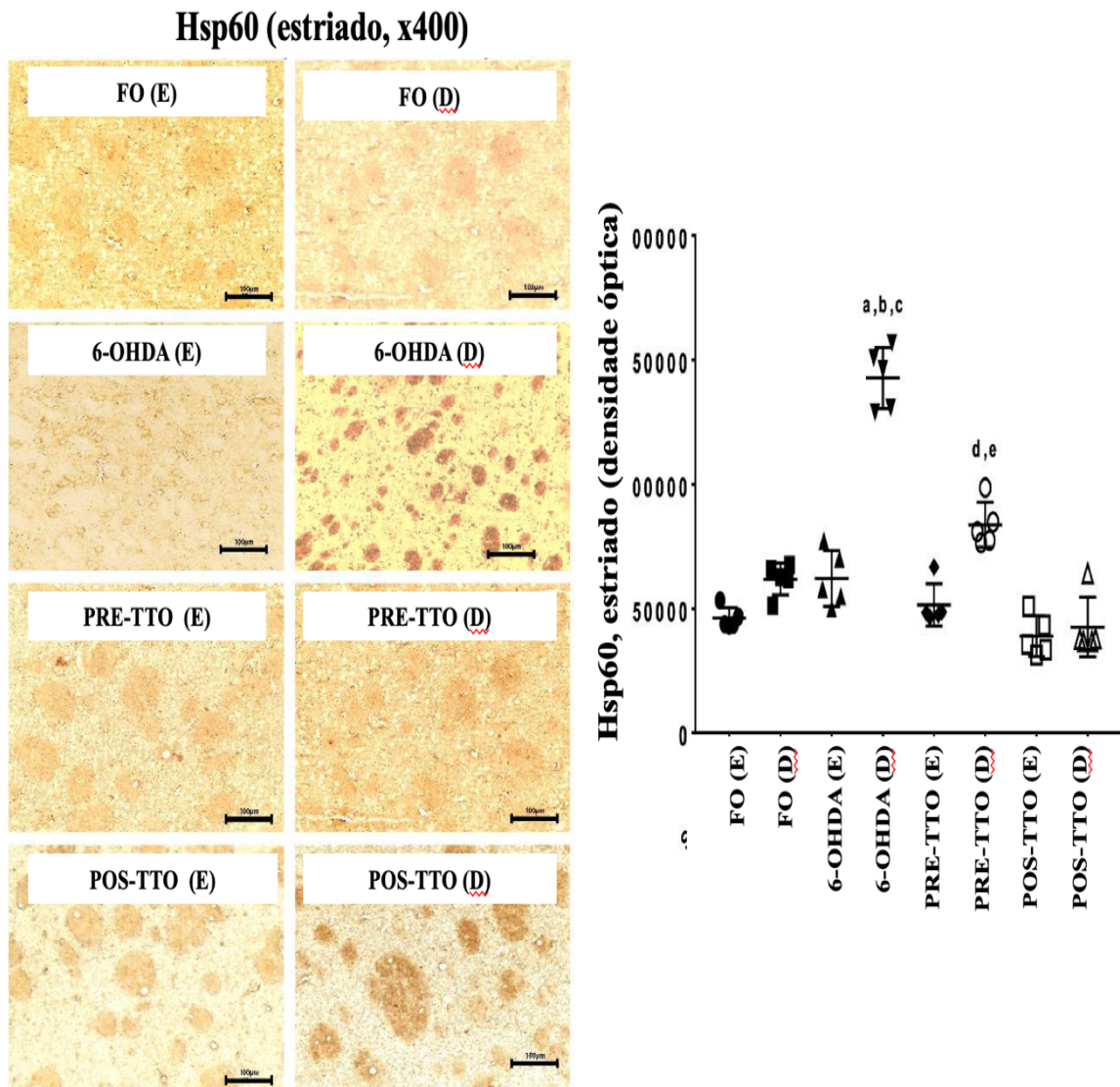


Legenda: O gráfico à direita mostra os resultados das análises Image J de 3 animais por grupo e 4 a 6 imagens por grupo. a. vs. FO (E),  $p = 0,0271$ ; b. vs. POS-TTO (E),  $p < 0,0360$ ; c. vs. PRE-TTO (E),  $p = 0,0002$ ; d. vs. 6-OHDA (E),  $p = 0,0122$  (ANOVA one-way e teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, estatística KW = 27,68, seguido do teste de Dunn para comparações múltiplas).



No que diz respeito à expressão de Hsp60, foram demonstrados aumentos de cerca de 2 vezes no estriado contralateral (não lesionado) e ipsilateral (lesionado) da 6-OHDA, em comparação com os grupos FO. No entanto, a maior expressão de Hsp60 foi observada no corpo estriado direito dos animais pertencentes ao grupo 6-OHDA, em comparação com todos os demais grupos. Ampliações menores da imunomarcção para Hsp60 foram observados no corpo estriado direito dos animais dos grupos PRE-TTO e POS-TTO, em comparação com os grupos FO (figura 32).

Figura 32: Imunomarcção para Hsp60 no corpo estriado em animais parkinsonianos.



Legenda: O gráfico à direita mostra os resultados das análises Image J de 3 animais por grupo e 4 a 6 imagens por grupo. a. vs. FO (E),  $p = 0,0150$ ; b. vs. POS-TTO (E),  $p < 0,0006$ ; c. vs. POS-TTO (D),  $p = 0,0031$ ; d. vs. POS-TTO (E),  $p = 0,0011$ ; e. vs. POS-TTO (D),  $p = 0,0434$  (ANOVA de uma via e teste

não paramétrico de Kruskal-Wallis, estatística KW = 36,11, seguido pelo teste de Dunn para comparações múltiplas).

## 6. DISCUSSÃO

A DP é uma doença neurodegenerativa complexa e progressiva, que ocorre predominantemente na população idosa e caracterizada pela perda de neurônios da substância negra, a DP leva à inibição da síntese de dopamina e acúmulo de corpos de Lewy, formados por agregados de  $\alpha$ -sinucleína. O resultado dessas alterações neuromoleculares é traduzido na manifestação de sintomas motores, como bradicinesia, tremor de repouso, rigidez e instabilidade postural, e sintomas não motores, como depressão, hiposmia, fadiga, distúrbios do sono e déficits cognitivos, como demência. Vários mecanismos patológicos e vias moleculares de sinalização estão associados à DP, no entanto, devido ao seu papel central na homeostase celular, a disfunção mitocondrial e o estresse oxidativo são identificados como desempenhando um papel dominante no início e progressão da DP. Até recentemente, a terapia de reposição de dopamina era o tratamento primário para a doença de Parkinson. Embora muitos pesquisadores tenham tentado encontrar uma maneira de interromper, ou tão somente mitigar, o processo neurodegenerativo da doença de Parkinson, nenhum medicamento foi encontrado para proteger os neurônios ou mudar o curso da doença em pacientes com DP. Inevitavelmente, tal panorama instiga uma ampla gama de estudos a se concentram na investigação dos mecanismos patogênicos e de medicamentos alternativos para tratar a doença de Parkinson (CASSOTTA et al., 2022; LI et al., 2019; LV et al., 2022; RAHMAN et al., 2020; SHARMA et al., 2019).

Ao longo das últimas décadas, diversas evidências científicas demonstram que a VITD apresenta uma relação positiva com a função cerebral. Embora alguns estudos clínicos sustentem um papel para a neuroproteção da VITD na DP, outros estudos não mostram nenhuma associação causal clara entre menor concentração de VITD e risco aumentado para DP (KNEKT et al., 2010; LARSSON et al., 2017; RIMMELZWAAN et al., 2016; SHEN; JI, 2015; SHRESTHA et al., 2016; WANG et al., 2016). No presente estudo, evidenciamos que o tratamento com VITD reverteu parcial ou totalmente alterações comportamentais, neuromoleculares, estigados por meio da função mitocondrial e estresse oxidativo, e imunohistoquímicas observadas no modelo de DP induzida por 6-OHDA em ratos.

Os sintomas motores da DP são manifestados quando a neurodegeneração da via nigroestriatal ultrapassa 50%, facultando a diminuição de

aproximadamente 70% da dopamina estriatal. Com o objetivo de avaliar o grau de degeneração da via nigroestriatal, e a gravidade da depleção de dopamina, o presente estudo utilizou o teste comportamental por apomorfina, teste padrão-ouro para análises de lesões causadas pela 6-OHDA, uma vez que este é uma avaliação sensível para lesões estriatais com extensão maior que 80%, desencadeando o aparecimento de comportamento rotatório estereotipado quando empregado agonista dopaminérgico, como a apomorfina. É meritório esclarecer que isso ocorre em razão da hipersensibilização, no lado lesionado, dos receptores pós-sinápticos dopaminérgicos estriatais, exprimindo uma *up regulation* dos receptores D2 (DEUMENS et al., 2002; MEREDITH; KANG, 2006; UNGERSTEDT; ARBUTHNOTT, 1970).

No presente trabalho, a potencial atividade neuroprotetora da VITD foi denotada uma vez que todos os dados dos testes comportamentais ostentam que a VITD proporciona, via diferentes mecanismos, proteção aos neurônios dopaminérgicos, versus os mecanismos neurodegenerativos provocados pela 6-OHDA. Os animais do grupo 6-OHDA apresentaram um aumento de quase 400 vezes o número de rotações contralaterais/h quando comparadas ao grupo FO, ao passo que os animais PRE-TTO e POS-TTO apresentaram uma redução de 8,4 e 3,5 vezes, respectivamente, no número de rotações contralaterais em relação ao grupo 6-OHDA.

O teste de locomoção do campo aberto é usado principalmente para examinar de forma sistemática a função motora em atividade espontânea observando a exploração de um ambiente novo (HRNKOVA et al., 2007). Sendo o animal avaliado quanto ao número n° 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*).

