

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
FACULDADE DE BIOMEDICINA

AMANDA SOUSA RESENDE

BLOQUEIO DE ATIVAÇÃO MICROGLIAL POR MINOCICLINA: INVESTIGAÇÃO DE
ESTRATÉGIA NEUROPROTETORA NA NEURODEGENERAÇÃO INDUZIDA POR
ROTENONA

BELÉM
2009

AMANDA SOUSA RESENDE

BLOQUEIO DE ATIVAÇÃO MICROGLIAL POR MINOCICLINA: INVESTIGAÇÃO DE
ESTRATÉGIA NEUROPROTETORA NA NEURODEGENERAÇÃO INDUZIDA POR
ROTENONA

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Faculdade de
Biomedicina da Universidade Federal
do Pará, como requisito parcial para
a obtenção do grau de Bacharel em
Biomedicina

Orientador: Prof^o Dr. Edmar Tavares da Costa

BELÉM

2009

AMANDA SOUSA RESENDE

BLOQUEIO DE ATIVAÇÃO MICROGLIAL POR MINOCICLINA: INVESTIGAÇÃO DE
ESTRATÉGIA NEUROPROTETORA NA NEURODEGENERAÇÃO INDUZIDA POR
ROTENONA

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Faculdade de
Biomedicina da Universidade Federal
do Pará, como requisito parcial para
a obtenção do grau de Bacharel em
Biomedicina

Local e data da defesa: Belém (PA), 14 de dezembro de 2009.

Banca Examinadora:

Prof^o Dr. Edmar Tavares da Costa
ICB – UFPA
(orientador)

Prof^o Dr. Wallace Gomes Leal
ICB – UFPA

Prof^o Msc. Rafael Rodrigues Lima
ICB – UFPA

*“É melhor tentar e falhar,
Que preocupar-se e ver a vida passar;
É melhor tentar, ainda que em vão,
Que sentar-se fazendo nada até o final.
Eu prefiro na chuva caminhar,
Que em dias tristes em casa me esconder.
Prefiro ser feliz, embora louco,
Que em conformidade viver ...”*
Martin Luther King

AGRADECIMENTOS

A Deus, por autorizar a realização deste acontecimento.

Aos meus pais, Augusto José Resende e Maria Aparecida Sousa Resende, **em especial**, que não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida, através de incentivo e companheirismo incondicional.

Aos meus irmãos, Alex Sousa Resende e Alexandra Sousa Resende, pelo apoio fraternal que motivou a superação dos momentos difíceis pelos quais passei.

Ao meu orientador Edmar Tavares da Costa, por seu apoio e contribuição no amadurecimento dos meus conhecimentos e embasamento teórico, que me levaram a execução e conclusão deste trabalho.

À amiga Wanessa Pragana de Oliveira, por ter assumido o papel de amiga, mãe, irmã, companheira, confidente e conselheira nos momentos mais difíceis em que precisei da ajuda de alguém com esse perfil, manifesto meu agradecimento e estima.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Neuropatologia Experimental, Ana Alice Batista, Arnaldo Jorge Martins Filho, Bianca Paracampas, Dielly Catrina, Geovanny Lima e Nilton Santos, pelos bons momentos que passamos juntos durante a execução dos experimentos do meu trabalho.

Às colegas de graduação Carla Pinto, Gleiciany Pinheiro e Keliane Trindade, pelos bons momentos que passamos juntas ao longo de nossa formação acadêmica.

SUMÁRIO

	LISTA DE FIGURAS	i
	RESUMO	ii
1	INTRODUÇÃO	1
1.1	A DOENÇA DE PARKINSON	1
1.1.1	Etiologia e o papel de neurotoxinas	2
1.1.2	Patogênese e a degeneração dopaminérgica nigroestriatal	4
1.2	OS MECANISMOS DE NEURODEGENERAÇÃO DOPAMINÉRGICA	5
1.3	PROCESSOS INFLAMATÓRIOS NA DP	7
1.4	OS POTENCIAIS EFEITOS NEUROPROTETORES DA MINOCICLINA	9
1.5	OBJETIVOS	11
1.5.1	OBJETIVO GERAL	11
1.5.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
2	METODOLOGIA	12
2.1	ANIMAIS UTILIZADOS	12
2.2	CULTURAS PRIMÁRIAS DE NEURÔNIOS	12
2.3	CULTURAS PRIMÁRIAS DE MICROGLIA	13
2.4	ADIÇÃO DE CÉLULAS MICROGLIAIS A CULTURAS SEMIPURAS DE NEURÔNIOS	14
2.5	INTOXICAÇÃO COM ROTENONA	14
2.6	ADMINISTRAÇÃO DE MINOCICLINA	14
2.7	ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR	14
2.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	14
3	RESULTADOS.....	16
3.1	CARACTERIZAÇÃO DOS EFEITOS DA EXPOSIÇÃO À ROTENONA SOBRE A VIABILIDADE CELULAR.....	16
3.2	EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE MINOCICLINA SOBRE A VIABILIDADE CELULAR DE CULTURAS MISTAS EXPOSTAS A ROTENONA.....	19
3.3	EFEITOS DA ADMINSTRAÇÃO DE MINOCICLINA EM CULTURAS SEMIPURAS EXPOSTAS A ROTENONA APÓS ADIÇÃO DE MICROGLIA.....	21
4	DISCUSSÃO.....	23
5	CONCLUSÕES.....	27
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	28

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura molecular da minociclina.....	10
Figura 2	Efeitos da administração de diferentes concentrações de rotenona em diferentes tempos de exposição sobre a viabilidade celular de culturas semipuras de neurônios.....	17
Figura 3	Efeitos da administração de diferentes concentrações e tempo de exposição a rotenona sobre a viabilidade celular de culturas mistas.	18
Figura 4	Efeitos da administração de diferentes concentrações de minociclina sobre a viabilidade celular de culturas mistas.	20
Figura 5	Efeitos do pré-tratamento com minociclina sobre a toxicidade induzida por rotenona em culturas mistas.	20
Figura 6	Efeitos da administração de minociclina sobre a viabilidade celular de culturas semipuras de neurônio após a adição de microglia e exposição a rotenona.	22

RESUMO

Neste trabalho, utilizamos um sistema de culturas primárias de mesencéfalo ventral de ratos neonatos a fim de investigar os efeitos da administração de minociclina, um inibidor de ativação microglial, sobre a neurotoxicidade induzida por rotenona (ROT). A administração de rotenona produziu perda celular dependente de dose, tempo de exposição e também da composição de nossas culturas. Assim, a exposição à diferentes concentrações de rotenona (10, 20, 40 e 30 nM) por 1, 3, 5 e 7 dias promoveu perda celular significativa, como demonstrado pelo ensaio colorimétrico do MTT. Culturas mistas, que apresentam maior percentual de células da glia em relação a neurônios, apresentaram-se mais suscetíveis aos efeitos neurotóxicos da rotenona. Nestes experimentos, a adição concomitante de minociclina reverteu significativamente os efeitos deletérios da exposição à rotenona. A adição de microglia ($1,84 \times 10^4$ células/poço) a culturas semipuras de neurônios expostas à rotenona resultou em aumento significativo da perda celular. Ao mesmo tempo, o bloqueio microglial por administração de minociclina a culturas semipuras com adição de microglia e expostas a rotenona promoveu redução da perda celular, confirmando a influência negativa da microglia em eventos de lesão neuronal induzida por neurotoxinas indutoras de Parkinsonismo, ao mesmo tempo referendando a continuidade de pesquisas que visem elucidar o papel da neuroinflamação em desordens neurodegenerativas, tais como na doença de Parkinson.

1 INTRODUÇÃO

1.1 A DOENÇA DE PARKINSON

Estudos relacionados à longevidade vêm adquirindo relevância de forma cada vez mais evidente nos últimos anos, acompanhados por avanços da medicina, a aquisição de novos hábitos alimentares e a descoberta de novas estratégias terapêuticas e medidas profiláticas, que resultaram em maior preocupação com a qualidade de vida durante o envelhecimento e o aumento na perspectiva de vida da população mundial. Dessa forma, os limites do organismo humano começaram a ser postos à prova, e doenças que não eram comuns, por estarem associadas com os processos normais de envelhecimento, tornaram-se mais freqüentes.

Como exemplo de tais doenças, pode-se citar as doenças neurodegenerativas, que são doenças insidiosas de curso inexorável e gradualmente progressivo. Considerando que a idade traz com ela algumas condições que farão o corpo perder algumas das suas capacidades, é importante ressaltar a importância do envelhecimento como um fator de risco para o aparecimento das mesmas.

A doença de Parkinson (DP) é uma doença crônico-degenerativa do sistema nervoso central que acomete principalmente regiões envolvidas com o controle motor. Trata-se de uma doença progressiva cujos sintomas surgem geralmente por volta dos 55 anos de vida, e sua incidência aumenta evidentemente com a idade. James Parkinson foi quem primeiro descreveu essa enfermidade neurológica – hoje conhecida como doença de Parkinson - no ano de 1817, cujas descrições constavam em sua famosa monografia intitulada "*An assay on the shaking palsy*". Ele descreveu a doença como uma desordem consistindo de tremor em repouso e uma forma peculiar de incapacidade motora progressiva, que ficou conhecida como DP idiopática, mas a etiologia dessa doença continua desconhecida 192 anos depois.

Atualmente, a DP é conhecida como a segunda mais comum desordem neurodegenerativa depois da Doença de Alzheimer com uma prevalência de 0.1% da população mundial. Embora seja uma doença relacionada com a idade que afeta cerca de 3% das pessoas com idade maior que 65 anos e 4-5% de pessoas com idade maior que 85 anos, 5-10% dos pacientes têm 40 anos de idade. Estudos epidemiológicos e patológicos demonstram que os casos esporádicos com início

tardio ocorrem em 95% dos pacientes (Tanner, 2003), ao passo que os 5% restantes são observados em grupos familiares com início precoce (Mizuno *et al.*, 2001).

É uma síndrome caracterizada por rigidez muscular, tremor em repouso, bradicinesia e instabilidade postural, sintomas eventualmente decorrentes da degeneração de terminais nervosos no estriado e corpos celulares de neurônios dopaminérgicos da substância negra (Jellinger, 2001). Essas deficiências motoras são usualmente responsivas a um medicamento muito utilizado na DP, o levodopa (L-dopa), e resultam em melhoras nesses sintomas clínicos.

