

SOLANGE CARVALHO DE SOUSA

Este exemplar corresponde à versão final da Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, para obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas, Área de Concentração em Ciências Biomédicas do(a) aluno(a) **Solange Carvalho de Sousa**.

Campinas, 18 de Agosto de 2004.


Prof(a). Dr(a). Roger Frigério Castilho
Orientador(a)

***ESTRESSE OXIDATIVO MITOCONDRIAL, MORTE
CELULAR E EFEITO DE LIGANTES DE IMUNOFILINAS EM
MODELOS PARA A DOENÇA DE PARKINSON***

CAMPINAS

2004

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
DESENVOLVIMENTO DE COLEÇÕES

SOLANGE CARVALHO DE SOUSA

***ESTRESSE OXIDATIVO MITOCONDRIAL, MORTE
CELULAR E EFEITO DE LIGANTES DE IMUNOFILINAS EM
MODELOS PARA A DOENÇA DE PARKINSON***

*Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas para
obtenção do título de Doutor em Ciências
Médicas, área de Ciências Biomédicas*

ORIENTADOR: PROF. DR. ROGER FRIGÉRIO CASTILHO

CAMPINAS

2004

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	UNICAMP
	5085e
V	EX
TOMBO, BC/	60607
PROC.	16.117.04
C	☐
D	☒
PREÇO	22,00
DATA	17.12.04
Nº CPD	

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

331414
biblio

So85e

Sousa, Solange Carvalho de

Estresse oxidativo mitocondrial, morte celular e efeito de ligantes de imunofilinas em modelos para a doença de parkinson / Solange Carvalho de Sousa. Campinas, SP : [s.n.], 2004.

Orientador : Roger Frigério Castilho

Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Mitocôndria. 2. Melatonina. 3. Cálcio. I. Roger Frigério Castilho. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

SLP

Banca examinadora da tese de Doutorado

Orientador(a): Prof. Dr. Roger Frigério Castilho

Membros:

1. Prof. Dr. Roger Frigério Castilho
 2. Profa. Dra. Soraya Soubhi Smaili
 3. Prof. Dr. Antônio Cardozo dos Santos
 4. Dra. Lília Freire Rodrigues de Souza Li
 5. Prof. Dr. Gilberto da Assunção Fernandes
 6. Profa. Dra. Carmen Silva Bertuzzo (Suplente)
-

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas.

Data: 18/08/2004

AGRADECIMENTOS AFETIVOS

Ao meu noivo Daniel, pela paciência e apoio sempre.

Por me dar entusiasmo e conforto nos momentos difíceis.

Por ter calma e me entender sempre.

Pela harmonia, segurança e pela paz.

Acima de tudo pelo

Amor absoluto.

Aos Meus Pais,

Pelo Amor, pelo Carinho

Dedicado e por me apoiarem SEMPRE.

Ao meus irmãos, Edwardo e Ewerton;

Especialmente à minha irmã

e amiga Soraya pelo exemplo

de determinação, força

e VITÓRIA!

Aos meus QUERIDOS sobrinhos,

Ricardo e Rhayssa, pelo exemplo

de Pureza, Amor, Alegria e ORGULHO.

A vocês, que são as pessoas mais

importantes de minha vida,

MUITO OBRIGADA.

Agradeço com respeito ao Prof. Dr. Roger F. Castilho, pela sólida orientação, exemplo de profissionalismo para com o desenvolvimento deste trabalho, pela contribuição para minha formação científica e pela amizade.

Ao Prof. Dr. Patrik Brundin, pela excelente hospitalidade em seu laboratório, proporcionando uma atmosfera de alegria e respeito; por se preocupar com meu bem-estar nos dias mais frios e cinzas do outono sueco, e pela amizade.

Ao Prof. Dr. Anibal Vercesi, pela agradável convivência diária, sempre com carinho e respeito.

À amiga Dra. Claudia Campos (Claudinha), pela GRANDE ajuda durante toda a minha tese, pelas sugestões enriquecedoras, por sempre ter uma palavra de carinho.

À Profa. Dra. Carmen Bertuzzo, pelo carinho desde quando eu cheguei à Campinas, como sua estagiária.

Às técnicas do laboratório de Bioenergética Elisangela (Li) e Edilene, em especial à Li pelo carinho e dedicação aos animais, pela agradável convivência e amizade.

Às técnicas do laboratório Neuronal Survival Birgit Haraldsson e Britt Lindberg, pela ajuda com os primeiros experimentos *in vivo* e também pelas deliciosas “apple pies”.

À amiga Laura Costa (Laurinha), pela contribuição nos experimentos com MAPK p38, pelo apoio, pelas inesquecíveis viagens de trem e pelos bons momentos de descontração.

Às amigas Mônica, Flávia, Tereza e Eugenia, pelo apoio, carinho, churrascos, risadas,enfim, por estarem sempre comigo.

Ao pessoal do Hemocentro (Flávia e Adriana), quando inúmeras vezes precisei congelar e descongelar minhas células PC12, ainda pelo gelo seco e pela atenção.

Ao Laboratório de Bioenergética.

Ao Prof. Dr. Kleber Franchini e aos técnicos Walquer e Hugo, pela inestimável ajuda com as imagens do Confocal.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo auxílio financeiro concedido para a realização deste trabalho (processo nº 00/10036-2).