A suplementação com VITD acarretou uma melhora na capacidade motora dos animais, revertendo a hipolocomoção horizontal e vertical demonstrada no grupo 6-OHDA, sugerindo assim, que a suplementação com VITD atenua a hipocinesia induzida por 6-OHDA, consistente com descobertas anteriores de Lima et al. (2018) e Wang et al. (2001) que também demonstram a relação entre a ação da VITD e o comprometimento motor, associado à modulação do número de cruzamentos e *rearing* no teste de campo aberto. Costa e colaboradores (2022) evidenciaram que o exercício físico associado com a suplementação com VITD diminui o número de

rotações induzidas pela apomorfina e melhorou a atividade exploratórias horizontais e verticais. Tais respostas são provavelmente mediadas pela restauração dos níveis de dopamina estriatal, como comprovado por diversos estudos que evidenciaram a restauração dos níveis estriatais de dopamina após suplementação com VITD (ALTEMUS et al., 1987; LIMA et al., 2018; SMITH et al., 2006; WANG et al., 2001).

A investigação do comportamento “tipo depressivo” deu-se por meio do teste do nado forçado, que se baseia na observação de que, quando os roedores se deparam com uma situação aversiva inescapável, podem eleger diferentes estratégias de enfrentamento que podem ser classificadas como ativas ou passivas. As estratégias ativas (escalada e natação) predominam na exposição inicial ao nado, mas são tipicamente substituídas ao longo do tempo pelo aparecimento de uma estratégia passiva (flutuação). A principal observação que levou o teste ao uso generalizado foi a descoberta de que antidepressivos eficazes em humanos tinham a capacidade de aumentar a quantidade de estratégias ativas adotadas pelo animal no teste de nado forçado. No presente trabalho, o pré e pós-tratamento com VITD diminuíram significativamente o tempo de imobilidade, sugerindo potencial ação antidepressiva. O comportamento depressivo é uma característica comum dos pacientes com doença de Parkinson, e os estudos clínicos são consistentes com a hipótese de que a baixa concentração de VITD está associada à depressão (GENG et al., 2019; HWANG, 2013; MARSH, 2013; SAJI PAREL et al., 2022).

O fator de risco mais importante para a DP é o envelhecimento, e alterações na atividade mitocondrial são típicas do processo de senilidade. Deleções no mtDNA e desenvolvimento de falhas na cadeia respiratória em neurônios da SNpc em indivíduos idosos, bem como de indivíduos com DP, convergem para uma via compartilhada, que leva à disfunção neuronal e à morte neuronal. Mais importante ainda, o estresse oxidativo e a neuroinflamação podem potencializar um ao outro para promover a progressão da DP (HE et al., 2020; RANGO; BRESOLIN, 2018).

Considerando a importância da disfunção mitocondrial e do estresse oxidativo na patogênese da DP, o presente estudo, investigou os efeitos neuroprotetores da VITD na função das mitocôndrias cerebrais sobre a ação tóxica da 6-OHDA e rotenona. Para tanto, foram realizados ensaios *in vitro* e *in vivo*, sobre o potencial de membrana mitocondrial, *swelling* mitocondrial, taxa de consumo de

oxigênio, razão de controle respiratório, a razão ADP/O, bem como dosagem de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e SOD.

As mitocôndrias respondem a diferentes tipos de agentes estressores, especialmente aqueles cujo mecanismos atrelam-se ao estresse oxidativo e metabólico. A sobrecarga de Ca<sup>2+</sup>, juntamente com altas concentrações de EROs e Pi, promove alterações na permeabilidade da membrana mitocondrial, por meio da indução da abertura dos poros de transição de permeabilidade, desencadeando aumento do volume da matriz mitocondrial, levando ao comprometimento da função bioenergética e a integridade estrutural das mitocôndrias, com remodelação da membrana interna e ruptura da membrana externa com liberação de citocromo c e outras proteínas apoptogênicas (HALESTRAP, 1989; HALESTRAP et al., 1998; RASOLA; BERNARDI, 2011; SOLENSKI et al., 2002; ZORATTI; SZABO, 1995).

A rotenona é uma toxina de origem vegetal e possui alta afinidade com o complexo I da cadeia respiratória, devido a sua extrema lipofilicidade que lhe permite atravessar as membranas celulares independentemente de qualquer transportador, e inibe sua atividade após repetidas administrações orais, subcutâneas, intravenosas ou intraperitoneais em roedores. Embora a rotenona induza a inibição sistêmica do complexo I, os neurônios da substância negra aparentam ter alta sensibilidade para tal inibição, promovendo deste modo morte seletiva do neurônio dopaminérgico reverberando em manifestações fisiopatológicas como elevados níveis de EROs, perturbação na atividade de proteassoma, morte neuronal na substância negra, níveis reduzidos de dopamina e inclusões de  $\alpha$ -sinucleína. Por outro lado, parece que os sintomas de DP induzidos por rotenona são variáveis e existem problemas de reprodutibilidade entre vários modelos animais, limitando assim o uso de rotenona na pesquisa translacional até certo ponto (BETARBET et al., 2000; DAUER; PRZEDBORSKI, 2003; GRIVENNIKOVA et al., 1997).

O análogo de dopamina 6-OHDA é usado para induzir toxicidade neuronal monoaminérgica. É incapaz de atravessar a barreira hematoencefálica, por isso requer a administração direta por meio de procedimentos estereotáxicos à substância negra ou corpo estriado. A 6-OHDA é captada especificamente dos terminais pré-sinápticos dos neurônios dopaminérgicos através do DAT. Ao adentrar nos neurônios dopaminérgicos rapidamente se oxida, produzindo radicais livres, incluindo peróxido de hidrogênio, levando à morte neuronal por disfunção mitocondrial e estresse

oxidativo. Como um mecanismo adicional, a 6-OHDA pode acumular-se na mitocôndria, onde inibe a atividade da cadeia de transporte de elétrons através do bloqueio do complexo I (BLANDINI et al, 2008; PRASAD; HUNG, 2020; PERESE et al., 1989).

No protocolo *in vitro* evidenciou-se que a adição da neurotoxina 6-OHDA provocou aumento drástico no *swelling* mitocondrial e diminuição significativa do  $\Delta\psi$  em comparação ao grupo controle, fato também evidenciado sob ação da rotenona. Ao passo que, a adição de VITD em suspensões mitocondriais contendo 6-OHDA, impediu, de maneira dependente da concentração, o intumescimento mitocondrial, bem como revertendo a perda do  $\Delta\psi$ . Conquanto, o efeito 'estabilizador' do potencial de membrana, no ensaio utilizando como agente estressor a rotenona, somente foi cunhado na maior dose. Esses dados enfatizam a importância do VITD como estratégia terapêutica para o tratamento da DP. Ramya et al. (2017) notabiliza que, a integridade da mitocôndria, e das funções bioenergéticas celulares, é mantida pela estabilização do potencial de membrana mitocondrial. Durante a indução de morte celular por apoptose é possível evidenciar a perda do  $\Delta\psi$ , bem como redução do metabolismo energético.

Acresce que, a avaliação do potencial elétrico de membrana, realizada por citometria de fluxo, utilizou como sonda a rodamina 123, corante lipofílico catiônico fluorescente específico para a marcação mitocondrial em células vivas. Quando a mitocôndria exibe potencial transmembrânico inalterado se observa alta fluorescência, visto que a rodamina é excitada pelo laser. Todavia, quando há alterações neste potencial transmembrânico, ocorre efluxo de rodamina 123, desprendendo-se para a matriz mitocondrial, e desencadeando diminuição na emissão fluorescente, ou seja, a perda do  $\Delta\Psi$  (SARIS, et al., 2004; LECOUEUR, et al, 2004; LOPEZ-MEDIAVILLA et al., 1989; HEIDEN, et al., 1997; MEDINA et al., 2002; VERMES et al., 2000).

Da mesma forma que nos ensaios *in vitro*, evidencia-se o aumento do *swelling* mitocondrial nos animais pertencentes ao grupo 6-OHDA. O contundente influxo osmótico de água para matriz mitocondrial, demonstrado pela diminuição da absorvância e conseqüente aumento do delta de absorvância, apresentado no grupo 6-OHDA, colapsa o  $\Delta\psi$  e promovendo a descontinuação da fosforilação oxidativa, correlacionando-se com o estímulo de aumento da velocidade de consumo de  $O_2$  no estado 4 da respiração mitocondrial (respiração inibida após adição de oligomicina e

com a conseqüente redução do RCR e ADP/O). Destaca-se que, a conjugação destes dois parâmetros, serve para determinar a funcionalidade de uma preparação mitocondrial, mais propriamente para demonstrar o estado de acoplamento entre a oxidação e a fosforilação.

Gonçalves et al. (2019), também mostraram que *slices* de estriado expostos à 6-OHDA apresentaram diminuição da fosforilação oxidativa e diminuição do fluxo de oxigênio relacionado à ATP-sintase, indicando um comprometimento na cadeia respiratória da mitocôndria.

Faz necessário ressaltar que os neurônios, especialmente os dopaminérgicos, são células com alta demanda energética e baixa capacidade glicólica. Várias linhas de evidência sugerem que um defeito na fosforilação oxidativa contribui para a patogênese da DP (GREEN; REED, 1998; MOON; PAEK, 2015; NUNES; LARANJINHA, 2021; RANGO et al., 2018). Por conseguinte, a falha bioenergética viabilizada pela 6-OHDA tem um forte impacto negativo na função neuronal.

Respalhando as evidências colhidas nos testes *in vitro* e comportamental é possível notar que no grupo 6-OHDA sobressai-se os indícios dos danos na função mitocondrial, ao passo que os grupos suplementados com VITD, especialmente nos animais PRE-TTO, ocorre restauração da função bioenergética, bloqueio do *swelling* mitocondrial induzido por cálcio, manutenção do potencial de membrana mitocondrial e mitigação do estresse oxidativo. Deste modo, aponta-se que os efeitos da 6-OHDA nas mitocôndrias cerebrais são evitáveis por meio do pré-tratamento com VITD, mas não tratáveis pela suplementação de VITD, posterior a lesão, pelo menos nesses regimes de tratamento de 14 dias.