O tremor em repouso é o primeiro sinal em 70% dos pacientes da DP, ocorre com uma frequência de 3-5 Hz, é geralmente assimétrico e diminui com o movimento voluntário. Dessa forma, não torna mais difíceis as atividades cotidianas do paciente, pelo menos nas etapas iniciais de desenvolvimento do quadro clínico. O tremor das mãos é mais comum que o tremor dos pés.

A rigidez refere-se ao aumento da resistência a movimentos passivos e é acentuada pela atividade motora contralateral ou tarefas de desempenho mental. A bradicinesia corresponde à lentidão durante a execução de movimentos e o primeiro sintoma a desabilitar o paciente no início da doença.

A instabilidade postural, por vezes, é considerada como característica cardinal, mas não é específica e geralmente está ausente no início da doença. Esse sintoma está relacionado com o desenvolvimento gradual de equilíbrio deficiente, tornando maiores as chances de o paciente cair.

Outros sinais motores também podem ser observados em alguns pacientes, tais como: hipocinesia (redução na amplitude de movimentos), acinesia (ausência de movimentos inconscientes), hiponímia (diminuição da expressão facial normal) e hipofonia (diminuição do volume da voz) (Dauer & Przedborski, 2003; Samii *et al.*, 2004). Os sintomas não-motores incluem demência, depressão, características psicóticas, disfunção autonômica (manifestada por constipação, urgência e aumento na frequência do ato de urinar e hipotensão ortostática) e anormalidades na percepção visual e olfatória (Gelb *et al.*, 1999).

1.1.1 Etiologia e o papel de toxinas ambientais

A etiologia da DP tem sido exaustivamente apontada como sendo multifatorial devido a sua natureza esporádica. Diversos fatores podem contribuir com o aumento do risco de desenvolvimento da doença, dos quais podem ser

citados o envelhecimento natural, a susceptibilidade genética e a exposição a fatores ambientais.

A hipótese de que toxinas ambientais seriam os principais fatores foi dominante durante muitos anos do século XX, principalmente devido à descoberta do parkinsonismo induzido por MPTP (metil-fenil-diidropiridina) (Langston *et al.*, 1983). Diferentes estudos demonstraram que o MPTP é uma droga que provoca morte seletiva de neurônios dopaminérgicos. Seu mecanismo de ação inclui diversos eventos e inicia-se pela sua passagem pela barreira hematoencefálica, de onde o MPTP é oxidado a MPP^+ no Sistema Nervoso Central (SNC) pela enzima monoamina oxidase B (MAOB) e depois é seletivamente captado por neurônios dopaminérgicos através de transportadores de dopamina - DAT (Zhang *et al.*, 2000). Uma vez no interior de neurônios dopaminérgico, o MPP^+ é ativamente transportado para mitocôndria onde inibe seletivamente o complexo I da cadeia respiratória mitocondrial, resultando na formação de superóxidos altamente tóxicos (Zhang *et al.*, 2000).

Estudos posteriores apresentaram outras toxinas capazes de produzir neurodegeneração progressiva e passaram a ser utilizadas como modelos para o estudo da DP, a qual pode ser produzida pela exposição crônica a neurotoxinas dopaminérgicas, que desencadeiam uma cascata de eventos deletérios. Tais toxinas incluem os pesticidas, que, assim como a exposição ocupacional a metais pesados, constituem um risco ambiental adicional para a DP.

A rotenona é um pesticida de uso doméstico em muitos países e um princípio ativo extraído de raízes de certas espécies de plantas encontradas na região amazônica, como o timbó, utilizado pelos nativos para envenenar os peixes durante a pesca. É um composto lipofílico que atravessa facilmente a barreira hematoencefálica e atua como inibidor do complexo I da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial. A administração sistêmica desta toxina pode resultar na degeneração seletiva de células da via dopaminérgica nigroestriatal, com a acumulação de inclusões citoplasmáticas fibrilares positivas para sinucleína e ubiquitina (Bertabet *et al.*, 2000).

Um estudo realizado por Sherer e colaboradores (2003a) identificou intensa ativação microglial no estriado e na substância negra de animais intoxicados com rotenona, com menor ativação no córtex, e anterior à perda neuronal dopaminérgica, acontecendo de forma mais evidente nos animais que apresentaram

a lesão visível ao microscópio óptico indicando uma possível participação da resposta inflamatória na degeneração desta população neuronal. Em outro estudo semelhante, realizado por Gao e colaboradores (2002a), culturas mistas de neurônio/glia derivadas de mesencéfalo ventral foram mais susceptíveis aos efeitos neurotóxicos da rotenona que culturas enriquecidas de neurônios. O aumento acentuado da capacidade neurodegenerativa da rotenona foi atribuído à presença da glia, especialmente devido à adição de células microgлияis a culturas enriquecidas de neurônios. O autor sustenta que a rotenona estimula a liberação de radicais superóxidos pela microglia uma vez que a utilização de um inibidor da NADPH oxidase microglial foi capaz de reduzir a perda celular induzida pela toxina.

1.1.2 Patogênese e a degeneração dopaminérgica nigroestriatal

O achado patológico característico da DP é a perda de neurônios dopaminérgicos na parte compacta da substância negra (SNpc) e a presença de corpos de Lewy nos neurônios remanescentes. Fisiologicamente, os neurônios dopaminérgicos podem ser encontrados em todo o encéfalo, onde exercem uma variedade de funções com base em sua ampla conectividade através de diferentes vias. Existem três grupos de células dopaminérgicas no encéfalo, são os grupos A8, A9 e A10, distribuídos, respectivamente, na formação reticular lateral, SNpc e área tegumentar ventral (VTA). Os neurônios do grupo A9 enviam suas projeções aos núcleos caudado e putâmen e influenciam vias motoras relacionadas aos gânglios basais (Pollack, 2001). A princípio, a perda celular dopaminérgica ocorre seletivamente com os neurônios do grupo A9, afetando a SNpc mas poupando a parte reticulada e as células do grupo A8 e A10 (Halliday *et al.*, 1996; Mc Ritchie *et al.*, 1997). Dentro da própria SNpc, a perda celular segue um padrão específico, afetando preferencialmente as células da porção ventral (Damier *et al.*, 1999; Fearnley & Lees, 1991).

Corpos de Lewy são inclusões intracitoplasmáticas constituídas de estruturas semelhantes à neurofilamentos, além de agregados protéicos positivos para ubiquitina e alfa-sinucleína. A ubiquitina é uma proteína que participa do sistema proteossômico de degradação de proteínas defeituosas. No encéfalo normal, a alfa-sinucleína está presente nos terminais pré-sinápticos e sua função ainda permanece desconhecida. O mecanismo exato que explica a interação entre essas proteínas e os neurofilamentos e que resultam na formação de corpos de

Lewy ainda não foi elucidado.

Os sinais clínicos da DP geralmente surgem quando são perdidas aproximadamente 50% de células dopaminérgicas no sistema nervoso e quando, conseqüentemente, cerca de 80% dos níveis de dopamina estriatal são depletados. A perda destas células também afeta outros sistemas de neurotransmissão, tanto a nível central como periférico. PerifERICAMENTE, há uma diminuição na atividade da tirosina hidroxilase – enzima passo-limitante na produção de dopamina – e diminuição de dopamina na medula adrenal, um achado possivelmente relacionado com a disfunção autonômica. Em nível central, alterações dos níveis de neurotransmissores têm sido detectadas no núcleo basal de Meynert, locus coeruleus e núcleo da rafe (Dauer & Przedborski, 2003 *apud* Hornnykiewicz & Kisch, 1987), assim como alterações nas vias glutamatérgicas e GABAérgicas (Ikonomidou & Turski, 1996).

Estudos patológicos relacionados à neurodegeneração na DP sugerem um conjunto de achados característicos que permitem distinguir a doença dos eventos observados no envelhecimento natural. Um deles é o fato da perda celular estar concentrada nas porções caudal e ventrolateral da SNpc, enquanto que no envelhecimento normal a porção dorsomedial da substância negra (SN) é a região mais afetada. Os outros achados são o grau de perda de terminais neuronais no estriado, que é maior do que a perda de neurônios na SN, e o mecanismo de remoção da dopamina, que parece ser mais dependente de seu transportador no estriado do que no córtex pré-frontal, onde outros transportadores monoaminérgicos e a enzima catecol-O-metiltransferase (COMT) desempenham um papel maior no término das ações da dopamina (Dauer & Przedborski, 2003).

Os achados patológicos relacionados com os aspectos bioquímicos incluem disfunção mitocondrial do complexo I, acentuada peroxidação lipídica, redução dos níveis de glutatona, aumento da concentração de íons e redução de ferritina, os quais sugerem que os neurônios dopaminérgicos estão amplamente sujeitos ao estresse oxidativo (Munch *et al.*, 1998). Além disso, um estudo recente demonstrou que alguns pacientes podem apresentar função alterada do sistema proteossomal, que é apontado pelo autor como um dos fatores envolvidos na patogênese da DP (McNaught *et al.*, 2003).

1.2 OS MECANISMOS DE NEURODEGENERAÇÃO DOPAMINÉRGICA

O mecanismo que leva a degeneração de neurônios dopaminérgicos na DP ainda permanece desconhecido. Dados da literatura sugerem que a neurodegeneração pode estar associada a diversos mecanismos e incluem, entre outros, excitotoxicidade, estresse oxidativo e disfunção mitocondrial, apoptose, inflamação e expressão de proteínas defeituosas, com a conseqüente formação de agregados protéicos intracelulares (Dauer & Przedborski, 2003). A presença desses agregados traz conseqüências que vão desde a interferência no tráfico intracelular de neurônios ao seqüestro de proteínas que são importantes para a sobrevivência dessas células.

O papel da disfunção mitocondrial e do estresse oxidativo na patogênese da DP foi ressaltado com a descoberta de que o MPTP bloqueia a cadeia transportadora de elétrons mitocondrial através da inibição do complexo I (Nicklas *et al.*, 1987). Anormalidades na atividade do complexo I em pacientes da DP foram identificadas em estudos mais recentes, como apresentado em uma revisão por Greenamyre e colaboradores (2001). A partir de evidências observadas em experimentos *in vitro*, os danos ao complexo I tornam a célula mais susceptível ao estresse oxidativo e a deficiência energética. Moléculas altamente oxidantes, como o peróxido de hidrogênio e o radical superóxido, e que resultam da respiração mitocondrial normal, contribuem com danos a células ao terem seus níveis normais aumentados pela inibição do complexo I mitocondrial.