A DEUS, por me prover de paz, saúde e sabedoria para vencer mais esta etapa.

O presente trabalho foi realizado nos Laboratórios de Metabolismo Energético em Neurodegeneração e de Bioenergética, Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental (NMCE), Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), e no Department of Physiological Sciences, Wallenberg Neuroscience Center, Universidade de Lund (Suécia), sob a orientação do Prof. Dr. Roger F. Castilho, na vigência dos auxílios concedidos pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo ao Ensino e Pesquisa da Universidade Estadual de Campinas (FAEP-UNICAMP).

*“Só é útil o conhecimento
que nos torna melhores”*

(Sócrates)

*“Devemos modelar nossas palavras até se
tornarem o mais fino invólucro
dos nossos pensamentos”*

(Clarice Lispector)

	<i>Pág.</i>
RESUMO	xxxiii
ABSTRACT	xxxvii
1 - INTRODUÇÃO	41
1.1 - Doença de Parkinson.....	43
1.2 - Etiologia da Doença de Parkinson.....	45
1.3 - Modelos Experimentais para a Doença de Parkinson.....	49
1.3.1 - Neurotoxinas.....	49
1.3.2 - Células modificadas.....	53
1.3.3 - Animais Transgênicos.....	53
1.4 - Metabolismo Energético e Homeostase Intracelular de Ca^{2+}	54
1.4.1 - Homeostase Intracelular de Ca^{2+}	54
1.4.2 - Transporte Mitocondrial de Ca^{2+} e Morte Celular.....	56
1.5 - Cadeia Respiratória Mitocondrial e Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs).....	57
1.6 - Mecanismos de Morte Celular e Expressão da Proteína Cinase Ativada por Mitógeno (MAPK) p38.....	58
1.6.1 - Apoptose e Necrose.....	58

1.6.2 - Expressão da Proteína Cinase Ativada por Mitógeno (MAPK) p38.....	63
1.7 - Estratégias Terapêuticas e Reposição Celular.....	64
2 - OBJETIVOS.....	67
3 - MÉTODOS E MATERIAIS.....	71
4 - RESULTADOS.....	87
4.1 - Estresse Oxidativo Mitocondrial Induzido por Rotenona e Ca^{2+}	89
4.2 - Estresse Oxidativo e Morte Celular Induzida por Rotenona e Ca^{2+}	97
4.3 - Estudo da Neurodegeneração Progressiva e Morte de Células Dopaminérgicas num Modelo <i>in vivo</i> para a Doença de Parkinson.....	103
4.4 - Efeito Neurotrófico de Ligantes de Imunofilinas em Neurônios Dopaminérgicos Embrionários Transplantados.....	110
5 - DISCUSSÃO.....	117
6 - CONCLUSÕES.....	129
7 - REFERÊNCIAS.....	133
8 - ANEXO.....	153
ANEXO I - Trabalho Publicado: " Ca^{2+} -induced oxidative stress in brain mitochondria treated with the respiratory chain inhibitor rotenone", autoria de Solange C. Sousa, Evelise N. Maciel, Anibal E. Vercesi e Roger F. Castilho. <i>FEBS Letters</i> 543: 179-183; 2003.....	155

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	adenosina 5'-difosfato
AIF	fator indutor de apoptose
ANOVA	análise de variância
ATP	adenosina 5'-trifosfato
BSA	albumina de soro bovino
CsA	ciclosporina A
DAT	transportadores de dopamina
DCF	diclorofluoresceína
DMSO	dimetilsulfóxido
EGTA	etileno glicol-bis(β -aminoetil éter)- <i>N,N,N',N'</i> -ácido tetracético
EROs	espécies reativas de oxigênio
ETF	flavoproteína transferidora de elétrons
FAD	flavina adenina dinucleotídeo
FCCP	dicarbonil-1,3,6-trifluorofenil-hidrazona
HBSS	solução salina balanceada de Hank
HEPES	ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfônico
H₂DCF	diclorodihidrofluoresceína
H₂DCF-DA	diacetado de H ₂ DCF

HO[•]	radical hidroxil
H₂O₂	peróxido de hidrogênio
MCR	mitocôndria de cérebro de rato
MFR	mitocôndria de fígado de rato
MMR	mitocôndria de músculo de rato
MPP⁺	1-metil-4-fenilpiridinium
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
NADH	nicotinamida adenina dinucleotídeo (estado reduzido)
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (estado reduzido)
NAD⁺	nicotinamida adenina dinucleotídeo (estado oxidado)
NADP⁺	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (estado oxidado)
NMDA	<i>N</i> -metil-D-aspartato
O₂^{•-}	radical ânion superóxido
PBS	tampão fosfato salínico
Pi	fosfato inorgânico
Rot	rotenona
Safranina	cloreto de 3,7-diamino-2,8-dimetil-5-fenifenazínio (C ₂₀ H ₁₉ CIN ₄)
SNC	sistema nervoso central
TBARS	substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
UCHL1	hidrolase L1 ubiquitina carboxi-terminal