Notavelmente, o pré-tratamento com VITD preveniu os efeitos da 6-OHDA na taxa de respiração mitocondrial máxima, desencadeada pela adição de ADP à preparação mitocondrial na presença de substratos adequados, promovendo a preservação, parcial ou completa no consumo de O<sub>2</sub>. Em congruência com tal achado, e juntamente com a manutenção do estado 4, observa-se a restauração da RCR e razão ADP/O para os animais do grupo PRE-TTO. Salles e colaboradores (2022) apontam que a forma ativa da VITD, ou seja, 1,25-diidroxitamina D é um regulador chave da atividade mitocondrial, evidenciando que o consumo máximo de oxigênio foi



significativamente menor nas fibras musculares de ratos com deficiência de vitamina D, quando comparados aos animais controle.

Em conformidade com a manutenção da atividade bioenergética, também se atestou que a suplementação com VITD mitigou o *swelling* mitocondrial e restaurou o potencial de membrana mitocondrial após lesão por 6-OHDA. O efeito elementar da abertura do mPTP é a despolarização da membrana mitocondrial, acarretada pela perda da homeostase iônica e subsequente entrada de íons para o interior da matriz mitocondrial. Assim, a PTP desempenha um papel crucial nas alterações da estrutura e função das mitocôndrias, envolvidas na lesão neuronal relevante para o envelhecimento e doenças neurodegenerativas, incluindo a DP (CHAPA-DUBOCQ et al., 2018; HALESTRAP, 2006; KAASIK et al., 2007; RAO et al., 2014; YAO et al., 2021).

Vários fatores podem contribuir para o aumento do estresse oxidativo no cérebro com DP, incluindo: disfunção mitocondrial, neuroinflamação, comprometimento do metabolismo do ferro e produção elevada de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e EROs, consequência do aumento do *turnover* de dopamina (SAITO, 2017).

Como evidenciado na nossa pesquisa, o grupo 6-OHDA apresentou um aumento de aproximadamente 3,9 vezes na produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, em comparação com o grupo controle e uma redução expressiva dos níveis cerebrais de enzima SOD citosólica, quando comparados aos do grupo FO.

Pesquisa realizada por Silva et al. (2018) evidenciam que células SH-SY5Y expostas a 6-OHDA (100 µM) promoveu forte despolarização da membrana mitocondrial e aumento de mais de duas vezes nos níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A convergência de todas essas evidências suporta a hipótese de que o estresse oxidativo e a disfunção mitocondrial podem ser responsáveis pela morte celular. Além disso, esses dois eventos são descritos como inteiramente relacionados, pois a ocorrência de disfunção mitocondrial pode levar à depleção de ATP, induzindo efeitos irreversíveis nos processos celulares, levando à formação de radicais livres. Conseqüentemente, a perda do potencial transmembrana mitocondrial pode resultar na ruptura da membrana mitocondrial externa e na liberação de proteínas pró-apoptóticas do núcleo, levando à morte celular através da ativação da via de apoptose intrínseca (JOZA et al., 2001; ONYANGO, 2008; SILVA et al., 2018).

Processos, como autofagia, disfunção mitocondrial, inflamação, estresse oxidativo, alterações epigenéticas, distúrbios do DNA e alterações na sinalização de  $\text{Ca}^{2+}$  e estresse oxidativo (minorando a geração de espécies reativas de oxigênio e avolumando a síntese de antioxidantes endógenos), são todos conhecidos por serem regulados por VITD e serão aprimorados em indivíduos com deficiência desta vitamina (BERRIDGE, 2017).

Pesquisas realizadas De Siqueira (2022), Lima et al. (2018) e Wimalawansa (2019) por propõem que a VITD apresenta propriedades antioxidantes, modula positivamente a expressão de enzimas antioxidantes, atenua a expressão de marcadores de estresse oxidativo e promove a homeostase redox. Endossando tais achados, o presente estudo evidenciou que, os animais PRE-TTO apresentaram aumento de mais de 70% nas concentrações de SOD citosólico e reduziram em cerca de 65% a produção de  $\text{H}_2\text{O}_2$  mitocondrial.

Sabe-se que a neurodegeneração dopaminérgicas evidente tanto em pacientes com DP como em modelos animais de parkinsonismo, promove redução da imunomarcagem para TH, bem como leva à perda substancial de marcadores pré-sinápticos, como o para DAT, provavelmente devido a efeitos compensatórios que visam manter a funcionalidade sináptica em face da diminuição da dopamina. Enfatiza-se que a tirosina hidroxilase, é a enzima limitante da taxa de biossíntese de dopamina, e pacientes com DP apresentam diminuta concentração, de tal forma que a DP é considerada uma síndrome de deficiência de TH do corpo estriado. Ademais, em experimentos com neurotoxinas que induzem a morte neuronal, a imunomarcagem deficiente para DAT é um reflexo direto do processo neurodegenerativo instalado. Assim, a coloração DAT pode ser considerada um indicador da integridade da membrana dos neurônios dopaminérgicos (AFONSO-ORAMAS et al., 2010; BÄCK et al., 2013; TABREZ et al., 2012).

Como esperado, os estriados dos ratos 6-OHDA apresentaram diminuição da imunomarcagem para TH e DAT em comparação com o grupo FO. Ao passo que a suplementação com VITD preveniu ou atenuou parcialmente essas alterações, sugerindo um efeito neuroprotetor da VITD na perda neuronal dopaminérgica. Nossas análises de imuno-histoquímica revelaram que a imunoexpressão para TH nos grupos PRE-TTO e POS-TTO foram significativamente maiores, em comparação com o grupo lesionado. Efeitos semelhantes foram observados na expressão DAT. Tais achados

sugerem um efeito neuroprotetor da VITD sob a perda neuronal dopaminérgica, induzida por 6-OHDA. Tais achados são endossados pela pesquisa de Kim et al. (2020) que evidenciaram robusta perda da marcação com TH no SNpc e corpo estriado após a injeção estriatal de 6-OHDA, sendo essa revertida após pré-tratamento com 1,25(OH)2D3. Ademais, notabiliza-se que de acordo Bayo-Olugbami et al. (2022) a suplementação com VITD conseguiu reverter a neurotoxicidade induzida pela 6-OHDA, revertendo a diminuição da expressão de TH e DAT desencadeadas pela toxina (BAYO-OLUGBAMI et al., 2022; KIM et al., 2020).

Uma das principais proteínas que regulam a função mitocondrial é o VDAC, e sua regulação é crucial não apenas para as funções metabólicas das mitocôndrias, mas também para a sobrevivência celular. A principal isoforma, VDAC1, representa o principal local de ancoragem mitocondrial de muitas proteínas mal dobradas, como amilóide  $\beta$  e Tau, na DA e  $\alpha$ -sinucleína, na DP. Esses resultados sugerem que a dupla regulação da mitofagia e apoptose por Parkin, via poli e monoubiquitinação VDAC1, é altamente crítica na proteção das células da patogênese da doença de Parkinson (CAMARA et al., 2017; MAGRI; MESSINA, 2017; MAITI et al., 2017; HAM et al., 2020).

No presente estudo, distingue-se que após a lesão de 6-OHDA no estriado lesionado é uma alta expressão de VDAC1, em comparação com o grupo SO, e essa alteração foi significativamente atenuada após a suplementação de VITD, evidenciando mais uma via molecular do efeito neuroprotetor da VITD na lesão da 6-OHDA. Além disso, os níveis de VDAC1 mostraram-se elevados nas regiões afetadas de cérebros pós-morte com DA e cérebros de camundongos transgênicos com proteína precursora de amilóide. Além disso, estudos com cérebros pós-morte de pacientes com Doença de Alzheimer, bem como em modelos de DA em camundongos, revelaram que VDAC1 está ligado a  $A\beta$  e tau fosforilada, bloqueando os poros de transição de permeabilidade mitocondrial, interrompendo o transporte de proteínas e metabólitos mitocondriais, prejudicando o controle de VDAC e culminando em defeitos na fosforilação oxidativa, levando à disfunção mitocondrial nos neurônios (SHOSHAN-BARMATZ et al., 2010; REDDY, 2013; SHOSHAN-BARMATZ et al., 2017; VARUGHESE et al., 2021).

A proteína Hsp60 é classicamente conhecida como uma proteína chaperonina mitocondrial, e mutações no gene Hsp60 estão associadas a distúrbios neurodegenerativos. No mesencéfalo e estriado de camundongos tratados com MPTP

e na substância negra de pacientes com DP, o mRNA da Hsp60 é regulado positivamente, sugerindo que Hsp60 provavelmente participa da morte neuronal dopaminérgica na DP (NOELKER et al., 2014; ALBERTI et al., 2021).

Mostramos que a expressão de Hsp60 está drasticamente aumentada no estriado esquerdo (não lesionado) e direito (lesionado), em comparação com os controles (grupos FO). Esses efeitos também foram altamente atenuados pela suplementação de vitamina D. As mutações da Hsp60 estão associadas a doenças neurodegenerativas. Além disso, as proteínas Hsp desempenham um papel importante em auxiliar outras proteínas a se enovelar corretamente e na prevenção da agregação e acúmulo de proteínas em conformações mal enoveladas. No entanto, o processo de envelhecimento degrada significativamente essa capacidade de manter a homeostase proteica e a agregação aberrante de proteínas mal dobradas pode desencadear várias doenças neurodegenerativas, como a DP (BROSS et al., 2012; DUKAY et al., 2019; PRAS; NOLLEN, 2021).

## 7. CONCLUSÃO

A suplementação com VITD, especialmente o pré-tratamento, demonstrou efeito neuroprotetor contra a neurotoxicidade induzida pela 6-OHDA, modelo de parkinsonismo experimental. Em linhas gerais o conjunto dos resultados obtidos demonstrou que:

- O PRÉ-TTO e PÓS-TTO com VITD mitigaram os efeitos no comportamento motor promovidos pela 6-OHDA, diminuindo o número de rotações contralaterais induzido por apomorfina e hipolocomoção horizontal e vertical;
- Tanto o PRÉ-TTO quanto o PÓS-TTO com VITD foram capazes de reverter o comportamento tipo depressivo causado pela lesão com 6-OHDA;
- A adição da VITD, a *pool* de mitocôndrias cerebrais, demonstrou ação dose dependente sobre o *swelling* mitocondrial e potencial de ação mitocondrial, sob ação da 6-OHDA e da rotenona em ensaio *in vitro*;
- O PRÉ-TTO com vitamina D restituiu a atividade bioenergética, evidenciados pela manutenção da razão de controle respiratório (RCR) e razão ADP/O;
- O PRÉ-TTO e o PÓS-TTO com vitamina D preveniu o *swelling* mitocondrial e promoveu a manutenção do potencial de membrana;
- O PRE-TTO com vitamina D foi efetiva na redução dos níveis mitocondriais de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e aumentou as concentrações de SOD citosólico;
- O PRÉ-TTO com vitamina D aumentou a imunorreatividade para TH, DAT, VDAC1 e Hsp60.