Os neurônios dopaminérgicos podem estar em um microambiente particularmente fértil para a geração de espécies reativas de oxigênio: o próprio metabolismo da dopamina produz peróxido de hidrogênio e radicais superóxidos. Além disso, a própria auto-oxidação da dopamina, necessária para a produção de melanina, também gera subprodutos tóxicos a célula, tais como a dopamina-quinona, uma molécula que danifica proteínas através da reação com resíduos de cisteína (Dauer & Przedborski, 2003).

Outro mecanismo, não menos relevante, e que ainda desperta grande interesse científico é a intensa reação glial que ocorre concomitantemente à degeneração de neurônios dopaminérgicos, sugerindo que a inflamação pode ser um fenômeno ativo na DP, promovendo continuamente morte celular nesse processo neurodegenerativo (Kim *et al.*, 2000). A resposta inflamatória é a primeira linha de defesa contra lesões e infecção no sistema nervoso central (SNC); entretanto, uma resposta inflamatória excessiva pode também ser uma fonte

adicional de danos às células do hospedeiro.

1.3 PROCESSOS INFLAMATÓRIOS NA DP

A primeira evidência do papel da inflamação em pacientes da DP veio de um estudo *post-mortem*, no qual McGeer e colaboradores (1998) encontraram microglia ativada e linfócitos T na SNpc de um paciente da DP. Desde então, existem inúmeros estudos nos quais é reportado o papel de processos neuroinflamatórios na DP (McGeer & McGeer, 2004; Orr *et al.*, 2002; Tansey *et al.*, 2007). Os processos inflamatórios no encéfalo envolvem primariamente dois tipos de células gliais: microglia e astrócitos. Além da presença de microglia ativada e de citocinas pró-inflamatórias, enzimas associadas com a inflamação, como a óxido nítrico sintase (NOS) e ciclooxigenase-2 (COX-2), também têm sido encontradas nesses estudos *post-mortem*.

Uma das reações celulares a danos ao sistema nervoso mais discutida na literatura é a proliferação e hipertrofia de astrócitos (Norton *et al.*, 1992), células responsáveis pelo controle homeostático do ambiente extracelular neuronal que respondem a uma grande variedade de insultos, incluindo danos físicos, químicos e doenças. Como é de se esperar, existe uma considerável reação glial na SNpc de pacientes com DP (Vila *et al.*, 2001) que pode ser benéfica ou deletéria aos neurônios dopaminérgicos. As células da glia, particularmente os astrócitos, protegem os neurônios através da produção de fatores neurotróficos ou pela neutralização do estresse oxidativo (Hirsh, 2000; Villa *et al.*, 2001). No entanto, esse tipo de gliosis na DP é incomum e a reação astrocítica é praticamente ausente (Banati *et al.*, 1998; Mirza *et al.*, 2000).

Ao contrário de astrócitos, a microglia é o tipo de célula glial mais ativada na SNpc (Banati *et al.*, 1998; Mirza *et al.*, 2000; Villa *et al.*, 2001). Essa reação incomum pode estar relacionada com o baixo número de astrócitos normalmente encontrado nas regiões de distribuição dos neurônios dopaminérgicos mais susceptíveis (Damier *et al.*, 1993).

As células microgliais são macrófagos residentes no SNC (del Rio-Hortega, 1993) que povoam densamente a substância negra (Lawson *et al.*, 1990). Durante o período embrionário e início da fase pós-natal a microglia está envolvida com a eliminação programada de células neurais (Barron, 1995). No encéfalo desenvolvido, a microglia em repouso exibe uma morfologia ramificada e exerce

funções relacionadas à homeostase celular com a remoção de restos celulares e reparo tecidual e através da secreção de fatores de crescimento. Além destas funções primárias, estas células estão envolvidas na indução de inflamação e citotoxicidade, e também na regulação da resposta de células T através da apresentação de antígenos.

A microglia em repouso, ao contrário do que esse nome sugere, não está estática ou em estado dormente. Ao contrário, estão constantemente dispostas a se deslocar e monitorar a área na qual residem para detecção de patogênese e alterações em seu microambiente. Atuando como uma importante linha de defesa no encéfalo, a microglia torna-se facilmente ativada em resposta a insultos no SNC ou estímulos imunológicos. Esses estímulos se ligam a diversos receptores seletivos que se encontram distribuídos na superfície celular, incluindo receptores para endotoxinas, citocinas, quimiocinas, proteínas defeituosas, fatores do soro e ATP.

As evidências que sustentam o envolvimento da neuroinflamação na DP são provenientes de estudos nos quais foi mostrada uma associação entre infecção e neurodegeneração. As doenças neurodegenerativas tendem a ser acentuadas por infecções sistêmicas, e a microglia ativada pode estar envolvida nesse processo. Por exemplo, um estudo realizado por Perry (2004) demonstra que infecções sistêmicas induzem ativação microglial na esclerose múltipla. Assim, é possível que insultos adicionais de infecções acentuem o progresso de processos inflamatórios e degenerativos.

Os estímulos de ativação da microglia levam a alterações morfológicas da célula em repouso, no qual ela altera sua forma ramificada para uma forma amebóide de modo a facilitar a sua proliferação, migração e fagocitose (Nimmerjahn *et al.*, 2005). Ela estende suas ramificações em torno da área que sofreu o insulto e como resultado há fagocitose de células danificadas, removendo potencialmente o material danificado e protegendo, assim, as células vizinhas.

A ativação da microglia é vital para a função normal do cérebro, no que diz respeito ao controle do microambiente neuronal e sua ativação moderada tem efeitos aparentemente benéficos às células circundantes. No entanto, quando a microglia é continuamente ativada ou super ativada, pode contribuir com danos adicionais ao insulto, particularmente aos neurônios. Quando a microglia torna-se ativada, seja por ativação direta por uma toxina, patógenos ou proteínas endógenas, ou indiretamente por sinais de neurônios lesionados, essa microglia ativada pode

persistir devido a possíveis efeitos de *feedback* positivo de neurônios que estão morrendo, mesmo que a lesão inicial tenha cessado. Portanto, a ativação microglial, e, por conseguinte a neuroinflamação, pode ser propagada e prolongada inapropriadamente para amplificar a destruição de neurônios; um processo referido como microgliose reativa, a qual é uma característica comum de doenças neurodegenerativas (Gao & Hong, 2008).

1.4 POTENCIAIS EFEITOS NEUROPROTETORES DA MINOCICLINA

A DP é uma das desordens neurológicas que mais recebe atenção e investimento em pesquisa. No entanto, os avanços no que se refere ao desenvolvimento de agentes para o tratamento desta desordem têm falhado na reversão da perda progressiva de neurônios dopaminérgicos, uma vez que não estão precisamente direcionados ao problema subjacente e primário dessa patologia. As estratégias terapêuticas atuais para a DP visam principalmente reduzir a severidade dos sintomas, para os quais são utilizados quatro principais categorias de drogas: (1) agonistas de receptores dopaminérgicos, (2) inibidores da MAOB, (3) anticolinérgicos e (4) L-dihidroxifenilalanina (L-DOPA).

Por encontrar-se bem estabelecido na literatura que a neuroinflamação é um importante contribuinte para o processo crônico degenerativo em modelos *in vivo* e *in vitro* da DP, e possivelmente para a própria DP idiopática, diversos estudos experimentais têm apostado na inibição da inflamação como uma estratégia terapêutica promissora, resultando em atenuação da degeneração dopaminérgica nigroestriatal em modelos de DP (Gao *et al.*, 2003).

A minociclina é uma tetraciclina de segunda geração que exerce efeitos antiinflamatórios distintos de sua ação antimicrobiana (Klein & Cunha, 2001). Recentemente, tem crescido as evidências de que a minociclina promove neuroproteção em modelos de insulto neurovascular (Stirling *et al.*, 2005; Yrjanheikki *et al.*, 1998, 1999), doença de Parkinson (Du *et al.*, 2001), doença de Huntington e esclerose amiotrófica lateral (Chen *et al.*, 2000).

A organização molecular da minociclina (Figura 1) pode estar associada com o sucesso de seus mecanismos protetores, uma vez que possui natureza lipofílica favorecendo, assim, sua passagem pela barreira hemato-encefálica (Domercq & Matute, 2004; Yong *et al.*, 2004). Além disso, a minociclina é absorvida quase completamente e de forma muito rápida (Blum *et al.*, 2004), com meia-vida

média superior a outras drogas com ação biológica similar.

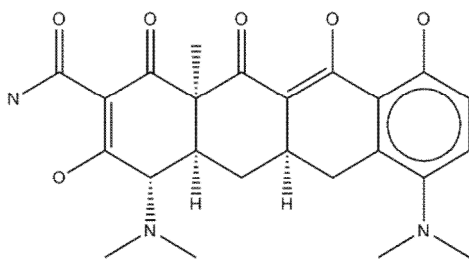


Figura 1. Estrutura molecular da minociclina (Stirling *et al.*, 2005)

In vivo, a minociclina é capaz de reverter as conseqüências a danos neuronais mimetizados em modelos animais de isquemia cerebral, encefalomielite autoimune, DP e doença de Huntington. Nesses estudos, os autores sustentam que a minociclina exerceu efeitos pleiotrópicos em uma variedade de tipos celulares incluindo supressão da produção de óxido nítrico pela microglia e neuroproteção direta.

Os efeitos específicos da minociclina em neurônios tem sido estudo *in vitro*, através da utilização de culturas neuronais. Diversos estudos sugerem que a proteção conferida pela minociclina está baseada em suas propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes, como a inibição de metaloproteinasas da matriz (Golub *et al.*, 1998), bloqueio da indução da NOS (Amin *et al.*, 1996) e inibição da liberação de citocromo C pela mitocôndria (Zhu *et al.*, 2002). Além disso, a neuroproteção mediada pela minociclina está associada com o bloqueio de caspases (Wang *et al.*, 2004), inibição da MAP cinase p38 (Wang *et al.*, 2003) e envolvimento direto na transição de permeabilidade mitocondrial (Gieseler *et al.*, 2008).