	<i>Pág.</i>
Esquema 1 - Secções de cérebro humano que mostram conexões motoras que estão envolvidas na doença de Parkinson e ilustração do corpúsculo de Lewy.....	44
Esquema 2 - Esquema que sumariza processos que levam a degeneração nigro-estriatal na doença de Parkinson.....	49
Esquema 3 - Representação esquemática da ação de MPP ⁺ e rotenona no terminal sináptico.....	52
Esquema 4 - Esquema que representa duas vias distintas de morte celular por apoptose.....	62
Esquema 5 - Esquema que sumariza as etapas envolvidas durante a infusão intra-estriatal da neurotoxina 6-hidroxidopamina em ratos.....	78
Esquema 6 - Esquema que sumariza as etapas envolvidas na preparação de suspensão celular para transplante in vivo de células embrionárias dopaminérgicas.....	80
Esquema 7 - Modelo proposto para a morte de células neuronais promovida por inibição do complexo I mitocondrial substância negra e núcleos da rafe de cérebro de ratos adultos.....	123

	<i>Pág.</i>
Figura 1 - Ca^{2+} induz um aumento na detecção de EROs em mitocôndrias de cérebro de rato, tratadas com rotenona: efeito da concentração de rotenona e Ca^{2+}	91
Figura 2 - Rotenona e Ca^{2+} não aumentam a produção de EROs em mitocôndrias isoladas de fígado e de músculo de rato.....	92
Figura 3 - Inibição parcial da cadeia respiratória mitocondrial por rotenona resulta em estresse oxidativo na presença de Ca^{2+}	93
Figura 4 - Efeito de ciclosporina A, FCCP e inibidores da cadeia respiratória mitocondrial na produção mitocondrial de EROs estimulada por rotenona e Ca^{2+}	94
Figura 5 - Rotenona e Ca^{2+} induzem aumento na detecção de EROs, em mitocôndrias isoladas de cérebro de rato: Medidas de EROs a partir do uso de diferentes marcadores fluorescentes.....	95
Figura 6 - Rotenona e Ca^{2+} induzem formação de TBARS em mitocôndrias isoladas de cérebro de rato.....	96
Figura 7 - Efeito de cátions divalentes no aumento da produção mitocondrial de EROs estimulado por rotenona e Ca^{2+}	97
Figura 8 - Efeito de melatonina na liberação de EROs em MCR tratadas com rotenona e Ca^{2+}	98
Figura 9 - Estudo da interferência da melatonina na concentração de Ca^{2+} livre e consumo de O_2 mitocondrial.....	100
Figura 10 - Efeito da melatonina na liberação de LDH de células PC12 induzidas por rotenona e ionóforo de Ca^{2+} A23187.....	101
Figura 11 - Efeito de melatonina na liberação de EROs por células PC12 induzida por rotenona e ionóforo de Ca^{2+} A23187.....	102

Figura 12 - Fotomicrografia do mesencéfalo de um camundongo controle 3 semanas após a infusão intra-estriatal de 6-hidroxidopamina.....	104
Figura 13 - Degeneração de neurônios TH+ da substância negra <i>pars compacta</i> induzida pela injeção intraestriatal de 6-hidroxidopamina: comparação entre camundongos controles e <i>lpr</i>	104
Figura 14 - Secções de substância negra 6 dias após injeção intra-estriatal de 6-hidroxidopamina (26 µg) processadas por meio de imunohistoquímica para fosfo-MAPK p38.....	106
Figura 15 - Secção de mesencéfalo processada por meio de imuno-histoquímica para fosfo-MAPK p38, com o uso de um anticorpo primário monoclonal.....	107
Figura 16 - Marcação imunofluorescente para fosfo-MAPK p38 e TH na substância negra (A, B, C), núcleos da rafe (D, E, F) e corpo estriado (G, H, I) de cérebro de ratos adultos.....	108
Figura 17 - Dupla marcação imunofluorescente para fosfo-MAPK p38 e TH no corpo estriado de ratos após 30 dias de lesão por 6-hidroxidopamina.	109
Figura 18 - Tratamento crônico com FK506 ou ciclosporina A melhora a recuperação de ratos transplantados no teste de anfetamina.....	112
Figura 19 - Secções de corpo estriado obtidas 8 semanas após o implante de células dopaminérgicas embrionárias em ratos adultos previamente lesionados com 6-hidroxidopamina.....	113
Figura 20 - Tratamento crônico com FK506 ou ciclosporina A aumenta o número de neurônios TH+ nos transplantes de células.....	114
Figura 21 - Tratamento crônico com FK506, mas não com ciclosporina A, aumenta a densidade de fibras TH+ no corpo estriado que recebeu transplante de neurônios dopaminérgicos embrionários.....	115