## REFERÊNCIAS

- ADAMS, J.S.; HEWISON, M. Update in vitamin D. **J Clin Endocrinol Metab.**, v. 95, 471e8, 2010.
- AFONSO-ORAMAS, D.; CRUZ-MUROS, I.; BARROSO-CHINEA, P.; ÁLVAREZ DE LA ROSA, D.; CASTRO-HERNÁNDEZ, J.; SALAS-HERNÁNDEZ, J.; GIRÁLDEZ, T. GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, T. The dopamine transporter is differentially regulated after dopaminergic lesion. **Neurobiol Dis.** v.40, p.518–30, 2010.
- ALBERTI, G.; PALADINO, L.; VITALE, A.M.; CARUSO BAVISOTTO, C.; CONWAY DE MACARIO, E.; CAMPANELLA, C.; MACARIO, A.J.L.; MARINO GAMMAZZA, A., Functions and therapeutic potential of extracellular Hsp60, Hsp70, and Hsp90 in neuroinflammatory disorders. **Appl. Sci.**, v.11, n.2, p. 736, 2021.
- ALTEMUS, K. L.; FINGER, S.; WOLF, C.; BIRGE, S. J. Behavioral correlates of vitamin D deficiency. **Physiol Behav.** v.39, p.435–340, 1987.
- ANGLIN, R. E.; SAMAN, Z.; WALTER, S. D.; MCDONALD, S. D. Vitamin D deficiency and depression in adults: systematic review and meta-analysis. **Br J Psychiatry.**, v.202, p.100–7, 2013.
- ARAÚJO DE LIMA, L.; CUNHA, P.L.O.; CALOU, I.B.F.; NEVES, K.R.T.; FACUNDO, H.T.; VIANA, G.S.B. Effects of vitamin D (VD3) supplementation on the brain mitochondrial function of male rats, in the 6-OHDA-induced model of Parkinson's disease. **Neurochem Int.**, v.154, 105280, 2022.
- AZZAM, A.Y.; GHOZY, S.; AZAB, M.A. Vitamin D and its' role in Parkinson's disease patients with SARS-CoV-2 infection. A review article. **Interdiscip Neurosurg.**, v.27, p.101441, 2022.
- BÄCK, S.; RAKI, M.; TUOMINEN, R.K.; RAASMAJA, A.; BERGSTRÖM, K.; MÄNNISTÖ, P.T. High correlation between in vivo [123I]β-CIT SPECT/CT imaging and post-mortem immunohistochemical findings in the evaluation of lesions induced by 6-OHDA in rats. **EJNMMI Res.**, v.3, n.1, p.46, 2013.
- BALABAN, R. S.; NEMOTO, S.; FINKEL, T. Mitochondria, oxidants, and aging. **Cell.** v.120, n.4, p.483–495, 2005.
- BANDRES-CIGA, S.; SAEZ-ATIENZAR, S.; KIM, J. J.; MAKARIOUS, M. B.; FAGHRI, F.; DIEZ-FAIREN, M.; IWAKI, H.; LEONARD, H.; BOTIA, J.; RYTEN, M.; HERNANDEZ, D.; GIBBS, J. R.; DING, J.; GAN-OR, Z.; NOYCE, A.; PIHLSTROM, L.; TORKAMANI, A.; SOLTIS, A. R.; DALGARD, C. L. Large-scale pathway specific polygenic risk and transcriptomic community network analysis identifies novel functional pathways in Parkinson disease. **Acta Neuropathol.** v.140, n.3, p.341–358, 2020.

- BARICHELLA, M.; GARRÌ, F.; CARONNI, S.; BOLLIRI, C.; ZOCCHI, L.; MACCHIONE, M.C.; FERRI, V.; CALANDRELLA, D.; PEZZOLI, G. Vitamin D Status and Parkinson's Disease. *Brain Sci.*, v.12, n.6, p.790, 2022.
- BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide Dismutase: Improved Assays and an Assay Applicable to Acrylamide Gels. **Analytical Biochemistry**, v.44, n.1, p.276-287, 1971.
- BETARBET, R.; SHERER, T. B.; MACKENZIE, G.; GARCIA-OSUNA, M.; PANOV, A. V.; GREENAMYRE, J. T. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease, **Nat. Neurosci.**, v.3, n.12, p.1301–1306, 2000.
- BIKLE, D.D.; Vitamin D metabolism, mechanism of action, and clinical applications. **Chem Biol.**, v.21, n.3, p.319-329, 2014.
- BIVONA, G.; AGNELLO, L.; BELLIA, C.; IACOLINO, G.; SCAZZONE, C.; LO SASSO, B.; CIACCIO, M. Non-Skeletal Activities of Vitamin D: From Physiology to Brain Pathology. *Medicina*. V.55, n. 7, p.341, 2019.
- BISBAL M.; SANCHEZ M. Neurotoxicity of the pesticide rotenone on neuronal polarization: A mechanistic approach. **Neural. Regen. Res.**, v.14, p.762–766, 2019.
- BLANDINI, F.; ARMENTERO, M.T.; MARTIGNONI, E. The 6-hydroxydopamine model: news from the past. **Parkinsonism & related disorders**. v. 14, n. 2, p.124-129, 2008.
- BOSE, A.; BEAL, M. F. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. **J. Neurochem**, v.1, p.216-31, 2016.
- BRAAK, H.; DE VOS, R. A.; BOHL, J.; DEL TREDICI, K. Gastric alpha-synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Auerbach's plexuses in cases staged for Parkinson's disease-related brain pathology, **Neurosci. Lett.** v.396, n.1, p.67–72, 2006.
- BRAAK, H.; DEL TREDICI, K.; RÜB, U.; DE VOS, R. A.; JANSEN STEUR, E. N.; BRAAK, E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. **Neurobiol. Aging**, v.24, n.2, p.197–211, 2003.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Biochemistry**, v.72, p.248–254, 1976.
- BRENNER. C.; MOULIN, M. Physiological roles of the permeability transition pore. **Circ Res.**, v.111, n.9, p.1237–1247, 2012.
- BROADHURST, P. L. Determinants of emotionality in the rat. I. Situational factors. **Br J Psychol**, v.48, n.1, p.1-12, 1957.

BROSS, P.; MAGNONI, R.; BIE, A.S. Molecular chaperone disorders: defective Hsp60 in neurodegeneration. **Curr. Top. Med. Chem.**, v.12, n.22, p.2491–2503, 2012.

BROWN, J.; BIANCO, J.I.; MCGRATH, J.J.; EYLES, D.W. 1,25-Dihydroxyvitamin D 3 induces nerve growth factor, promotes neurite outgrowth and inhibits mitosis in embryonic rat hippocampal neurons. **Neurosci Lett.**, v.343, n.2, p.139–43, 2003.

BURNS, R.S.; CHIUEH, C.C.; MARKEY, S.P.; EBERT, M.H.; JACOBOWITZ, D.M.; KOPIN, I.J. A primate model of parkinsonism: selective destruction of dopaminergic neurons in the pars compacta of the substantia nigra by N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.80, n.14, p.4546–4550, 1983.

CABREIRA, V.; MASSANO, J. Parkinson's Disease: Clinical Review and Update. **Acta Med Port.**, v.32, n.10, p.661-70, 2019.

CACABELOS, R. Parkinson's Disease: From Pathogenesis to Pharmacogenomics. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 8, n.551, p.1-28, 2017.

CAMARA, A.K.; LESNEFSKY, E.J.; STOWE, D.F. Potential therapeutic benefits of strategies directed to mitochondria. **Antioxid Redox Signal.** v.13, p.279–347, 2010.

CAMARA, A.K.S.; ZHOU, Y.; WEN, P.-C.; TAJKHORSHID, E.; KWOK, W.-M. Mitochondrial VDAC1: a key gatekeeper as a potential therapeutic target. **Front. Physiol.**, v.8, n.460, 2017.

CARVALHO, Hernandes F. **A célula** / Hernandes F. Carvalho, Shirlei Maria Recco-Pimentel. – 3. ed. – Barueri, SP : Manole, 2013.

CASSOTTA, M.; GEERTS, H.; HARBOM, L.; OUTEIRO, T. F.; PEDIADITAKIS, I.; REINER, O.; SCHILDKNECHT, S.; SCHWAMBORN, J. C.; BAILEY, J.; HERRMANN, K.; HOGBERG, H. T. The future of Parkinson's disease research: A new paradigm of human-specific investigation is necessary and possible. **ALTEX**, v.39, n.4, p.694–709, 2022.

CHANG, S.W.; LEE, H.C. Vitamin D and health - The missing vitamin in humans. **Pediatr Neonatol.**, v.60, n.3, p.237-244, 2019.

CHAPA-DUBOCQ, X.; MAKAROV, V.; JAVADOV, S. Simple kinetic model of mitochondrial swelling in cardiac cells. **J. Cell. Physiol.**, v.233, p.5310–5321, 2018.

CHEN, L.; MO, M.; LI, G.; CEN, L.; WEI, L.; XIAO, Y.; CHEN, X.; LI, S.; YANG, X.; QU, S.; XU, P. The biomarkers of immune dysregulation and inflammation response in Parkinson disease. **Transl Neurodegener.**, v.5, n.1, p.16, 2016.

CHIODINI, I.; GATTI, D.; SORANNA, D.; MERLOTTI, D.; MINGIANO, C.; FASSIO, A.; ADAMI, G.; FALCHETTI, A.; ELLER-VAINICHER, C.; ROSSINI, M.; PERSANI, L.; ZAMBON, A.; GENNARI, L. Vitamin D Status and SARS-CoV-2 Infection and COVID-19 Clinical Outcomes. **Front. Public Health.**, v.9, 736665, 2021.