Casarejos e colaboradores (2006) demonstraram que a administração de minociclina em culturas mesencefálicas de camundongos, expostas a rotenona resultou em proteção de neurônios dopaminérgicos depois da adição de microglia nesse sistema. Foi observado ainda que a morte celular por apoptose, detectada através do teste de TUNEL, teve seu percentual reduzido com a utilização de minociclina.

1.5 OBJETIVOS

1.5.1 **Objetivo geral:**

- Avaliar possíveis efeitos neuroproterores da administração de minociclina em modelo de neurotoxicidade induzida por rotenona em culturas neuronais de mesencéfalo ventral de ratos da linhagem Wistar.

1.5.2 **Objetivos específicos:**

- Avaliar os efeitos neurotóxicos da rotenona em diferentes concentrações e períodos de exposição das culturas primárias derivadas de mesencéfalo ventral de ratos neonatos da linhagem Wistar;

- Investigar a participação do componente glial ao comparar os efeitos da rotenona em culturas semipuras (maior percentual de neurônios) e culturas mistas (neurônios e maior percentual de células da glia);

- Investigar se o pré-tratamento com a minociclina é capaz de reduzir/inibir o efeito neurotóxico da rotenona em culturas mistas;

- Analisar os efeitos neurotóxicos da rotenona em culturas semipuras após adição de monoculturas de microglia;

- Analisar os efeitos da administração de minociclina em culturas semipuras expostas a rotenona após a adição de monoculturas de microglia.

2 Metodologia

2.1 ANIMAIS UTILIZADOS

Foram utilizados ratos neonatos da linhagem Wistar com até quatro dias de idade (PND2 – PND4), provenientes do Biotério do Instituto de Ciências Biológicas – UFPA. Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com as normas estabelecidas no Guia Princípios Éticos e Práticos do Uso de Animais de Experimentação, da Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP. Este trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisas com Animais da UFPA.

2.2 CULTURAS PRIMÁRIAS DE NEURÔNIOS

Os animais foram sacrificados por decapitação abrupta, realizada fora da cabine de fluxo laminar sobre uma placa petri contendo álcool 70%, seguida da dissecação do encéfalo, realizada no interior da cabine de fluxo laminar. Em seguida, o encéfalo foi transferido para outra placa com novo meio de dissecação, a fim de se evitar contaminação das amostras.

O mesencéfalo ventral, livre de meninges, foi microdissecado em meio de dissecação estéril segundo o protocolo utilizado por Smeyne & Smeyne (2002). As regiões neuronais isoladas foram então incubadas por cerca de 5 a 10 minutos, a 37°C, em solução de tripsina-EDTA 0,05% em solução livre de cálcio para digestão enzimática do tecido.

As amostras foram então transferidas para o meio de cultura DMEM contendo soro fetal bovino (FBS) a 10% e triturados mecanicamente de maneira suave com o auxílio de pipeta Pauster. Este processo foi então repetido, porém, com outra pipeta Pauster flambada, a qual apresenta metade do diâmetro da que foi utilizada primeiramente.

Posterior a esse procedimento, seguiu-se com o plaqueamento das células contidas no sobrenadante a uma densidade aproximada de 5×10^5 células/poço em 1 ml de meio de cultura, em placas de cultura multi-poços previamente tratadas com poli-L-lisina (substrato de adesão das células) e em seguida mantidas em incubadora de células com atmosfera umidificada a 37°C com 5% de CO₂.

Estas culturas foram então mantidas até o período da experimentação,

sendo feitas trocas de meio em intervalos de 4 dias.

Para as culturas mistas (neurônios e maior percentual de células da glia), o meio de cultura utilizado até o sétimo dia de cultura foi DMEM suplementado com 10% de FBS, 10% de soro de cavalo (HS), 25µM de glutamato e antibióticos (penicilina/estreptomicina). Ao sétimo dia de cultura, no início do tratamento, a concentração da suplementação do meio com FBS e HS foi reduzida para 2%.

Para as culturas semipuras de neurônios (maior percentual de neurônios), foi utilizado no primeiro dia de cultura DMEM suplementado com 10% de FBS, 25 µM de glutamato e antibióticos (penicilina/estreptomicina). No terceiro dia, o meio é trocado por DMEM suplementado com 25 µM de glutamato, antibióticos e 5 µM de 1β-arabinofuranosilcitosina (Ara-C), composto utilizado como inibidor de crescimento glial. No quinto dia de cultura, este meio é novamente trocado e adicionado o mesmo meio utilizado no dia do tratamento de culturas mistas.

2.3 CULTURAS PRIMÁRIAS DE MICROGLIA

O protocolo utilizado para a geração de destas culturas é uma adaptação da metodologia de Candelario-Jalil *et al.* (2007). O tecido utilizado também foi mesencéfalo ventral, microdissecado como descrito anteriormente. O procedimento desse tipo de cultura diferencia-se a partir da etapa da digestão enzimática do tecido, que é seguida da filtragem do meio em filtro de seringa (poro de 45 µm). Em seguida, o filtrado foi centrifugado a 1000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante obtido é retirado e um novo volume de meio foi adicionado. A partir daí, a suspensão celular foi ressuspensa e plaqueada em placa multi-poços contendo DMEM F12 e levadas para a incubadora 10 a 14 dias. Decorrido esse tempo, o meio foi retirado e então foi realizada tripsinização (solução de tripsina-EDTA 0,05% por 15 minutos) com o objetivo de desfazer as conexões que mantém a monocamada celular no fundo do poço. Após isso, é feita raspagem do fundo do poço para obtenção de suspensão celular de microglia que foi posteriormente transferida para uma nova placa contendo DMEM F12 e mantida por mais 24 horas na incubadora para posterior tratamento.

O fenótipo dessa cultura foi confirmado através de imunocitoquímica, que caracterizou a suspensão celular obtida com 86, 42% de células positivas para OX-42 (anticorpo contra o receptor do complemento tipo 3 de células microgliais) em relação ao total de células marcadas por contra-coloração pelo método de Nissl.

2.4 ADIÇÃO DE CÉLULAS MICROGLIAIS A CULTURAS SEMIPURAS

Após atingir confluência, foram preparadas suspensões celulares de culturas microgliais contendo $1,86 \times 10^4$ células/poço de culturas semipuras. Esse número foi obtido através de contagem celular pelo método de exclusão do Azul Tripán, corante utilizado para marcação de células viáveis.

2.5 INTOXICAÇÃO COM ROTENONA

A exposição das células à rotenona foi realizada a partir do sétimo dia de cultura, onde o meio anterior foi desprezado e colocado um novo meio com a solução de rotenona adicionada, preparada a partir da diluição da droga em DMSO (Dimetilsulfóxido), para concentrações finais de 10, 20, 30, 40 e 50 nM. O tratamento com rotenona teve duração de 1, 3, 5 e 7 dias.

2.6 ADMINISTRAÇÃO DA MINOCICLINA

Ao sétimo dia de cultura, as células foram pré-tratadas com a solução de minociclina, preparada a partir de sua diluição em PBS e solução estoque na concentração de 15 mg/mL. A administração de minociclina foi realizada 30 minutos antes do tratamento com rotenona.

2.7 ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR

Foi realizada com a utilização da técnica colorimétrica do MTT (3-(4,5-cimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) (Mosmann, 1983). Após o período de tratamento, as culturas foram submetidas ao teste de viabilidade celular. O sal de tetrazolium (MTT) foi diluído em PBS em concentração de 5 mg/ml. A cada poço da placa de cultura foi adicionado 50 μ L desta solução, sendo posteriormente incubada por 3 horas em condições normais de cultura. Este método é baseado na clivagem do sal de tetrazolium amarelado MTT em cristais de formazan, de coloração escura ou púrpura, por células metabolicamente ativas. Os cristais de formazan formados a partir do MTT foram então solubilizados em isopropanol e quantificados por espectrofotometria no comprimento de onda de 570 nm.

2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise estatística foi utilizado o teste t de *Student* para se observar

a diferença entre os grupos, onde foi adotado um valor para $p < 0,05$, e estatística descritiva para se ter o valor da média e do erro padrão médio.

3 RESULTADOS

3.1 CARACTERIZAÇÃO DOS EFEITOS DA EXPOSIÇÃO À ROTENONA SOBRE A VIABILIDADE CELULAR

A fim de investigar se os efeitos da rotenona sobre as células em cultura eram dependentes de concentração e de tempo de exposição, foram testadas cinco concentrações (10, 20, 30, 40 e 50 nM) e quatro tempos de exposição (1, 3, 5 e 7 dias). A perda celular associada a este paradigma experimental foi analisada através de teste de viabilidade celular pelo ensaio colorimétrico do MTT.

Em relação ao grupo controle, a análise estatística dos dados obtidos mostrou que, em culturas semipuras de neurônios, não houve perda significativa de viabilidade celular nas concentrações de 10 e 20 nM de rotenona. Com 30 nM, a perda de viabilidade celular foi significativa em 5 e 7 dias de exposição à droga, com valores de viabilidade celular de $92,03 \pm 1,25\%$ e $89,42 \pm 2,17\%$, respectivamente, em relação aos poços-controle. A exposição de culturas semipuras a concentração de 40 nM de rotenona resultou em efeitos observados a partir de 3 dias de exposição, quando houve perda celular de $9,82 \pm 2,72\%$, em relação ao controle. Os valores de viabilidade celular para os tempos de exposição de 5 e 7 dias foram de $85,47 \pm 2,01\%$ e $81,32 \pm 0,81\%$, respectivamente. Na maior concentração testada (50 nM) houve perda celular significativa em todos os tempos de exposição (Figura 2, Tabela 1).

Em culturas mistas (neurônios e maior percentual de células da glia) os efeitos tóxicos da rotenona foram mais acentuados, sendo observados já com 20 nM em 7 dias de exposição, resultando em valores de viabilidade celular de $85,14 \pm 0,74\%$, em comparação ao controle. Com 30 nM, ocorreu perda celular significativa com 3, 5 e 7 dias de exposição, com valores de viabilidade celular de $82,41 \pm 0,93\%$, $79,13 \pm 0,95\%$ e $71,28 \pm 1,65\%$, respectivamente. Nas concentrações de 40 e 50 nM os valores de viabilidade foram menores quanto maior o tempo de exposição, e em todos houve perda significativa de viabilidade celular, em relação ao controle (Figura 3, Tabela 2). Com 40 nM, os valores de viabilidade celular foram de $84,34 \pm 2,28\%$, $78,16 \pm 0,31\%$, $67,81 \pm 1,21\%$ e $56,37 \pm 0,73\%$ em 1, 3, 5 e 7 dias. Com 50 nM, o valor de viabilidade celular com 1 dia de exposição foi de $81,37 \pm 2,42\%$, com 3 dias foi de $75,43 \pm 2,07\%$ e com 5 dias foi de $63,18 \pm 0,98\%$; com 7 dias, a perda de

viabilidade celular foi de $49,15 \pm 0,56\%$ (Figura 3, Tabela 2).