RESUMO

Concentrações micromolares de Ca^{2+} ($>10 \mu\text{M}$) estimularam fortemente a liberação de espécies reativas de oxigênio (EROs) em mitocôndrias isoladas de cérebro de rato tratadas com rotenona. O estímulo proporcionado pelo Ca^{2+} na liberação de EROs foi associado à peroxidação lipídica de membrana e diretamente correlacionado ao grau de inibição do complexo I por rotenona. Entretanto, Ca^{2+} não estimulou o aumento da liberação mitocondrial de EROs na presença do inibidor do complexo I 1-metil-4-fenilpiridinium. Ciclosporina A não teve efeito na liberação mitocondrial de EROs, indicando que a permeabilidade mitocondrial transitória não está envolvida neste processo. O antioxidante natural melatonina inibiu o estresse oxidativo mitocondrial promovido por Ca^{2+} e rotenona em mitocôndrias isoladas de cérebro. Observou-se ainda que o ionóforo de Ca^{2+} A23187 potencializou a morte de células PC12 tratadas com rotenona, num mecanismo sensível à melatonina. A inibição da morte de células PC12 proporcionada por melatonina correlacionou-se com uma menor detecção de EROs em culturas de células PC12 nesta situação experimental. Sugere-se que a capacidade do Ca^{2+} induzir o estresse oxidativo mitocondrial em situações de inibição parcial do complexo I deve ser um importante fator na morte celular neuronal observada em desordens neurodegenerativas, como na doença de Parkinson.

A proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK) p38 participa na modulação da apoptose em vários tipos celulares. A ativação da MAPK p38 foi estudada por imunohistoquímica em secções de cérebro de rato após infusão intracerebral unilateral de 6-hidroxidopamina, o que resulta em animais com hemiparkinsonismo. Observou-se células fosfo-MAPK p38 positivas na substância negra bilateralmente, sem um aumento significativo ipsilateral à lesão por 6-hidroxidopamina. Também foi evidenciada marcação para fosfo-MAPK p38 na área tegumentar ventral, leminisco medial, substância cinzenta peri-aquedutal, corpo estriado e área dos núcleos da rafe, peripeduncular e geniculado. Conclui-se que a fosfo-MAPK p38 está amplamente expressa em regiões de cérebro de ratos e não está envolvida no processo de degeneração de neurônios dopaminérgicos induzida por 6-hidroxidopamina. Experimentos com camundongos mutantes, que apresentam o receptor Fas/CD95/APO-I inativo, mostraram que a ativação deste receptor não está envolvida na degeneração de neurônios dopaminérgicos induzida por 6-hidroxidopamina.

Ligantes de imunofilinas exercem um importante efeito neurotrófico em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*. Nossos resultados mostraram que o tratamento crônico de ratos adultos hemiparkinsonianos com FK506 e ciclosporina A apresenta a capacidade de aumentar o número de neurônios dopaminérgicos após a implantação intra-estriatal de tecido mesencefálico embrionário. Este resultado correlacionou-se com uma melhor recuperação dos ratos com hemiparkinsonismo em provas comportamentais.

ABSTRACT

Micromolar Ca^{2+} concentration ($>10 \mu\text{M}$) strongly stimulated the release of reactive oxygen species (ROS) in rotenone-treated isolated rat forebrain mitochondria. Ca^{2+} -stimulated mitochondrial ROS release was associated with membrane lipid peroxidation and was directly correlated with the degree of complex I inhibition by rotenone. However, Ca^{2+} did not increase mitochondrial ROS release in the presence of the complex I inhibitor 1-methyl-4-phenylpyridinium. Cyclosporin A had no effect on mitochondrial ROS release, indicating that mitochondrial permeability transition is not involved in this process. The natural antioxidant melatonin inhibits Ca^{2+} plus rotenone-induced oxidative stress in isolated rat brain mitochondria. In addition, the Ca^{2+} ionophore A23187 strongly potentiates rotenone-induced death of intact cultured pheochromocytoma (PC12) cells, in a mechanism sensitive to melatonin. Furthermore, melatonin inhibits the detection of ROS in PC12 cells treated with rotenone plus Ca^{2+} ionophore A23187. We hypothesized that Ca^{2+} -induced mitochondrial oxidative stress associated with partial inhibition of complex I may be an important factor in neuronal cell death observed in the neurodegenerative disorder Parkinson's disease.

The participation of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) p38 has recently been implicated in apoptosis modulation of several cell types. The activation of p38 MAPK was studied by immunohistochemistry in brain sections of control rats and also after intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine. Interestingly, the results demonstrated phospho-p38 MAPK positive cells in substantia nigra at both sides of the brain with no increase in the 6-hydroxydopamine injection side during degeneration of nigral neurons. Phospho-p38 MAPK cells were also present in the ventral tegmental area, medial lemniscus, raphe, interpeduncular, striatum and geniculate nucleus. These data suggest that phospho-p38 MAPK is highly expressed in brain regions and is not correlated to the death of dopaminergic neurons after *in vivo* insult with 6-hydroxydopamine. Moreover, mutant mice with inactive Fas/CD95/APO-I receptor showed that activation of this receptor is not required for 6-hydroxydopamine-induced degeneration of dopaminergic neurons.

Immunophilin ligands exert important neurotrophic effects. Our results demonstrated that chronic treatment of adult rats with FK506 or cyclosporin A increases the number of dopaminergic neurons after intrastriatal transplantation of ventral embryonic mesencephalic tissue. This result was in agreement with a better recovery of immunophilin ligands treated-rats in comportamental tests.