CHOWDHURY, R. et al. Vitamin D and risk of cause specific death: systematic review and meta-analysis of observational cohort and randomised intervention studies. **BMJ (Clinical research ed.)**. v.348, g1903, 2014.

CHU, Y.; GOLDMAN, J.G.; KELLY, L.; HE, Y.; WALICZEK, T.; KORDOWER, J.H., Abnormal alpha-synuclein reduces nigral voltage-dependent anion channel 1 in sporadic and experimental Parkinson's disease. **Neurobiol.**, v.69, p.1–14, 2014.

CUI, X.; EYLES, D.W. Vitamin D and the Central Nervous System: Causative and Preventative Mechanisms in Brain Disorders. **Nutrients**. v.14, n.20, p.4353. 2022.

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

DELUCA, H.F. Evolution of our understanding of vitamin D. **Nutr Rev.**, v.66, n.10, p.S73–S87, 2008.

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**, v.175, n.2, p.303-317, 2002.

DE SIQUEIRA, E.A.; MAGALHÃES, E.P.; DE MENEZES, R.R.P.P.B.; SAMPAIO, T.L.; LIMA, D.B.; DA SILVA MARTINS, C.; NEVES, K.R.T.; DE CASTRO BRITO, G.A.; MARTINS, A.M.C.; VIANA G.S.B. Vitamin D3 actions on astrocyte cells: a target for therapeutic strategy in Parkinson's disease?, **Neurosci Lett.**, v. 2, 136997, 2022.

DI MEO, S.; REED, T.T.; VENDITTI, P.; VICTOR, V.M. Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions. **Oxid Med Cell Longev.**, 1245049, 2016.

DICKSON, D.W. Parkinson's disease and Parkinsonism: Neuropathology. **Cold**

DING, H.; DHIMA, K.; LOCKHART, K. C.; LOCASCIO, J. J.; HOESING, A. N.; DUONG, K.; TRISINI-LIPSANOPOULOS, A.; HAYES, M. T.; SOHUR, U. S.; WILLS, A. M.; MOLLENHAUER, B.; FLAHERTY, A. W.; HUNG, A. Y.; MEJIA, N.; KHURANA, V.; GOMPERS, S. N.; SELKOE, D. J.; SCHWARZSCHILD, M. A.; SCHLOSSMACHER, M. G.; HYMAN, B. T.; SCHERZER, C. R. Unrecognized vitamin D3 deficiency is common in Parkinson disease: Harvard biomarker study. **Neurology**. v.81, p.1531–7, 2013.

DIONÍSIO, P. A.; AMARAL, J. D.; RODRIGUES, C. M. P. Oxidative stress and regulated cell death in Parkinson's disease. **Ageing Research Reviews**, v.67, 101263, 2021.

DOROUDI, M.; SCHWARTZ, Z.; BOYAN, B.D. Membrane-mediated actions of 1,25-dihydroxy vitamin D3: A review of the roles of phospholipase A2 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.

DORSEY, E. R.; CONSTANTINESCU, R.; THOMPSON, J. P.; BIGLAN, K. M.; HOLLOWAY, R. G.; KIEBURTZ, K.; MARSHALL, F. J.; RAVINA, B. M.; SCHIFFITTO, G.; SIDEROWF, A.; TANNER, C. M. Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030, **Neurology**, v.68, n.5, p.384–386, 2007.

DUKAY, B.; CSOBOZ, B.; TÓTH, M.E. Heat-Shock proteins in neuroinflammation. **Front. Pharmacol.** v.10, 2019.

DZIK, K.P.; KACZOR, J.J. Mechanisms of vitamin D on skeletal muscle function: oxidative stress, energy metabolism and anabolic state. **Eur J Appl Physiol.**, v.119, n.4 ,p.825-839, 2019.

EVATT, M.L.; DELONG, M.R.; KHAZAI, N.; ROSEN, A.; TRICHE, S.; Exogenous  $\alpha$ -synuclein fibrils induce Lewy body pathology leading to synaptic dysfunction and neuron death, **Neuron.**, v.72, n.1, p.57–71, 2011.

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.**, v.34, p.47–64, 2013.

FEARNLEY, J.M.; LEES, A.J. Ageing and Parkinson's disease: Substantia nigra regional selectivity. **Brain.** v.114, n.5, p.2283–301, 1991.

FULLARD, M.E.; DUDA, J.E. A Review of the Relationship Between Vitamin D and Parkinson Disease Symptoms. **Front Neurol.** v.27, n.11, p.454, 2020.

GAN, Y.; LI, L.; ZHANG, L.; YAN, S.; GAO, C.; HU, S.; QIAO, Y.; TANG, S.; WANG, C.; LU, Z. Association between shift work and risk of prostate cancer: a systematic review and meta-analysis of observational studies. **Carcinogenesis.** v.39, n.2, p.87-97, 2018.

GARLAND, C.F.; GARLAND, F.C.; GORHAM, E.D.; LIPKIN, M.; NEWMARK, H.; MOHR, S.B.; HOLICK, M. F. "The role of vitamin D in cancer prevention", **Am J Public Health.** v.96, n.2, p.252–261, 2006.

GBD 2016 Neurology Collaborators. Global, regional, and national burden of neurological disorders, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. **Lancet Neurol.** v.18, n.5, p.459-480, 2019.

GENG, C.; SHAIKH, A.S.; HAN, W.; CHEN, D.; GUO, Y.; JIANG, P. Vitamin D and depression: mechanisms, determination and application. **Asia Pac J Clin Nutr.**, v.28, n.4, p.689-694, 2019.

GONÇALVES, D.F.; COURTES, A.A.; HARTMANN, D.D.; DA ROSA, P.C.; OLIVEIRA, D.M.; SOARES, F. A.A.; DALLA CORTE, C.L. 6-Hydroxydopamine

induces different mitochondrial bioenergetics responses in brain regions of rats. **Neurotoxicology (Little Rock)**, v.70, p.1–11, 2019.

GORBATYUK, O. S.; LI, S.; SULLIVAN, L. F.; CHEN, W.; KONDRIKOVA, G.; MANFREDSSON, F. P.; MANDEL, R. J.; MUZYCZKA, N. The phosphorylation state of Ser-129 in human alpha-synuclein determines neurodegeneration in a rat model of Parkinson disease, **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v.105, v.2, p.763–768, 2008.

GOULD, J. F.; ANDERSON, A. J.; YELLAND, L. N.; SMITHERS, L. G.; SKEAFF, C. M.; GIBSON, R. A.; MAKRIDES, M. Association of cord blood vitamin D at delivery with postpartum depression in Australian women. **Aust NZ J Obstet Gynaecol.**, v.55, n.5, p.446–52, 2015.

GREEN, D. R; REED, J. C. Mitochondria and apoptosis. **Science**, v. 281, p. 1309–1312, 1998.

GRIVENNIKOVA, V.G.; MAKLASHINA, E.O.; GAVRIKOVA, E.V.; VINOGRADOV, A.D. Interaction of the mitochondrial NADH-ubiquinone reductase with rotenone as related to the enzyme active/inactive transition. **Biochim Biophys Acta.**, v.1319, p. 223-232, 1997.

GUNNARSSON, L.G.; BODIN, L. Occupational Exposures and Neurodegenerative Diseases-A Systematic Literature Review and Meta-Analyses. **Int J Environ Res Public Health**. v.16, n.3, p.337, 2019.

HALESTRAP, A. P.; KERR, P. M.; JAVADOV, S.; WOODFIELD, K. Y. Elucidating the molecular mechanism of the permeability transition pore and its role in reperfusion injury of the heart. **Biochim Biophys Acta**. v.1366, 79–94.1998.

HALESTRAP, A.P. The regulation of the matrix volume of mammalian mitochondria in vivo and in vitro and its role in the control of mitochondrial metabolism. **Biochim Biophys Acta**. v.973, n.3, p.355-82,1989.

HAM, S.J.; LEE, D.; YOO, H.; JUN, K.; SHIN, H.; CHUNG, J. The decision between mitophagy and apoptosis by Parkin via VDAC1 ubiquitination. **Proc. Natl. Acad. Sci. Unit. States Am.**, v.117, p.4281–4291, 2020.

HATEFI, Y. The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. **Annual Review of Biochemistry**, v. 54, p. 1015-1069, 1985.

HAUSSLER, M.R.; NORMAN, A.W. Chromosomal receptor for a vitamin D metabolite. **Proc Natl Acad Sci USA.**, v.62, n.1, p.155–162, 1969.

HE, J.; ZHU, G.; WANG, G.; ZHANG, F. Oxidative stress and neuroinflammation potentiate each other to promote the progression of dopamine neurodegeneration. **Oxid. Med. Cell. Longev.** 2020.

HEIDEN, M.G.V.; CHANDEL, N.S.; WILLIANSON, E.K.; SCHUMACKER, P.T.; THOMPSON, C. B.. Bcl-XL regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria. **Cell, Cambridge**, v. 91, p. 627-637, 1997.

HEIKKILA, R.E.; HESS, A.; DUVOISIN, R.C. Dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine (MPTP) in the mouse: relationships between monoamine oxidase, MPTP metabolism and neurotoxicity. **Life Sci**, v.36, p.231–236, 1985.

HINKLE J. L.; CHEEVER K. H. **Brunner & Suddarth's textbook of medical-surgical nursing**. 13. ed., p. 2063. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins. 2014.

HOLICK, M. F.; MACLAUGHLIN, J. A.; CLARK, M. B.; HOLICK, S. A.; POTTS, J. T. JR.; ANDERSON, R. R.; BLANK, I. H.; PARRISH, J. A.; ELIAS, P. Photosynthesis of previtamin D3 in human skin and the physiologic consequences. **Science**. v.210, n. 4466, p.203-205, 1980.

HOLICK, M. F.; RICHTAND, N. M.; MCNEILL, S. C.; HOLICK, S. A.; FROMMER, J. E.; HENLEY, J. W.; POTTS, J.T.JR. Isolation and identification of pre-vitamin D3 from the skin of rats exposed to ultraviolet- irradiation. **Biochemistry**. v.18, n.6, p.1003-1008, 1979.