Tabela 1. Valores de viabilidade celular das culturas mesencefálicas semipuras tratadas com rotenona por 1, 3, 5 e 7 dias. Resultados expressos em % do controle. $\pm$ Erro padrão. Rot, rotenona.

	Rot 10 nM	Rot 20 nM	Rot 30 nM	Rot 40 nM	Rot 50 nM
1 dia	$99,03 \pm 1,14$	$98,71 \pm 3,81$	$96,63 \pm 0,75$	$95,43 \pm 1,18$	$89,73 \pm 3,71$
3 dias	$99,01 \pm 2,23$	$96,42 \pm 0,85$	$95,82 \pm 0,97$	$90,18 \pm 2,72$	$82,43 \pm 0,91$
5 dias	$98,82 \pm 1,13$	$96,31 \pm 1,03$	$92,03 \pm 1,25$	$85,41 \pm 2,01$	$75,82 \pm 0,82$
7 dias	$97,14 \pm 2,18$	$95,43 \pm 0,97$	$89,42 \pm 2,17$	$81,32 \pm 0,081$	$68,59 \pm 1,23$

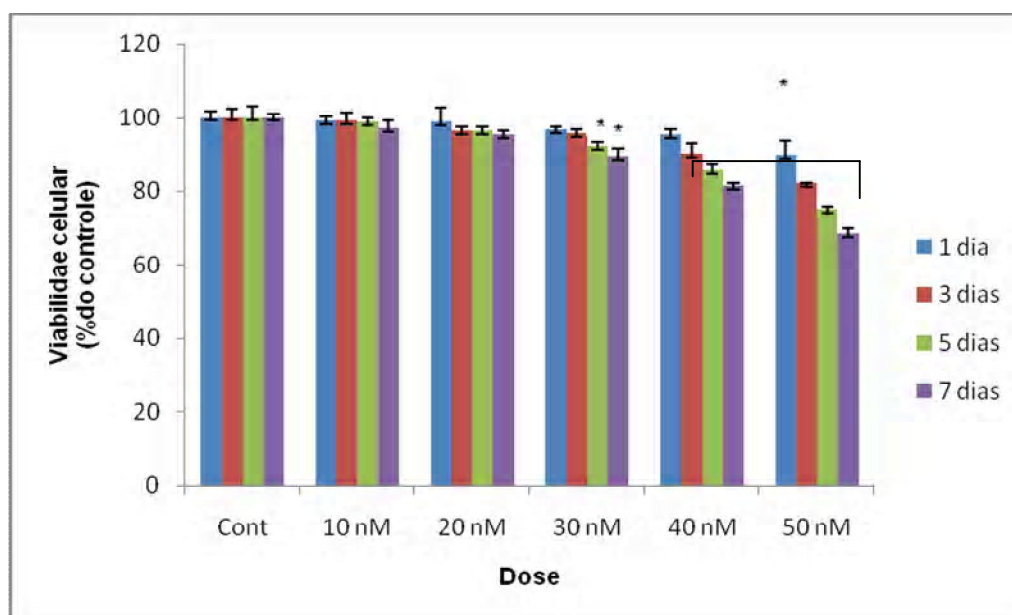


Figura 2. Efeitos da administração de diferentes concentrações de rotenona em diferentes tempos de exposição sobre a viabilidade celular de culturas semipuras de neurônios. Cont, controle. (*) $p < 0,05$, em relação ao controle.

Tabela 2. Valores de viabilidade celular das culturas mesencefálicas mistas tratadas com rotenona por 1, 3, 5 e 7 dias. Resultados expressos em % do controle. $\pm$ Erro padrão. Rot, rotenona.

	Rot 10 nM	Rot 20 nM	Rot 30 nM	Rot 40 nM	Rot 50 nM
1 dia	97,61 $\pm$ 1,64	96,30 $\pm$ 2,05	94,53 $\pm$ 1,01	84,34 $\pm$ 2,28	81,37 $\pm$ 2,42
3 dias	97,73 $\pm$ 2,15	96,45 $\pm$ 1,43	82,41 $\pm$ 0,93	78,16 $\pm$ 0,31	75,43 $\pm$ 2,07
5 dias	96,42 $\pm$ 1,52	95,32 $\pm$ 0,84	79,13 $\pm$ 0,95	67,81 $\pm$ 1,21	63,18 $\pm$ 0,98
7 dias	96,01 $\pm$ 0,91	85,14 $\pm$ 0,74	71,28 $\pm$ 0,65	56,37 $\pm$ 0,73	49,15 $\pm$ 0,56

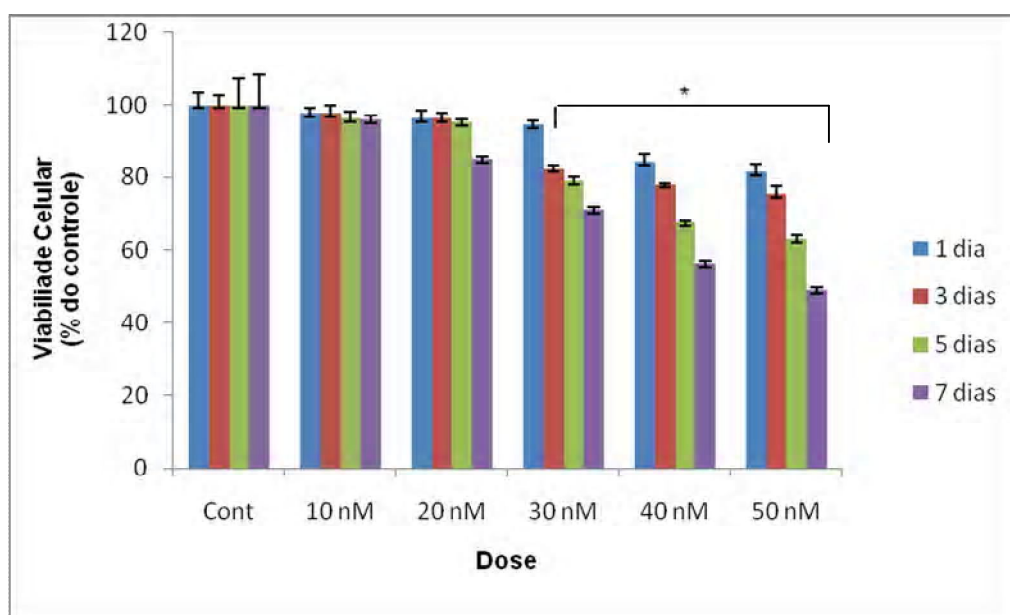


Figura 3. Efeitos da administração de diferentes concentrações e tempos de exposição a rotenona sobre a viabilidade celular de culturas mistas. (*) $p < 0,05$ em relação ao controle.

3.2 EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE MINOCICLINA SOBRE A VIABILIDADE CELULAR DE CULTURAS MISTAS EXPOSTAS A ROTENONA

A partir dos resultados apresentados anteriormente, foi possível observar que as culturas mistas são mais suscetíveis aos efeitos tóxicos da rotenona do que as culturas semipuras de neurônios, sugerindo que a presença de gliócitos pode contribuir de forma deletéria na neurotoxicidade induzida por rotenona. Nesse sentido, realizamos experimentos com a finalidade de avaliar os efeitos da administração de minociclina, um inibidor de ativação microglial, sobre a viabilidade celular de culturas mistas expostas a rotenona.

Em primeira análise, foram investigados os efeitos de diferentes concentrações de minociclina isoladamente sobre a viabilidade celular de culturas mistas a fim de se obter a curva dose-resposta para esse composto. Foi observado que os valores de viabilidade celular dos poços tratados com 0,5, 10 e 30 μM de minociclina foram similares ao do controle, sem diferença significativa. Em concentrações maiores (60 e 100 μM) o composto se mostrou tóxico, resultando em perda celular significativa (Figura 4).

A fim de se investigar a influência da inibição microglial sobre a toxicidade induzida por rotenona, realizou-se pré-tratamento com 0,5 μM de minociclina em culturas mistas expostas a 50 nM de rotenona. Nestas condições, observou-se atenuação significativa da perda de viabilidade celular induzida por rotenona. Em relação aos poços-controle, o valor de viabilidade celular dos poços tratados com essa concentração de minociclina foi diferente e significante, não obstante não ter havido reversão total da neurotoxicidade.

Em experimentos em que houve pré-exposição a 30 μM de minociclina houve bloqueio do efeito neurotóxico previamente observado, onde os valores de viabilidade celular foram semelhantes aos observados no grupo controle. Além disso, esses valores foram estatisticamente diferentes dos valores encontrados dos poços tratados apenas com rotenona (Figura 5).

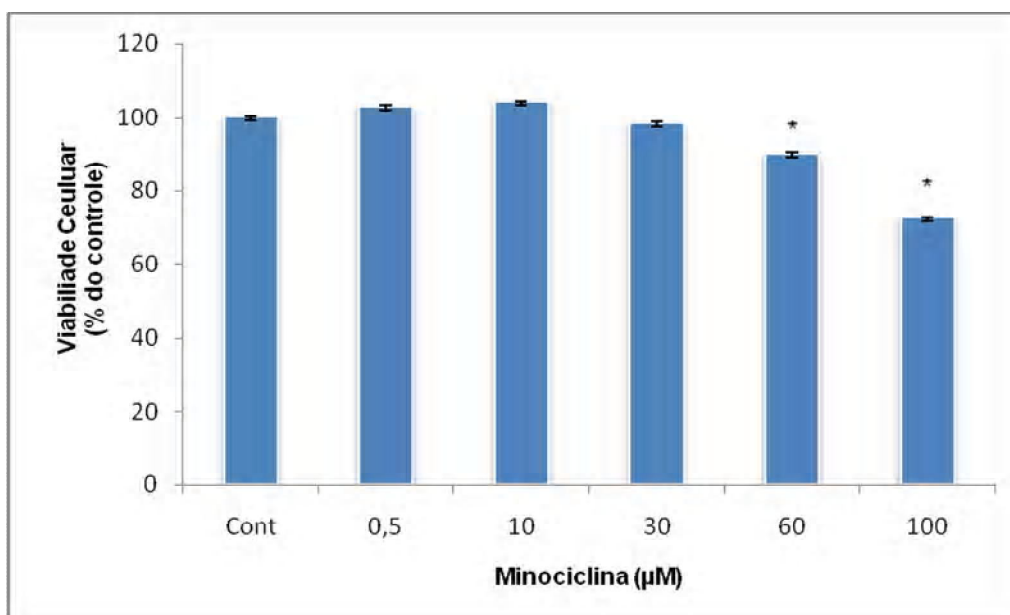


Figura 4. Efeitos da administração de diferentes concentrações de minociclina sobre a viabilidade celular de culturas mistas. (*) $p < 0,05$ em relação ao controle.