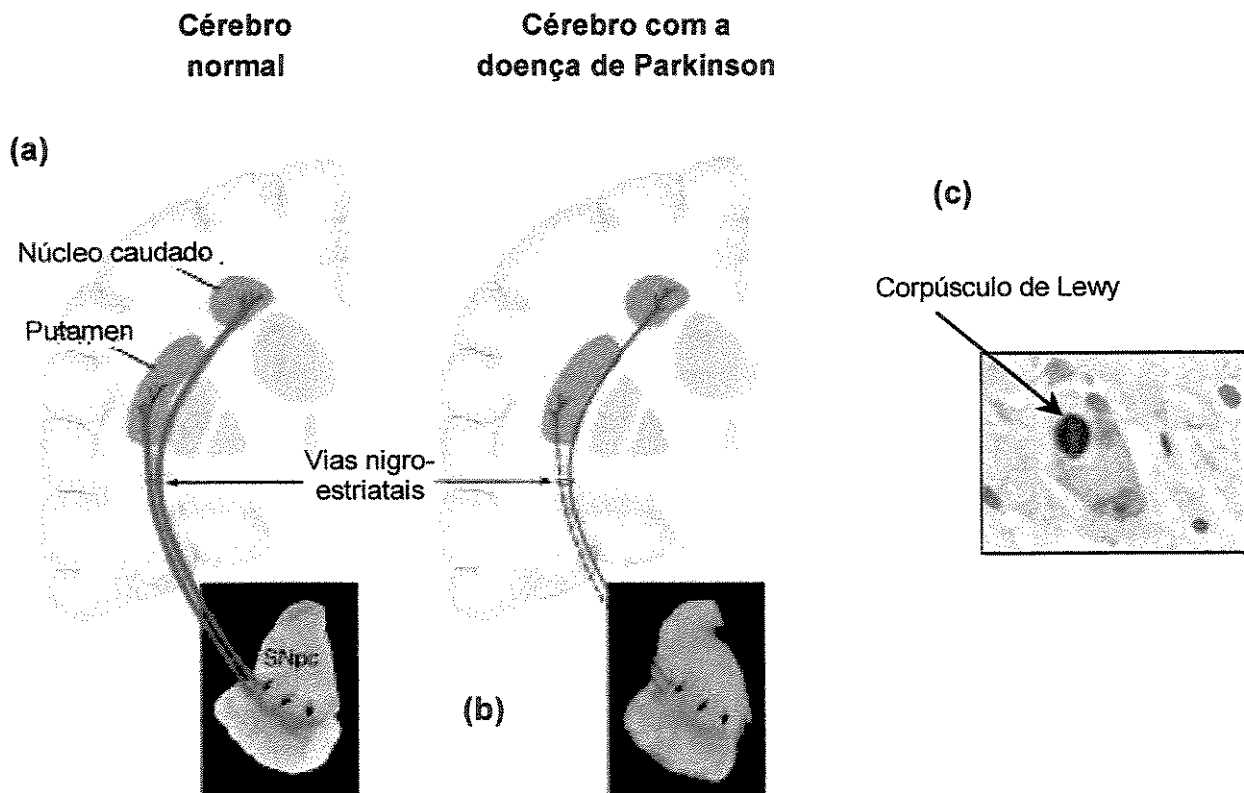
1 - INTRODUÇÃO

1.1 - DOENÇA DE PARKINSON

Anualmente, milhões de pessoas morrem ou passam a sofrer déficit neurológico permanente devido à progressiva neurodegeneração, representada principalmente pela perda de neurônios dopaminérgicos, na doença de Parkinson. Ainda não se estabeleceu nenhum tratamento farmacológico eficaz desta doença. Assim, faz-se necessária intensa pesquisa, para melhor entender os mecanismos moleculares e celulares que levam à disfunção ou morte de neurônios dopaminérgicos, bem como pesquisa com o intuito de propor novas abordagens farmacológicas para prevenir, bloquear ou retardar a neurodegeneração nesta patologia.

A doença de Parkinson é a segunda desordem neurológica mais comum após a doença de Alzheimer, com uma prevalência de aproximadamente 1% a 3% entre os idosos (LANG e LOZANO, 1998; DUNNETT e BJÖRKLUND, 1999). Descrita em 1817 por James Parkinson em “An Essay on the Shaking Palsy” (PARKINSON, 1817), é clinicamente caracterizada por bradicinesia, rigidez, tremor e instabilidade postural. Menos frequentemente, sintomas como disfunção autonômica ou demência são observados (LANG e LOZANO, 1998; DUNNETT e BJÖRKLUND, 1999; OLANOW e TATTON, 1999). Já os aspectos patológicos se caracterizam por uma degeneração progressiva do sistema dopaminérgico nigro-estriatal, apresentando perda aproximada de 70%-80% da inervação dopaminérgica estriatal e de 50% dos neurônios dopaminérgicos da substância negra, no início do aparecimento dos sintomas da doença (LANG e LOZANO, 1998a, b; OLANOW e TATTON, 1999) (ver **Esquema 1**). O parkinsonismo pode ser resultado de infecção viral (pós-encefalite), atrofia sistêmica múltipla, intoxicação - p. ex., 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), mutações em alguns genes ou trauma repetitivo, mas na maioria dos casos nenhuma causa clara pode ser encontrada e assim classifica-se como causa idiopática. A doença de Parkinson idiopática aparece ao redor de 55-65 anos. A característica patológica mais marcante da doença de Parkinson é a presença de inclusões citoplasmáticas hialinas esféricas de 5 a 25 µm de diâmetro, conhecidas como corpúsculo de Lewy, evidentes em neurônios dopaminérgicos da substância negra (FORNO et al., 1993; DUNNETT e BJÖRKLUND, 1999).