HOLICK, M.F. Vitamin D status: measurement, interpretation, and clinical application. **Ann Epidemiol.**, v.19, n.2, p.73–78, 2009.

HRNKOVA, M.; ZILKA, N.; MINICHOVA, Z.; KOSON, P.; NOVAK, M. Neurodegeneration caused by expression of human truncated tau leads to progressive neurobehavioural impairment in transgenic rats. **Brain Res**,. v.1130, n.1, p.206-213, 2007.

HWANG, O. Role of oxidative stress in Parkinson's disease. **Exp Neurobiol**, v.22, n.1, p.11–17, 2013.

**INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE)**. Diretoria de Pesquisas. Coordenação de Pesquisas por Amostra de Domicílios. Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios Contínua 2012/2021. Rio de Janeiro: IBGE, 2022. Disponível em:

<[https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv101957\\_informativo.pdf](https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv101957_informativo.pdf)> Acesso em: nov de 2022.

ISRAEL, A.; CICUREL, A.; FELDHAMER, I.; STERN, F.; DROR, Y.; GIVEON, S.M.; GILLIS, D.; STRICH, D.; LAVIE G. Vitamin D deficiency is associated with higher risks for SARS-CoV-2 infection and COVID-19 severity: A retrospective case-control study. **Intern. Emerg. Med.**, v.17, p.1053–1063, 2022.

JEONG, E. M.; CHUNG, J.; LIU, H.; GO, Y.; GLADSTEIN, S.; FARZANEH-FAR, A.; LEWANDOWSKI, E. D.; DUDLEY, S. C., JR. Role of mitochondrial oxidative stress in

glucose tolerance, insulin resistance, and cardiac diastolic dysfunction. **J Am Heart Assoc.**, v.5, n.5, p.e003046, 2016.

JIANG, X.; JIN, T.; ZHANG, H.; MIAO, J.; ZHAO, X.; SU, Y.; ZHANG, Y. Current Progress of Mitochondrial Quality Control Pathways Underlying the Pathogenesis of Parkinson's Disease. **Oxid Med Cell Longev.** v.14, 4578462, 2019.

JOZA, N.; SUSIN, S.A.; DAUGAS, E.; STANFORD, W.L.; CHO, S.K.; LI, C.Y.; SASAKI, T.; ELIA, A.J.; CHENG, H-YM.; RAVAGNAN L. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. **Nature.** v.410, p.549–554, 2001.

KAASIK, A.; SAFIULINA, D.; ZHARKOVSKY, A.; VEKSLER, V. Regulation of mitochondrial matrix volume. **Am.J. Physiol. Cell Physiol.**, Bethesda, v.292, p.157-163, 2007.

KAASINEN, V.; VAHLBERG, T.; SUOMINEN, S. Increasing age-adjusted male-to-female incidence ratio of Parkinson's disease. **Mov Disord.** v.30, p.286–8, 2015.

KALANI, K.; YAN, S.F.; YAN, S.S. Mitochondrial permeability transition pore: a potential drug target for neurodegeneration. **Drug Discov Today**, v.23, n.12, p.1983–1989, 2018.

KALIA, L.V.; LANG, A.E. Parkinson's disease. **Lancet**, v.386, n.9996, p.896–912, 2015.

KESBY, J.P.; CUI, X.; O'LOAN, J.; MCGRATH, J. J.; BURNE, T.H.; EYLES, D.W. Developmental vitamin D deficiency alters dopamine-mediated behaviors and dopamine transporter function in adult female rats. **Psychopharmacology.** v.208, n.1, p.159–68, 2010.

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

KNEKT, P.; KILKKINEN, A.; RISSANEN, H.; MARNIEMI, J.; SÄÄKSJÄRVI, K.; HELIÖVAARA M. Serum vitamin D and the risk of Parkinson's disease. **Arch Neurol.** v. 67, p.808–11, 2010.

KORDOWER, J.H.; OLANOW, C.W.; DODIYA, H.B.; CHU, Y.; BEACH, T.G.; ADLER, C.H.; HALLIDAY, G.M.; BARTUS, R.T. Disease duration and the integrity of the nigrostriatal system in Parkinson's disease. **Brain.** 2013 Aug v. 136, n.8,p.2419–31, 2013.

KOSAKAI, A.; ITO, D.; NIHEI, Y.; YAMASHITA, S.; OKADA, Y.; TAKAHASHI, K.; SUZUKI, N. Degeneration of mesencephalic dopaminergic neurons in klotho mouse related to vitamin D exposure. **Brain Res.**, v.1382, p.109–117, 2011.

KOULI, A.; TORSNEY, K.M.; KUAN, W.L. Parkinson's Disease: Etiology, Neuropathology, and Pathogenesis. In: Stoker TB, Greenland JC, editors. Parkinson's Disease: Pathogenesis and Clinical Aspects [Internet]. Brisbane (AU): Codon Publications; 2018 Dec 21. Chapter 1. PMID: 30702842.

KUDIN, A.P.; BIMPONG-BUTA, N.Y.; VIELHABER, S.; ELGER, C.E.; KUNZ, W.S. Characterization of superoxide-producing sites in isolated brain mitochondria. **J Biol Chem.** v.279, p.4127–4135, 2004.

LANGSTON, J.W.; BALLARD, P.; TETRUD, J.W.; IRWIN, I. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. **Science**, v.219, p.979–980. 1983.

LARSSON, S. C.; SINGLETON, A. B.; NALLS, M. A.; RICHARDS, J. B. International Parkinson's Disease Genomics Consortium (IPDGC). No clear support for a role for vitamin D in Parkinson's disease: a Mendelian randomization study. **Mov Disord.** v.32, p.1249–52, 2017.

LEBLANC, T.; NEMERE, L. Actin and Keratin are Binding Partners of the 1,25D3-MARRS Receptor/PDIA3/ERp57. **Immunol. Endocr. Metab. Agents Med. Chem.** v.14, p.55–66, 2014.

LECOUER, H.; LANGONNÉ, A.; BAUX, L.'REBOUILLAT, D.'RUSTIN, P.; PRÉVOST, M.C.; BRENNER, C.'EDELMAN, L.'JACOTOT, E.. Real-time flow cytometry analysis of permeability transition in isolated mitochondria. **Exp. Cell Res.**, v. 294, p. 106-117, 2004.

LEE, J.; PINARES-GARCIA, P.; LOKE, H.; HAM, S.; VILAIN, E.; HARLEY, V.R. Sex-specific neuroprotection by inhibition of the Y-chromosome gene, *SRY*, in experimental Parkinson's disease. **Proc. Natl. Acad. Sci. Unit. States Am.**, v.116, n.33, p.16577–16582, 2019.

LEES, A.J.; HARDY, J.; REVEZ, T. Parkinson's disease. **Lancet.** v.373, p.2055–66, 2009.

Li, C. H.; Tang, X.; Wasnik, S.; Wang, X.; Zhang, J.; Xu, Y.; Lau, K. W.; Nguyen, H. B.; Baylink, D. J. Mechanistic study of the cause of decreased blood 1,25-dihydroxyvitamin D in sepsis. **BMC Infect Dis.**, v.19, n.1, p.1020,2019

LIANG, C.L.; WANG, T.T.; LUBY-PHELPS, K.; GERMAN, D. (2007). Mitochondria mass is low in mouse substantia nigra dopamine neurons: Implications for Parkinson's disease. **Exp Neurol.** v.203, n.2, p.370-380, 2007.

LIMA L.A.; CUNHA, P.L.O.; CALOU, I.B.F.; NEVES, K.R.T.; FACUNDO, H. T.; VIANA, G. S. B. Effects of vitamin D (VD3) supplementation on the brain mitochondrial function of male rats, in the 6-OHDA-induced model of Parkinson's disease. **Neurochemistry International**, v.154, 105280, 2022.

LIMA, L. A. R.; LOPES, M. J. P.; COSTA, R. O.; LIMA, F. A. V.; NEVES, K. R. T.; CALOU, I. B. F.; ANDRADE, G. M.; VIANA, G. S. B. Vitamin D protects dopaminergic neurons against neuroinflammation and oxidative stress in hemiparkinsonian rats. **J Neuroinflammation**, v.15, n.1, p. 249, 2018.

LOPEZ-MEDIAVILLA, C.; ORFAO, A.; GONZALEZ, M.; MEDINA, J.M. Identification by low cytometry of two distinct rhodamine-123-stained mitochondrial populations in rat liver. **FEBS Lett.**, v. 254, n.1,2 , p.115-120, 1989.

LV Y.-Q., YUAN L.; SUN Y.; DOU H.-W.; SU J.-H.; HOU Z.-P., et al. Long-term hyperglycemia aggravates  $\alpha$ -synuclein aggregation and dopaminergic neuronal loss in a Parkinson's disease mouse model. **Transl. Neurodegener.**, v.11, p.14–16, 2022.

LV, L.; TAN, X.; PENG, X.; BAI, R.; XIAO, Q.; ZOU, T.; TAN, J.; ZHANG, H.; WANG, C. The relationships of vitamin D, vitamin D receptor gene polymorphisms, and vitamin D supplementation with Parkinson's disease. **Transl Neurodegener.** v.9, n.1, p.34, 2020.

MA, S.Y.; RÖYTTÄ, M.; RINNE, J.O.; COLLAN, Y.; RINNE, U.K. Correlation between neuromorphometry in the substantia nigra and clinical features in Parkinson's disease using disector counts. **J Neurol Sci.**, v.151, n.1, p.83–7, 1997.

MACDONALD, R.; BARNES, K.; HASTINGS, C.; MORTIBOYS H. Mitochondrial abnormalities in Parkinson's disease and Alzheimer's disease: Can mitochondria be targeted therapeutically?. **Biochem. Soc. Trans.**, v.46, p.891–909, 2018.

MAGDY, A.; FARRAG, E.A.E.; HAMED, S.M.; ABDALLAH, Z.; EL NASHAR E.M.; ALGHAMDI, M.A.; ALI, A.A.H.; ABD EL-KADER M. Neuroprotective and therapeutic effects of calcitriol in rotenone-induced Parkinson's disease rat model. **Front Cell Neurosci.**, v.16, n.16, 967813, 2022.