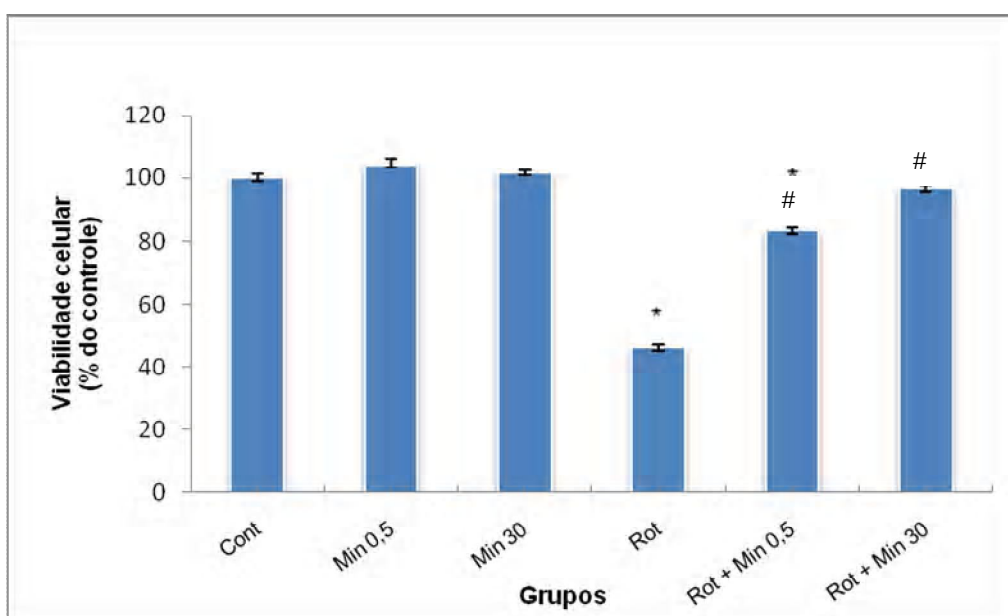


Figura 5. Efeitos do pré-tratamento com minociclina sobre a toxicidade induzida por rotenona (50 nM) em culturas mistas. O tratamento com rotenona teve duração de 7 dias. Rot, rotenona. Min, minociclina (*) $p < 0,05$ em relação ao controle e (#) $p < 0,05$ em relação

3.3 EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE MINOCICLINA EM CULTURAS SEMIPURAS EXPOSTAS A ROTENONA APÓS ADIÇÃO DE MICROGLIA

Considerando os resultados anteriores, onde houve atenuação significativa da perda de viabilidade celular pela utilização de minociclina em culturas mistas expostas a rotenona, investigamos os efeitos dessa utilização sobre a viabilidade celular de culturas semipuras expostas a rotenona após a adição de células microgлияis.

As culturas em que se buscou obter, através do uso de protocolo diferenciado (ver Métodos), maior densidade de células microgлияis resultou em alto percentual de células positivas para OX-42 (média de 86% de células positivas, dados não mostrados). A adição de $1,86 \times 10^4$ células desta suspensão a cada poço de culturas semipuras não resultou em alteração significativa de viabilidade celular em relação ao controle. Como já mostrado em experimentos anteriores, novamente o tratamento com 50 nM de rotenona por 7 dias levou a alteração significativa no valor de viabilidade celular (cerca de 68,59%) em culturas semipuras. A adição de microgлия a estas culturas tratadas com rotenona (semipuras + rotenona + microgлия) resultou em maior redução de viabilidade celular ($32,51 \pm 3,14\%$, em relação ao controle), diferença significativa comparada ao tratamento isolado com rotenona. A administração de 30 μ M de minociclina (semipuras + rotenona + minociclina + microgлия), no entanto, foi capaz de promover atenuação dessa redução, resultando em valor de viabilidade celular ($73,56 \pm 2,85\%$) significativamente diferente do tratamento de culturas semipuras com rotenona (semipuras + rotenona) e das culturas tratadas com rotenona e microgлия (semipuras + rotenona + microgлия), apesar de ainda resultar em valores de viabilidade diferentes dos valores encontrados em poços-controle (Figura 6).

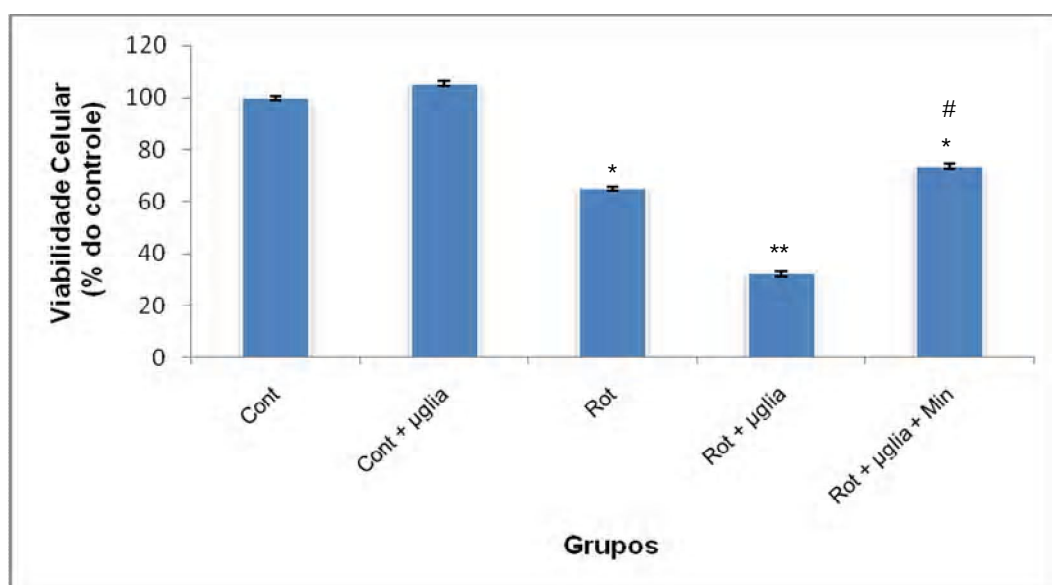


Figura 6. Efeitos da administração de minociclina (30 μ M) sobre a viabilidade celular de culturas semipuras de neurônio após a adição de microglia e exposição a rotenona (50 nM). O tratamento com rotenona teve duração de 7 dias. Cont, controle. Rot, rotenona. μ glia, microglia. Min, minociclina (*). $p < 0,05$ em relação ao controle, (**) $p < 0,01$ em relação ao grupo Cont e (#) $p < 0,05$ em relação ao grupo Rot e grupo Rot + μ glia.

4 DISCUSSÃO

Diversos mecanismos de neurodegeneração envolvidos na patogênese da DP e outras desordens neurodegenerativas encontram-se bem descritos na literatura, favorecendo assim a investigação de estratégias terapêuticas corretamente direcionadas ao tratamento destas patologias. Excitotoxicidade, estresse oxidativo, disfunção mitocondrial e processos apoptóticos são alguns desses mecanismos com eventos celulares e moleculares bem identificados. Além destes, os mecanismos neuroinflamatórios também são alvo de intensa investigação científica por contribuir para a cascata de eventos que levam a degeneração neuronal através de, entre outros eventos, ativação microglial (Banati *et al.*, 1998).

Nesse sentido, este trabalho buscou demonstrar os efeitos decorrentes de bloqueio microglial por minociclina em condições experimentais onde se induziu perda celular através da exposição à rotenona, considerado um modelo *in vitro* para o estudo da DP, por conseguir mimetizar alguns dos principais achados neuropatológicos da DP, tais como inclusões eosinofílicas semelhantes a corpos de Lewy e inibição do complexo mitocondrial I.

Semelhante a diversos estudos descritos na literatura, a exposição das culturas neuronais a rotenona resultou em efeitos tóxicos dependente de concentração e tempo de exposição no modelo experimental *in vitro* utilizado neste trabalho, em ambos os fenótipos de cultura.

Em culturas semipuras, os efeitos da rotenona sobre a perda de viabilidade celular foram significantes com 30 nM, em 5 e 7 dias de exposição, 40 nM em 3, 5 e 7 dias, e em todos os tempos na concentração de 50 nM. Culturas mistas, no entanto, apresentaram-se mais suscetíveis, onde a perda celular foi significativa desde 20 nM, em 7 dias de exposição. Ainda nestas culturas, o tratamento com 30 nM de rotenona resultou em perda significativa de viabilidade com 3, 5 e 7 dias, e com 40 e 50 nM foi significativa em todos os tempos de exposição.

Em um estudo realizado por Radad e colaboradores (2006) foi observado que a exposição de culturas mesencefálicas de camundongos da linhagem OF1/SPF a rotenona resultou em perda, dependente de tempo e concentração, de neurônios imunorreativos para a enzima tirosina hidroxilase (TH⁺). Neste trabalho, a adição de 20 nM de rotenona por 24 horas diminuiu em 26% a sobrevivência de neurônios TH⁺,

enquanto que o tratamento por 48 horas diminuiu progressivamente tal perda, chegando a reduzir 50% desses neurônios.

Em outro estudo, sob diferentes condições de experimentação, onde foram utilizadas células de neuroblastoma da linhagem SK-N-MC, Sherer *et al.* (2003b), verificou que a rotenona promoveu morte celular dependente de concentração. Através do método fluorescente de "Sytox Green", observou-se que 10 nM de rotenona reduziu a síntese de ATP e aumentou a expressão de proteínas carboniladas.