O tratamento mais utilizado para indivíduos com doença de Parkinson é a reposição de dopamina por meio do uso do precursor L-dopa. No entanto, este tratamento tem uma eficácia limitada e após alguns anos de uso podem aparecer vários efeitos colaterais como flutuações na resposta à medicação e discinesias (para revisão ver: LANG e LOZANO, 1998; DUNNETT e BJÖRKLUND, 1999). Várias terapias alternativas têm sido propostas para a doença de Parkinson como palidotomia ou talidotomia, estimulação cerebral e transplante de células dopaminérgicas (LINDVALL, 1997; LANG e LOZANO, 1998).



Esquema 1 - Secções de cérebro humano mostrando: (a) áreas que recebem inervação dopaminérgica (putâmen e núcleo caudado) proveniente de neurônios da substância negra; (b) região do mesencéfalo com substância negra; e (c) neurônio dopaminérgico da substância negra contendo corpúsculo de Lewy. Na doença de Parkinson ocorre perda de inervação dopaminérgica sobretudo no núcleo caudado e putâmen, e perda de neurônios dopaminérgicos na substância negra. Corpúsculos de Lewy são observados com grande freqüência em neurônios dopaminérgicos da substância negra na doença de Parkinson. Adaptado de Dauer e Przedborski, 2003.

1.2 - ETIOLOGIA DA DOENÇA DE PARKINSON

Apesar de intensa pesquisa sobre a etiologia da doença de Parkinson, até o momento pouco se sabe sobre os mecanismos que levariam à acentuada morte de neurônios dopaminérgicos. Trata-se de uma patologia multifatorial, com possível influência ambiental e envolvimento de fatores genéticos (DUNNETT e BJÖRKLUND, 1999).

Uma neurotoxina seletiva para neurônios dopaminérgicos, 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), foi descoberta acidentalmente no início dos anos 80. A neurotoxina MPTP, um inibidor do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial, foi produzida como contaminante na síntese ilícita do 1-metil-4-fenil-4-propionoxipiperidina (MPPP), um análogo do narcótico meperidine (Demerol), um tipo de heroína sintética. Constatou-se que jovens usuários deste lote de heroína apresentavam um quadro clínico que mimetizava os sintomas parkinsonianos (LANGSTON et al., 1983; BLOEN et al., 1990). A descoberta da habilidade seletiva do MPTP para induzir a morte preferencialmente de células da substância negra proporcionou um grande interesse em se estudar fatores ambientais, como toxinas, que estivessem envolvidas no desenvolvimento das síndromes parkinsonianas (BEN-SHOLMO, 1996).

A participação de estresse oxidativo na degeneração de neurônios dopaminérgicos da substância negra na doença de Parkinson pode estar diretamente relacionada à oxidação de dopamina, produzindo espécies reativas de oxigênio (EROs) como superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxil ($HO^{\bullet}$). Há ainda estudos em tecido cerebral *post-mortem*, obtido de pacientes com doença de Parkinson, indicando depleção de glutathione reduzida (GSH) e acúmulo de ferro na substância negra. A deficiência de glutathione reduzida diminuiria a capacidade das células dopaminérgicas de desintoxicar o H_2O_2 , enquanto o acúmulo de ferro promoveria a formação do radical hidroxil, que possui reatividade muito alta, podendo reagir com uma variedade de biomoléculas importantes para a manutenção da homeostase celular. De fato, lesões oxidativas foram identificadas em lipídios, proteínas e DNA em tecido obtido da substância negra de pacientes com doença de Parkinson (para revisão ver: JENNER e OLANOW, 1996).

A participação da disfunção mitocondrial na etiologia da doença de Parkinson é sugerida principalmente pela observação de uma inibição parcial (20% a 40%) da atividade do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial em tecido cerebral *post-mortem*, obtido de pacientes com doença de Parkinson (SCHAPIRA et al., 1989 e 1990) e também pela deficiência na atividade do complexo I da cadeia respiratória em tecidos periféricos de pacientes com a doença de Parkinson (MANN et al., 1992; BLIN et al., 1994). Uma inibição parcial do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial, além de comprometer a eficiência de produção de ATP pela fosforilação oxidativa (BARRIENTOS e MORAES, 1999), pode resultar em aumento da produção de superóxido mitocondrial com conseqüente morte celular (SKULACHEV, 1996; VOTYAKOVA e REYNOLDS, 2001; LIU, FISKUM e SCHUBERT, 2002). A importância da inibição do complexo I mitocondrial na fisiopatologia da doença de Parkinson é comprovada a partir de experimentos com tratamento sistêmico e crônico de roedores e primatas com inibidores específicos desse complexo, MPTP e rotenona, que induziram parkinsonismo nesses animais (BURNS et al., 1983; BLOEM et al., 1990; BETARBET et al., 2000).