MAGRI, A.; MESSINA, A. Interactions of VDAC with Proteins Involved in Neurodegenerative Aggregation: An Opportunity for Advancement on Therapeutic Molecules. **Current medicinal chemistry**, v.24, n.40, p.4470–4487, 2017.

MAITI, P.; MANNA, J.; DUNBAR, G.L. Current understanding of the molecular mechanisms in Parkinson's disease: targets for potential treatments. **Transl. Neurodegener.**, v.6, n.28, 2017.

MAMELAK, M. Parkinson's Disease, the Dopaminergic Neuron and Gammahydroxybutyrate. **Neurology and therapy**, v.7, n.1, p.5-11, 2018.

MANN, V.M.; COOPER, J.M.; KRIGE, D.; DANIEL, S.E.; SCHAPIRA, A.H.; MARSDEN, C.D. Brain, skeletal muscle and platelet homogenate mitochondrial function in Parkinson's disease. **Brain.** v.115, n. 2, p.333–342, 1992.

MARSH, L. Depression and Parkinson's disease: current knowledge. **Curr Neurol Neurosci Rep.**, v.13, n.12, p.409, 2013.

MCCOLLUM, E.F.; SIMMONDS, N.; BECKER, J.E.; SHIPLEY, P.G. Studies on experimental rickets: and experimental demonstration of the existence of a vitamin which promotes calcium deposition. **J Biol Chem.**, v.53, p.293–312, 1922.

MEDINA, J.M.; LÓPEZ-MEDIAVILLA, C.; ORFAO, A. Flow cytometry of isolated mitochondria during development and under some pathological conditions. **FEBS Lett.**, v. 510, p. 127-132, 2002.

MELLANBY, T. The part played by an “accessory factor” in the production of experimental rickets. **J Physiol.**, v.52, p.11–14, 1918.

MEREDITH, G. E; KANG, U. J. Behavioral models of Parkinson's disease in rodents: a new look at an old problem. **Mov Disord.**, v.21, n.10, p.1595-606, 2006.

MIZUNO, Y.; OHTA, S.; TANAKA, M.; TAKAMIYA, S.; SUZUKI, K.; SATO, T.; OYA, H.; OZAWA, T.; KAGAWA, Y. Deficiencies in complex I subunits of the respiratory chain in Parkinson’s disease. **Biochem Biophys Res Commun**, v.163, p.1450–1455, 1989.

MOZOŁOWSKI, W. “Jedrzej Sniadecki (1768–1838) on the cure of rickets.” v.143, n. 3612, 121–124, 1939.

NELSON, DAVID L. **Princípios de bioquímica de Lehninger** [recurso eletrônico] / David L. Nelson, Michael M. Cox, Aaron A. Hoskins ; tradução: Carla Dalmaz... [et al.] ; revisão técnica: Carla Dalmaz, Carlos Termignoni, Maria Luiza Saraiva Pereira. – 8. ed. – Porto Alegre : Artmed, 2022.

NEVEU, I.; NAVEILHAN, P.; BAUDET, C.; BRACHET, P.; METSIS, M. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 regulates NT-3, NT-4 but not BDNF mRNA in astrocytes. **Neuroreport**. v.6, p.124–6, 1994.

NEWMARK, H.L.; NEWMARK, J. Vitamin D and Parkinson’s disease--a hypothesis. **Mov Disord.**, v.22, p.461–468, 2007.

NICHOLLS, D.G.; BUDD, S.L. Mitochondria and neuronal survival. **Physiol Rev.**, v.80, n.1, p.315-60, 2000.

NOELKER, C.; MOREL, L.; OSTERLOH, A.; ALVARTEZ-FISCHER, D.; LESCOT, T.; BRELOER, M.; GOLD, M.; OERTEL, W.H.; HENZE, C.; MICHEL, P.P.; DODEL, R.C.; LU, L.; HIRSCH, E.C.; HUNOT, S.; HARTMANN, A. Heat shock protein 60: an endogenous inducer of dopaminergic cell death in Parkinson’s disease. **J Neuroinflammation**, v.11, p.86, 2014.

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

NORRIS, T.; **L. Porth - Fisiopatologia**. Guanabara Kaogan: Rio de Janeiro. Grupo GEN, 2021.



NUNES, C.; LARANJINHA, J. Nitric oxide and dopamine metabolism converge via mitochondrial dysfunction in the mechanisms of neurodegeneration in Parkinson's disease. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.704, 108877, 2021.

O'CONNOR, J.E.; VARGAS, J.L.; KIMLER, B.F.; HERNANDEZ-YAGO, J.; GRISOLIA, S. Use of rhodamine-123 to investigate alterations in mitochondrial activity in isolated mouse liver mitochondria. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 151, p. 568–573, 1998.

OBESO, J.; STAMELOU, M.; GOETZ, C.; POEWE, W.; LANG, A.; WEINTRAUB, D.; BURN, D.; HALLIDAY, G.M.; BEZARD, E.; PRZEDBORSKI, S. Past, present, and future of Parkinson's disease: a special essay on the 200th anniversary of the Shaking Palsy. **Mov Disord.**, v.32, n.9, p.1264–1310, 2017.

OJALA, D.; MONTOYA, J.; ATTARDI, G. tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria. **Nature**. v.290, p.470–474. 1981.

OKADA, S.F.; O'NEAL, W.K.; HUANG, P.; NICHOLAS, R.A.; OSTROWSKI, L.E.; CRAIGEN, W.J.; LAZAROWSKI, E.R.; BOUCHER, R.C. Voltage-dependent anion channel-1 (VDAC-1) contributes to ATP release and cell volume regulation in murine cells. **J Gen Physiol.**, v.124, p.513–526. 2004.

OLGUIN, H.J.; GUZMAN, D.C.; HERNANDEZ, E.G.; BARRAGAN, G.M. The Role of Dopamine and Its Dysfunction as a Consequence of Oxidative Stress. **Oxid Med Cell Longev**, v.2016, 9730467, 2016.

ONYANGO, I.G. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease. **Neurochem Res.**, v.33, p.589–597, 2008.

PARKER, W.D. JR.; BOYSON, S.J.; PARKS, J.K. Abnormalities of the electron transport chain in idiopathic Parkinson's disease. **Ann Neurol.**, v.26, p.719–723, 1989.

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

PERESE D.A.; ULMAN J.; VIOLA J.; EWING S.E.; BANKIEWICZ K.S. A 6-hydroxydopamine-induced selective parkinsonian rat model. **Brain Res.**, v.494, n.2, p.285–293, 1989.

PERTILE, R.A.; CUI, X.; EYLES, D.W. Vitamin D signaling and the differentiation of developing dopamine systems. **Neuroscience**.v.333, p.193–203, 2016.

PETERSON, A.L. A review of vitamin D and Parkinson's disease. **Maturitas**. v.2014, n.78, p.40–44, 1997.

PINTO, WAGNER DE JESUS. **Bioquímica clínica** / Wagner de Jesus Pinto. – 1. ed. – Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 2017.

POEWE, W. Non-motor symptoms in Parkinson's disease. **Eur J Neurol.**, v.151, p.S14–20, 2008.

POIRIER, J.; BARBEAU, A; 1-Methyl-4-phenyl-pyridinium-induced inhibition of nicotinamide adenosine dinucleotide cytochrome c reductase. **Neurosci Lett**, v.62, n.1, p.7–11, 1985.

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

PRAS, A.; NOLLEN, E.A.A. Regulation of Age-Related Protein Toxicity. **Front. Cell Dev. Biol.**, v.9, 637084, 2021.

PRASAD, E.M.; HUNG, S.Y. Behavioral Tests in Neurotoxin-Induced Animal Models of Parkinson's Disease. **Antioxidants (Basel)**, v.9, n.10, 1007, 2020.

PUSPITA, L.; CHUNG, S.Y.; SHIM, J.W. **Oxidative stress and cellular pathologies in Parkinson's disease.** **Mol. Brain**, v.10, n.1, p. 53, 2017.

RAHMAN, M. M.; FERDOUS K. S.; AHMED M. Emerging promise of nanoparticle-based treatment for Parkinson's disease. **Biointerface Res. Appl. Chem.**, v.10, p.7135–7151, 2020.

RANGO, M., IBRESOLIN, N. Brain mitochondria, aging, and Parkinson's disease. **Genes**. v.9, n.5, p.250, 2018.

RAO, V.K.; CARLSON, E.A.; YAN, S.S. Mitochondrial permeability transition pore is a potential drug target for neurodegeneration. **Biochim Biophys Acta.**, v.1842b, n.8, 2014.

RASOLA A, BERNARDI P. Mitochondrial permeability transition in Ca<sup>(2+)</sup>-dependent apoptosis and necrosis. **Cell Calcium**. v.50, p.222–233, 2011.

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

RCOM-H'CHEO-GAUTHIER, A.N.; MEEDENIYA, A.C.B.; POUNTNEY, D.L. Calcipotriol inhibits  $\alpha$ -synuclein aggregation in SH-SY5Y neuroblastoma cells by a Calbindin-D28k-dependent mechanism. **J. Neurochem.**, v.141, p.263–274, 2017.

REDDY, P.H. Is the mitochondrial outermembrane protein VDAC1 therapeutic target for Alzheimer's disease?, **Biochimica et biophysica acta.**, v.1832, n.1, p.67–75, 2013.

REISNER, HOWARD M. **Patologia: uma abordagem por estudos de casos.** Porto alegre: Grupo A, 2016.

RIMMELZWAAN, L. M.; VAN SCHOOR, N. M.; LIPS, P.; BERENDSE, H. W.; EEKHOFF, E. M. Systematic review of the relationship between vitamin D and Parkinson's disease. **J Parkinsons Dis.**, v.6, p.29–37, 2016.

RISIGLIONE, P.; FEDERICA ZINGHIRINO, DI ROSA, M.C.; MAGRÌ, A.; MESSINA, A. Alpha- synuclein and mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease: the emerging role of VDAC. **Biomolecules.** v.11, n.5, p.718, 2021.