É relevante o fato de termos encontrado maior suscetibilidade à exposição a rotenona em culturas mistas, quando comparadas com culturas semipuras. Considerando-se que culturas mistas apresentam maior percentual de gliócitos, e conseqüentemente de microgliócitos, estes achados sugerem fortemente que há uma importante interferência de células da glia na neurodegeneração induzida por rotenona.

Gao *et al.* (2002), utilizando culturas mesencefálicas mistas e semipuras de ratos da linhagem Fischer 344, observou que a rotenona promoveu redução dependente de tempo e concentração na captação de dopamina e no número de neurônios TH⁺ e, tal como observado em nossos experimentos, as culturas mistas mostraram ter maior suscetibilidade aos efeitos tóxicos da rotenona, havendo redução na captação de dopamina estatisticamente significativa com 1 nM de rotenona em 8 dias de exposição, enquanto que em culturas semipuras estes efeitos só foram observados com 25 nM. Além disso, nesse trabalho o autor demonstra que a microglia é o principal tipo gliócito envolvido, uma vez que a adição de $2,5 \times 10^4$ células microgliais/poço a culturas mesencefálicas semipuras de neurônios aumentou significativamente a sensibilidade de neurônios dopaminérgicos a neurotoxicidade induzida por 10 nM de rotenona em 8 dias de exposição. Ainda nesse estudo, a liberação de radicais superóxidos pela NADPH oxidase microglial foi outro evento induzido pela rotenona e que foi suprimido com a utilização de apocinina, um inibidor da NADPH oxidase.

Encontra-se bem documentado na literatura que a região do mesencéfalo da qual faz parte a substância negra apresenta a mais elevada densidade de células microgliais do encéfalo (Kim *et al.*, 2000; Lawson *et al.*, 1990). Estas células participam da imunidade inata e adquirida e realizam a vigilância imune do tecido em condições fisiológicas. Entretanto, a microglia parece exercer um papel duplo no

contexto inflamatório geral do sistema nervoso central. Seus efeitos benéficos em distúrbios neurais incluem a remoção de detritos celulares e a produção de fatores tróficos (Long-Smith *et al.*, 2009). Por outro lado, a ativação microglial tem sido associada com processos degenerativos através da produção de uma variedade de fatores pró-inflamatórios e neurotóxicos, como o fator de necrose tumoral alfa, interleucina-1 β , eicosanóides, óxido nítrico e ânion superóxido (Chao *et al.*, 1992; Cassarino *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 2000a).

A hipótese de que a presença de gliócitos possa ter contribuído com a perda de viabilidade celular induzida por rotenona levou-nos a investigar os efeitos da administração de minociclina, um inibidor de ativação microglial (Du *et al.*, 2001; Yrjanheikki *et al.*, 1998), sobre a viabilidade celular de culturas expostas à rotenona.

O pré-tratamento com minociclina (30 μ M) resultou em bloqueio do efeito neurotóxico pela exposição a 50 nM de rotenona (7 dias) em culturas mistas, onde foi observado um aumento de aproximadamente 50% nos valores de viabilidade celular dos poços tratados com minociclina em relação aos poços tratados apenas com rotenona.

Estes achados, somados aos mecanismos de ação da minociclina, apontam para a possibilidade de que a ativação microglial pode representar um evento inicial importante que contribui para a degeneração de populações neuronais como consequência da exposição a rotenona, sob nossas condições experimentais. Em função disso, passamos a investigar os efeitos da adição de células microgлияis a culturas semipuras de neurônios expostas a rotenona, o que resultou em perda significativa de viabilidade destas culturas, maior do que a observada com a exposição de rotenona sem microglia. Estes resultados demonstram inequivocamente os efeitos deletérios da ação dos microgliócitos, possivelmente relacionados à liberação de fatores pró-inflamatórios e neurotóxicos, como já mencionado (Chao *et al.*, 1992; Cassarino *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 2000b).

Em condições experimentais similares, os resultados de Casarejos e colaboradores (2006) aproximam-se dos observados no nosso trabalho. Segundo o trabalho desenvolvido por aquele grupo, em que se buscou investigar a interação de fatores genéticos e ambientais na etiologia da DP, a minociclina preveniu completamente a perda celular de neurônios TH⁺ induzida pela exposição de 5 horas a 0,05 μ M de rotenona em culturas primárias de mesencéfalo de camundongos da linhagem 129SV/C57BL6 submetidos a nocaute de parkina (PK-KO), proteína

codificada pelo gene park-2 cuja mutação é apontada como a mais freqüente causa de parkinsonismo familiar (Kitada, 1998).

Nós observamos que a administração de minociclina no grupo de culturas semipuras tratadas com rotenona após a adição de microglia reduziu a perda de viabilidade celular decorrente do tratamento com rotenona e microglia. Mesmo não havendo reversão total do efeito neurotóxico, os valores de viabilidade celular desse grupo foram menores e significativamente diferentes dos valores de viabilidade celular dos poços-controle. Esses achados corroboram em parte com os resultados apresentados por Casarejos que, por sua vez, encontrou bloqueio total pela minociclina da expressão microglial induzida pela exposição de culturas semipuras a 0,05 μ M de rotenona.

5 CONCLUSÕES

- A rotenona apresentou efeitos neurotóxicos dependentes de concentração e tempo de exposição em culturas primárias derivadas de mesencéfalo ventral de ratos neonatos;

- Culturas mistas foram mais suscetíveis aos efeitos tóxicos da rotenona que culturas semipuras;

- A adição de células microgliais a culturas semipuras expostas à rotenona acentuou a perda de viabilidade celular induzida por rotenona;

- A administração de minociclina foi capaz de bloquear totalmente a perda de viabilidade celular de culturas mistas expostas a rotenona e atenuar a neurotoxicidade da rotenona em culturas semipuras após a adição de microglia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMIN, A. R., ATTUR, M. G., THAKKER, G. D., PATEL, P. D., VYAS, P. R., PATEL, R. N., PATEL, I. R., ABRAMSON, S. B. A novel mechanism of action of tetracyclines: effects on nitric oxide synthases. **Procediments National Academic Science USA** **93**: 14014–14019. 1996.
- BANATI, R. B., DANIEL, S. E., BLUNT, S. B. Glial pathology but absence apoptotic nigral neurons in long-stading Parkinson's disease. **Movement Disorders** **13**: 221-227. 1998.
- BARRON, K. D. The microglial cell: a historical review. **Journal Neurology Science** **134**: 57-68. 1995.
- BERTABET, 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. **Nature Letters** **82**: 615-624. 1994.
- BLUM, D., CHTARTO, A., TENENBAUM, L., BROTCHE, J., LEVIVIER, M. Clinical potential of minocycline for neurodegenerative disorders. **Neurobiology Disorders** **17**: 359–366. 2004.
- CANDELARIO-JALIL, E., OLIVEIRA, A. C. P, GRAF, S., BHATIAL, H. S., HULLI, M., MUÑO, E., FIEBICH, B. L. Resveratrol potently reduces prostaglandin E2 production and free radical formation in lipopolysaccharide-activated primary rat microglia **Journal of Neuroinflammation** **4**: 4-25. 2007.
- CASAREJOS, MJ; MENÉNDEZ,J; SOLANO, RM; RODRÍGUEZ-NAVARRO, JA; GARCÍA DE YÉBENES, J; MENA, MA. Susceptibility to rotenone is increased in neurons from parkin null mice and is reduced by minocycline. **Journal of Neurochemistry** **97**: 934-946. 2006.
- CASSARINO, D. S., FALL, C. P., SWERDLOW, R. H., SMITH, T. H., HALVORSEN, E. M., MILLER, S. W., PARKS, J. P., PARKER, W. D. Jr., BENNETT, J. P. Jr. Elevated reactive oxygen species and antioxidant enzyme activities in animal and cellular models of Parkinson's disease. **Biochimica et biophysica acta** **1362** (1): 77-86. 1997.

- CHAO, C. C., HU, S., MOLITOR, T. W., SHASKAN, E. G., PETERSON, P. K. Activated microglia mediate neuronal cell injury via a nitric oxide mechanism. **Journal Immunology** **149**: 2736–2741. 1992.
- CHEN, M., ONA, V. O., LI, M., FERRANTE, R. J., FINK, K. B., ZHU, S. Minocycline inhibits caspase-1 and caspase-3 expression and delays mortality in a transgenic mouse model of Huntington disease. **Nature Methods** **6(7)**: 797–801. 2000.
- DAMIER, P., HIRSCH, E. C., AGID, Y., JAVOY-AGID, F. Glutathione peroxidase, glial cells and Parkinson's disease. **Neuroscience** **52**: 1-6. 1993.
- DAMIER, P., HIRSCH, E. C., AGID, Y., GRAYBRIEL, A. M. The substantia nigra of the human brain. Patterns of loss of dopamine-countaing neurons in the Parkinson's disease. **Neuroscience** **31**: 15-21. 1999.
- DAUER, W. & PZZEDBORSKI, S. Parkinson's disease: Mechanisms and models. **Neuron** **39**: 889-909, 2003.
- DEL RIO-HORTEGA. Art and artifice in the science of histology. **Histopathology**, **22**:1425-1430. 1996.
- DOMERCQ, M. & MATUTE, C. Neuroprotection by tetracyclines. **Trends Pharmacology Science** **25**: 609–612. 2004.
- DU, Y., MA, Z., LIN, S., DODEL, R. C., GAO, F., BALES, K. R. Minocycline prevents nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson's disease. **Procediments National Academic Science USA** **98(25)**:14669–14674. 2001.
- FEARNLEY, J. M., LEES, A.J., Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. **Brain** **114**: 2283-2301. 1991.
- GAO, H.M., HONG, J.S., ZHANG, W., LIU, B. Distinct role of microglia in rotenone-induced degeneration of dopaminergic neurons. **The Journal of Neuroscience** **22**: 782-790. 2002.
- GAO, H. M., LIU, B., ZHANG, W., HONG, J. S. Novel anti-inflammatory therapy for Parkinson's disease. **Trends in Pharmacological Sciences** **24**: 395-401. 2003.
- GAO, H.M. & HONG, J.S. Why neurodegenerative diseases are progressive:

- uncontrolled inflammation drives disease progression. **Trends Immunology** **29**: 357–365. 2008.
- GELB, D.J., OLIVER, E., GILMAN, S. Diagnostic criteria for Parkinson disease. **Archive Neurology** **56**: 33–39. 1999.
- GIESELER, A., SHULTZE, A. T., KUPSH, K., HAROON, M. F., WOLF, G., SIEMEN, D., KREUTZMANN, P. Inhibitory modulation of the mitochondrial permeability transition by minocycline. **Biochemical Pharmacology** **14**: 200-209. 2008.
- GOLUB, L. M., LEE, H. M., RYAN, M. E., GIANNOBILE, W. V., PAYNE, J., SORSA, T. Tetracyclines inhibit connective tissue breakdown by multiple non-antimicrobial mechanisms. **Advances Dent Research** **12**: 12–26. 1998.
- GREENAMYRE, J. T., BERTABET, R., SHERER, T., PANOV, A., Response: Parkinson's disease, pesticides and mitochondrial dysfunction. **Trends Neuroscience** **24**: 247, 2001.
- HALLIDAY, G. M., BLUMBERGS, P. C., COTTON, R.G., BLESSING, W. W., GEFFEN, L. B. Loss of brainstem serotonin- and substance P-containing neurons in Parkinson's disease. **Brain Research** **510**: 104–107. 1990.
- HIRSCH, E. C. Glial cells and Parkinson's disease. **Journal Neurology** **247**: 1158-1162. 2000.
- HORNYKIEWICZ, O. & KISCH, S. J. Biochemical pathophysiology of Parkinson's disease. **Raven Press** **13**: 19-34. 1987.
- IKONOMIDOU, C., TURSKI, L. Neurodegenerative disorders: Clues from glutamate and energy metabolism. **Critical Reviste Neurobiology** **10**: 239–263. 1996.
- JELLINGER, K.A. The pathology of Parkinson's Disease. **Advances Neurology** **86**: 55-72. 2001.
- KLEIN NC, CUNHA BA. Tetracyclines. **Medicine Clinical North America** **79(4)**: 789–801. 1995.
- KIM, W. G., MOHNEY, R. P., WILSON, B., JEONH, G. H., LIU, B., HONG, J. S. Regional difference in susceptibility tolipopolysccharide-induced neurotoxicity in the rat brain: role of microglia. **The Journal of Neuroscience** **20**: 6309-6316. 2000.

- KITADA, T., ASAKAWA, S., HATTORI, N., MATSUMINE, H., YAMAMURA, Y., MNOSHIMA, S., YOKOCHI, Y., SHIMIZU, N. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. **Nature** **392**: 605-608. 1998.
- LANGSTON, J. W. & BALLARD JR, P. A. Parkinson's disease in a chemist working with 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. **The New England Journal of medicine** **4**: 310-318. 1983.
- LAWSON, L. J., PERRY, V. W., GORDON, S. Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. **Neuroscience** **39 (1)**: 151-170. 1990.
- LIU, B., DU, L., KONG, L.Y., HUDSON, P. M., WILSON, B. C., CHANG, R.C., ABEL, H. H., HONG, J. S. Reduction by naloxone of lipopolysaccharide-induced neurotoxicity in mouse cortical neuron-glia co-cultures. **Neuroscience** **97**: 749–756. 2000a.
- LIU, B. & HONG, J.S. Role of microglia in inflammation-mediated neurodegenerative diseases: mechanisms and strategies for therapeutic intervention. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics** **304**: 1-7. 2000b.
- LONG-SMITH, C. M., SULLIVAN, A. M., NOLAN, Y. M. The influence of microglia on the pathogenesis of Parkinson's disease. **Progress in Neurobiology** **10**: 958-969. 2009.
- McGEER, P.L., ITAGAKI, S., BOYES, B.E., McGEER, E.G. Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. **Neurology** **38**: 1285–1291. 1988.
- McGEER, P.L., McGEER, E.G. Inflammation and the degenerative diseases of ageing. **Annual New York Academic Science** **1035**: 104–116. 2004.
- McNAUGHT, K. S., BELIZAIRE, R., ISACSON, O., JENNER, P., OLANOW, C. W. Altered proteasomal function in sporadic Parkinson's disease. **Experimental Neurology** **179**: 38–46. 2003.
- McRITCHIE, D. A, CARTWRIGHT, H. R., HALLIDAY, G. M. Specific A10 dopaminergic nuclei in the midbrain degenerate in parkinson's disease. **Experimental Neurology** **144**: 202-213. 1997.
- MIRZA, B., HADBERG, H., THOMSEN, P., MOOS, T. The absence of reactive

- astrocytosis is indicative of a unique inflammatory process in Parkinson's disease. **Neuroscience 95 (2)**: 245-432. 2000.
- MIZUNO, Y., HATTORI, N., KITADA, T., MATSUMINE, H., MOTI, H., SHIMURA, H.. Familial Parkinson's disease. Alpha-synuclein and parkin. **Advances Neurology 86**: 13–21. 2001.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods 65**: 55-63. 1983.
- MUNCH, G., GERLACH, M., SIAN, J., WONG A., RIEDERER, P. Advanced glycation end products in neurodegeneration: more than early markers of oxidative stress? **Annual Neurology 44**: S85–S88. 1998.
- NICKLAS, W. J., YOUNGSTER S. K., KINDT., M. V., HEIKKILA, R. E. MPTP, MPP+ and mitochondrial function. **Life Scientist 40**: 721-772. 1987.
- NIMMERJAHN, A., KIRCHHOFF, F., HELMCHEN, F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma *in vivo*. **Science 308**: 1314–1318. 2005.
- NORTON, W. T., AQUINO, D. A., HOZUMI, L., CHIU, F. C., BROSANAN, C. F. Quantitative aspects of reactive gliosis: a review. **Neurochemistry Review 17**: 877-885. 1992.
- ORR, C. F., ROWE, D. B., HALLIDAY, G. M. An inflammatory review of Parkinson's disease. **Progress Neurobiology 68**: 325–340. 2002.
- PARKINSON, J. An Essay on the Shaking Palsy. Whittingham & Rowland, London. 1817.
- PERRY, V. H. The influence of systemic inflammation on inflammation in the brain: implications for chronic neurodegenerative disease. **Brain Behavioral Immunology 18**: 407–413. 2004.
- POLLACK, A. E. Anatomy, physiology, and pharmacology of the basal ganglia. **Neurological Clinical 19**: 523-534. 2001.
- RADAD, K., RAUSH, W., GILLE. Rotenone induces cell death in primary dopaminergic culture by increasing ROS production and inhibiting mitochondrial

- respiration. **Neurochemistry** **49**: 379-386. 2006.
- SAMII, A., NUTT., J.G., RANSON, B. R. Parkinson's disease. **The Lancet** **363**: 1783-1793, 2004.
- SHERER, T. B., BERTABET, R., KIM, J. H., GRENAMEYRE, J. T. Selective microglial activation in the rat rotenone model of Parkinson's disease. **Neuroscience Letters** **341**: 87-90. 2003a.
- SHERER, T. B., BERTABET, R., KIM, J. H., GRENAMEYRE, J. T., TESTA, C. M., RICHARDSON, J. R., MILLER, G. W., YAGI, T., MATSUNO-YAGI, A. Mechanism of toxicity in rotenone models of Parkinson's disease. **The Journal of Neuroscience** **23(34)**: 10756-10764. 2003b.
- SMEYNE, M., SMEYNE, R. J. Method for culturing postnatal substantia nigra as an *in vitro* model of Parkinson's disease. **Brain Research Protocols** **9**: 105-111. 2002.
- STIRLING, D. P., KOOCHESFAHANI, K. M., STEVES, J. D., TETZLAFF, W. Minocycline as neuroprotective agent. **The Neuroscientist** **11**: 308-319. 2005.
- TANNER, C. M. Is the cause of Parkinson's disease environmental or hereditary? Evidence from twin studies. **Advances Neurology** **91**: 133-142. 2003.
- TANSEY, M. G., MCCOY, M. K., FRANK-CANNON, T. C. Neuroinflammatory mechanisms in Parkinson's disease: potential environmental triggers, pathways, and targets for early therapeutic intervention. **Experimental Neurology**: 208, 1-25. 2007
- VILA, M., JACKSON-LEWIS, V., VUCOSAVIC, S., DJADETTI, R., LIBERATORE, G., OFTEN, D., KORSMEYER, S. J., PRZEDBORSKI, S. Bax ablation prevents dopaminergic neurodegeneration in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease. **Proceedings National Academic Science USA** **98**: 2837-2842. 2001.
- YONG, V. W., WELLS, J., GIULIANI, F., CASHA, S., POWER, C., METZ, L. M. The promise of minocycline in neurology. **Lancet Neurology** **3(12)**: 744-751. 2004.
- YRJANHEIKKI, J., KEINANEN, R., PELLIKKA, M., HOKFELT, T., KOISTINAHO, J.. Tetracyclines inhibit microglial activation and are neuroprotective in global brain ischemia. **Proceedings National Academic Science USA** **95(26)**: 15769-

1574. 1998.

- YRJANHEIKKI, J., TIKKA, T., KEINANEN, R., GOLDSTEINS, G., CHAN, P. H., KOISTINAHO, J. A tetracycline derivative, minocycline, reduces inflammation and protects against focal cerebral ischemia with a wide therapeutic window. **Proceedings National Academic Science USA** **96(23)**: 13496–13500. 1999.
- WANG, X., ZHU, S., DROZDA, M., ZHANG, W., STAVROVSKAYA, I. G., CATTANEO, E. Minocycline inhibits caspase-independent and -dependent mitochondrial cell death pathways in models of Huntington's disease. **Proceedings Natl Academic Science USA** **100(18)**:10483–10487. 2003.
- WANG, J., WEI, Q., WANG, C. Y., HILL, W. D., HESS, D. C., DONG, Z. Minocycline up-regulates Bcl-2 and protects against cell death in the mitochondria. **Journal of Biology Chemistry** **279**: 19948–19954. 2004.
- ZHANG, Y., DAWSON, V.L., DAWSON, T. M. Oxidative stress and genetics in the pathogenesis of Parkinson's disease. **Neurobiology Disease** **7**: 240–250. 2000.
- ZHU, S., STAVROVSKAYA, I. G., DROZDA, M., KIM, B. Y., ONA, V., LI, M. Minocycline inhibits cytochrome c release and delays progression of amyotrophic lateral sclerosis in mice. **Nature** **417 (6884)**: 74–78. 2002.