A degeneração de neurônios dopaminérgicos na doença de Parkinson pode ainda estar relacionada à deficiência de algum fator neurotrófico no corpo estriado ou substância negra, como o fator neurotrófico derivado de células da glia (GDNF) (para revisão ver: KORSCHING, 1993; DUNNETT e BJÖRKLUND, 1999).

Em 1997, Polymeropoulos e colaboradores demonstraram a presença de componentes genéticos na forma autossômica dominante para a doença de Parkinson. Foi identificada, em uma família de origem grega e em uma família de origem italiana, uma mutação (A-para-G) no gene *PARK1*, localizado no braço curto do cromossomo 4 (4q21-23), que codifica a proteína α -sinucleína. Esta mutação resulta na troca de um aminoácido alanina por treonina na posição 53 (A53T) (POLYMEROPOULOS et al., 1997). KRUGER e colaboradores (1998) identificaram, em uma família de origem alemã, uma segunda mutação no gene *PARK1* que resulta em uma substituição de uma alanina por uma prolina (A30P) na posição 30 do aminoácido da α -sinucleína (KRUGER et al., 1998). Essas duas mutações estão relacionadas à forma autossômica dominante tardia da doença de Parkinson (POLYMEROPOULOS et al., 1997 e KRUGER et al., 1998). No entanto,

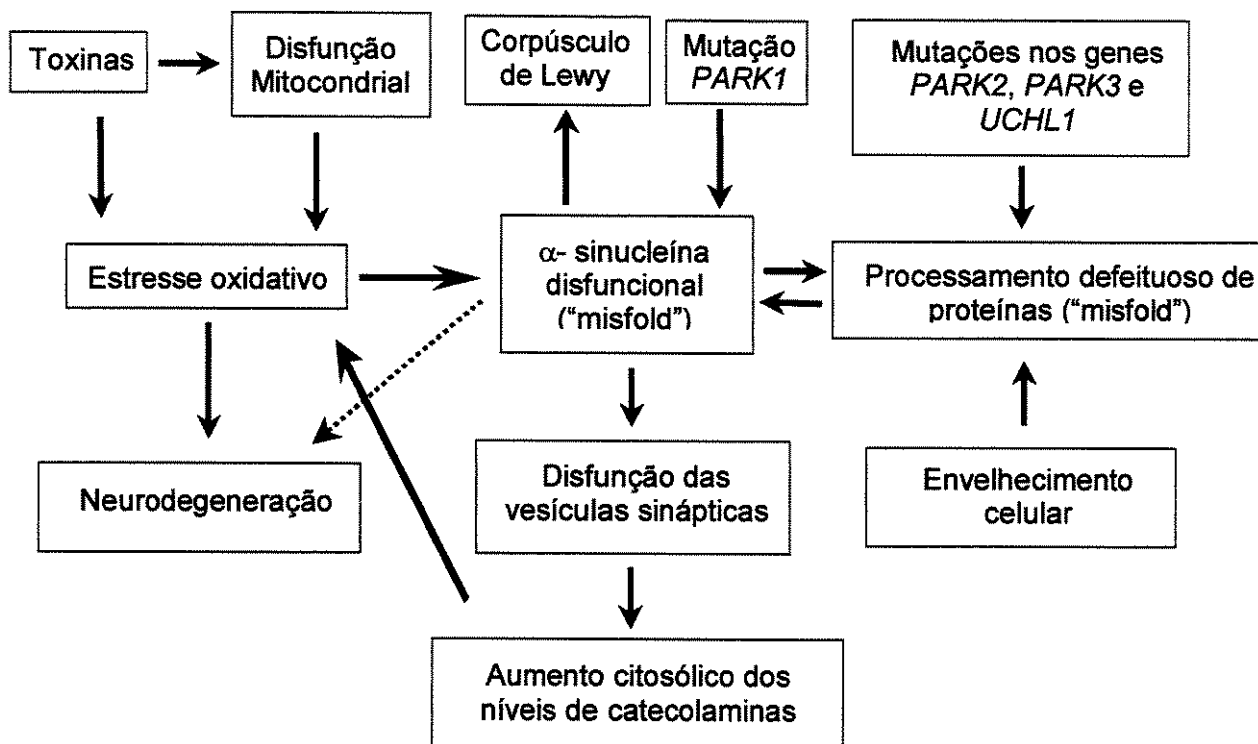
essas mutações não têm sido identificadas na forma idiopática da doença de Parkinson. A α -sinucleína é codificada principalmente no córtex cerebral, hipocampo, corpo estriado e mesencéfalo, estando presente nos terminais pré-sinápticos (MAROTEAUX, CAMPANELLI e SCHELLER, 1988). Os casos de doença de Parkinson com mutação no gene *PARK1* apresentam corpúsculo de Lewy em populações específicas de neurônios, bastante comuns na substância negra. Evidências experimentais indicam que a α -sinucleína mutada pode modificar a neurotransmissão dopaminérgica (ABELIOVICH et al., 2000; MURPHY et al., 2000; LOTHARIUS e BRUNDIN, 2002), alterando o número de vesículas sinápticas nos terminais nervosos. Enquanto a mutação A30P abole a capacidade da α -sinucleína de se ligar a pequenas vesículas de fosfolípidos, a mutação A53T compromete a capacidade da α -sinucleína de se associar à membranas lipídicas, regulando a formação de vesículas sinápticas originárias de endossomas (LOTHARIUS e BRUNDIN, 2002). Assim, essas mutações podem reduzir o estoque vesicular de dopamina, levando a um acúmulo de dopamina citoplasmática, resultando em estresse oxidativo devido à formação de EROs pela oxidação de dopamina no citoplasma (LOTHARIUS e BRUNDIN, 2002).