ROSTOVTSEVA, T.K.; TAN, W.; COLOMBINI, M. On the role of VDAC in apoptosis: fact and fiction. **J Bioenerg Biomembr.**, v.37, p,129–142, 2005.

RUDOW, G.; O'BRIEN, R.; SAVONENKO, A. V.; RESNICK, S. M.; ZONDERMAN, A. B.; PLETNIKOVA, O.; MARSH, L.; DAWSON, T. M.; CRAIN, B. J.; WEST, M. J.; TRONCOSO, J. C. Morphometry of the human substantia nigra in ageing and Parkinson's disease. **Acta Neuropathol**, v.115, n.4, p.461, 2008.

SAJI PAREL, N.; KRISHNA, P. V.; GUPTA, A.; UTHAYASEELAN, K.; UTHAYASEELAN, K.; KADARI, M.; SUBHAN, M.; KASIRE, S. P. Depression and Vitamin D: A Peculiar Relationship. **Cureus.**, v.14, n.4, e24363, 2022.

SARIS; N.E.L.; TEPLOVA, V.V.; ODINOKOVA, I.V.; AZARASHVILY, T.S. Interference of calmidazolium with measurement of mitochondrial membrane potential using the tetraphenylphosphonium electrode or the fluorescent probe rhodamine 123. **Anal. Biochem.**, v. 328, p. 109-112, 2004.

SAITO, Y. DJ-1 as a biomarker of Parkinson's disease, *Adv. Exp. Med. Biol.* v.1037, p. 149–171, 2017.

SATO, Y.; KIKUYAMA, M.; OIZUMI, K. High prevalence of vitamin D deficiency and reduced bone mass in Parkinson's disease. **Neurology.** v.49, p.1273–8, 1997.

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

SHARMA S.; AWASTHI A.; SINGH S. J. N. Altered gut microbiota and intestinal permeability in Parkinson's disease: Pathological highlight to management. **Neurosci. Lett.**, v.712, 134516, 2019.

SHEN, L.; JI, H.F. Associations between vitamin D status, supplementation, outdoor work and risk of Parkinson's disease: a meta-analysis assessment. **Nutrients.** v.7, p.4817–27, 2015.

SHENG, Z.-H. The Interplay of Axonal Energy Homeostasis and Mitochondrial Trafficking and Anchoring. **Trends in cell biology**, v.27, n.6, p.403-416, 2017.

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.**, v.62, n.3, p.374–382, 2000.

SHOSHAN-BARMATZ, V.; MALDONADO, E.N.; KRELIN, Y. VDAC1 at the crossroads of cell metabolism, apoptosis, and cell stress. **Cell Stress.**, v.1, (1), 11–36. 2017.

SHOSHAN-BARMATZ, V.; PINTO, V.D.; ZWECKSTETTER, M.; RAVIV, Z.; KEINAN, N.; ARBEL, N.; VDAC, a multi-functional mitochondrial protein regulating cell life and death. **Mol. Aspect. Med.**, v.31, n.3, p.227–285, 2010.

SHRESTHA, S.; LUTSEY, P. L.; ALONSO, A.; HUANG, X.; MOSLEY, T. H.; JR, CHEN, H. Serum 25-hydroxyvitamin D concentrations in mid- adulthood and Parkinson's disease risk. **Mov Disord.** v.31, p.972–8, 2016.

SILVA, I.C.J.; LAZARETTI-CASTRO, M. Vitamin D metabolism and extraskelatal outcomes: an update. **Arch Endocrinol Metab.**, v.66, n.5, p.748-755, 2022.

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.

SOLENSKI, N. J.; KOSTECKI, V. K.; DOVEY, S.; PERIASAMY, A. Nitric-oxide-induced depolarization of neuronal mitochondria: implications for neuronal cell death, **Molecular and Cellular Neuroscience.** v. 24, n.4, p. 1151-1169, 2003.  
**Spring Harb Perspect Med.** v.2, n.8, 2012.

SURMEIER, D.J.; OBESO, J.A.; HALLIDAY, G.M. Selective neuronal vulnerability in Parkinson disease. **Nat. Rev. Neurosci.**, v.18, n.2, p.101–113, 2017.

SWERDLOW, R.H.; PARKS, J.K.; MILLER, S.W.; TUTTLE, J.B.; TRIMMER, P.A.; SHEEHAN, J.P.; BENNETT, J.P. JR.; DAVIS, R.E.; PARKER, W.D. JR.; Origin and functional consequences of the complex I defect in Parkinson's disease. **Ann Neurol**, v.40, p.663–671, 1996.

TABREZ, S.; JABIR, N.R.; SHAKIL. S.; GREIG, N.H.; ALAM, Q.; ABUZENADAH, A.M.; DAMANHOURI, G.A.; KAMAL, M.A. A synopsis on the role of tyrosine hydroxylase in Parkinson's disease. **CNS Neurol Disord Drug Targets**, v.11, p.395–409, 2012.

TAHARA, E.B.; NAVARETE, F.D.T. KOWALTOWSKI, A.J. Tissue-, substrate-, and site- specific characteristics of mitochondrial reactive oxygen species generation. **Free Radic. Biol. Med.**, v.46, n.9, p.1283–1297, 2009.

TANGPRICHA, V. Prevalence of vitamin D insufficiency in patients with Parkinson disease and Alzheimer disease. **Arch Neurol.**, v.65, p.1348–52. 2008.

UNGERSTEDT, U. 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. **Eur J Pharmacol.**, v.5, p.107–10, 1968.

UNGERSTEDT, U. Striatal dopamine release after amphetamine or nerve degeneration revealed by rotational behavior. **Acta Physiol Stand.**, v.367, p.49-68, 1971.

UNGERSTEDT, U.; ARBUTHNOTT, G. W. Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-hydroxy-dopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system. **Brain Res.** v.18,p.485-493, 1970.

VARUGHESE, J.T.; BUCHANAN, S.K.; PITT, A.S. The role of voltage-dependent anion Channel in mitochondrial dysfunction and human disease. **Cells.**, v.10, n.7, 1737. 2021.

VERMES, I.; HAANEN, C.; REUTELINGSPERGER, C. Flow cytometry of apoptotic cell death. **J. Immunol. Methods**, v. 243, p. 167-190, 2000.

VIANELLO, A.; CASOLO, V.; PETRUSSA, E.; PERESSON, C.; PATUI, S.; BERTOLINI, A.; PASSAMONTI, S.; BRAIDOT, E.; ZANCANI, M. The mitochondrial permeability transition pore (PTP)—an example of multiple molecular exaptation?, **Biochim Biophys Acta**, v.1817, n.11, p.2072–2086, 2012.

VOLPICELLI-DALEY, L. A.; LUK, K. C.; PATEL, T. P.; TANIK, S. A.; RIDDLE, WAKABAYASHI, K.; TAKAHASHI, H.; TAKEDA, S.; OHAMA, E.; IKUTA, F. Lewy bodies in the enteric nervous system in Parkinson's disease, **Arch. Histol. Cytol.**, v.52, p.191–194, 1989.

WANG, J.; YANG, D.; YU, Y.; SHAO, G.; WANG, Q. Vitamin D and sunlight exposure in newly-diagnosed Parkinson's disease. **Nutrients.** v.8, n.3, p.142, 2016.

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.**, v.904, n.1, p.67–75, 2001.

WION, D.; MACGROGAN, D.; NEVEU, I.; JEHAN, F.; HOULGATTE, R.; BRACHET P. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 is a potent inducer of nerve growth factor synthesis. **J Neurosci Res.** v.28, n.1, p.110–4, 1991.

YAO, P.J.; EREN, E.; GOETZL, E.J.; KAPOGIANNIS, D. Mitochondrial electron transport chain protein abnormalities detected in plasma extracellular vesicles in Alzheimer's disease. **Biomedicines**, v.9, n.11, 1587, 2021.

ZHAO, Y.; SUN, Y.; JI H.F.; SHEN, L. Vitamin D levels in Alzheimer's and Parkinson's diseases: a meta-analysis. **Nutrition.** v.29, p.828–32, 2013.

ZORATTI, M.; SZABÒ, I. The mitochondrial permeability transition. **Biochim Biophys Acta.** v.1241, n.2, p.139-76. 1995.

ZOROV, D. B.; JUHASZOVA, M.; SOLLITT, S. J. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiological Reviews*. v. 94, n.3, p.909–950, 2014.

**ANEXO**

## Anexo 1: Certificado Comissão de Ética no Uso de Animais



UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO CEARÁ

Comissão de Ética no  
Uso de Animais

### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "AVALIAÇÃO DA SUPLEMENTAÇÃO DE VITAMINA D EM MODELO DE PARKINSONISMO INDUZIDO POR 6-OHDA: FOCO NA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E NA FUNÇÃO MITOCONDRIAL", protocolada sob o CEUA nº 3397010219 (ID 001371), sob a responsabilidade de **Glauce Socorro de Barro Viana e equipe; LUDMILA ARAÚJO RODRIGUES LIMA** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará (CEUA-UFC) na reunião de 29/10/2019.

We certify that the proposal "EVALUATION OF VITAMIN D SUPPLEMENTATION IN 6-OHDA INDUCED PARKINSONISM MODEL: FOCUS ON ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY AND MITOCHONDRIAL FUNCTION", utilizing 384 Heterogenics rats (384 males), protocol number CEUA 3397010219 (ID 001371), under the responsibility of **Glauce Socorro de Barro Viana and team; LUDMILA ARAÚJO RODRIGUES LIMA** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Ceará (CEUA-UFC) in the meeting of 10/29/2019.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de [11/2019](#) a [09/2023](#) Área: [Departamento de Morfologia](#)

Origem: [Biotério Central da UFC](#)

Espécie: [Ratos heterogênicos](#)

sexo: [Machos](#)

idade: [2 a 6 meses](#)

N: [384](#)

Linhagem: [Wistar](#)

Peso: [250 a 300 g](#)

Local do experimento: Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos - Laboratório de Neuropsicofarmacologia

Fortaleza, 29 de outubro de 2019

Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá  
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal do Ceará

Profa. Dra. Camila Ferreira Roncari  
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal do Ceará