Um segundo gene, *PARK2*, foi identificado por meio de estudos de análise de ligação numa família japonesa que apresentava a doença de Parkinson na forma autossômica recessiva juvenil. O gene *PARK2* está localizado no braço curto do cromossomo 6 (6q25.2-27) e codifica a proteína parkin. Várias mutações no gene *PARK2*, relacionadas à doença de Parkinson foram identificadas (KITADA et al., 1998). A proteína parkin é uma ligase de ubiquitina, que está envolvida na degradação de proteínas danificadas pela via de proteassoma. Geralmente os indivíduos que possuem esta mutação apresentam degeneração de neurônios dopaminérgicos sem apresentar formação de corpúsculo de Lewy (KITADA et al., 1998).

Mais recentemente, LEROY e colaboradores identificaram uma mutação missense em um terceiro gene, *PARK5*, relacionada à forma autossômica dominante da doença de Parkinson. O gene *PARK5* codifica a proteína hidrolase L1 ubiquitina carboxi-terminal (UCHL1) (LEROY et al., 1998), a qual também está envolvida na degradação de proteínas defeituosas pela via de proteassoma.

Existe ainda uma outra mutação descrita relacionada à forma recessiva da doença de Parkinson, no gene *PARK7*; entretanto sua função não está totalmente elucidada (HEDRICH et al., 2004). Podemos citar ainda alguns *loci* adicionais com mutações relacionadas à doença de Parkinson: *PARK3* (2p13), *PARK4* (4p15-15), *PARK6* (1p35-36), *PARK8* (12p11.2-q13.1) (GRIMES e BULMAN, 2002).

O Esquema 2 sumariza os processos que podem levar à morte de neurônios dopaminérgicos na doença de Parkinson (LOTHARIUS e BRUNDIN, 2002). Mutações nos genes *PARK2*, *PARK3* e *UCHL1*, assim como o envelhecimento celular, ocasionam a produção excessiva de proteínas defeituosas, que não serão adequadamente processadas intracelularmente pelo sistema de proteassoma. Já a mutação no gene *PARK1* resultará na produção de α -sinucleína defeituosa. Proteínas defeituosas poderão se agregar e formar inclusões citoplasmáticas, conhecidas como corpúsculos de Lewy. Acredita-se que a formação de corpúsculos de Lewy reduza a toxicidade destas proteínas no citosol. Quando não agregadas no corpúsculo de Lewy, estas proteínas defeituosas poderão levar a disfunções intracelulares, com comprometimento da integridade de vesículas sinápticas dopaminérgicas e conseqüente liberação de dopamina no citosol. Uma vez no citosol, a dopamina sofrerá oxidação, com produção de EROs. As proteínas defeituosas também poderão desencadear a neurodegeneração diretamente. Algumas toxinas ambientais podem levar a uma situação de estresse oxidativo diretamente ou por meio da inibição do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial. Por fim, o estresse oxidativo pode levar à degeneração de neurônios dopaminérgicos, com o desenvolvimento da doença de Parkinson.



Esquema 2 - Esquema que sumariza processos que levam à degeneração nigro-estriatal na doença de Parkinson. Na degeneração de neurônios dopaminérgicos na doença de Parkinson propõem-se a participação de aumento dos níveis citoplasmáticos de dopamina, envelhecimento celular, mutações genéticas, proteínas defeituosas, toxinas, disfunção mitocondrial e estresse oxidativo. Esquema adaptado de LOTHARIUS e BRUNDIN, 2002.

1.3 - MODELOS EXPERIMENTAIS PARA A DOENÇA DE PARKINSON

1.3.1 - Neurotoxinas

A grande necessidade de entender a etiologia e a neuropatologia da doença de Parkinson, assim como de se propor novas intervenções farmacológicas, tem proporcionado intensos esforços para se estabelecer modelos experimentais que simulem a patogênese dessa desordem neurológica.

A primeira neurotoxina a ser utilizada como modelo experimental para doença de Parkinson foi a 6-hidroxidopamina, um análogo da noradrenalina e da dopamina, inicialmente descoberta por induzir uma forte e seletiva degeneração nas terminações nervosas simpáticas, simulando os sintomas parkinsonianos (TRANZER e THOENEN, 1967). A injeção de 6-hidroxidopamina diretamente no cérebro de roedores e primatas pode induzir uma perda seletiva de neurônios dopaminérgicos, simulando os sintomas evidenciados na doença de Parkinson (DUNNETT e BJÖRKLUND, 1999).

Estudos mostram que a 6-hidroxidopamina é captada pelos neurônios através dos transportadores de dopamina (DAT) presentes na membrana plasmática das terminações nervosas dopaminérgicas pré- e pós-sinápticas. Posteriormente esta neurotoxina é oxidada a 6-hidroxidopamina-quinona produzindo EROs como o superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxil ($HO^{\bullet}$) (GRAHAM et al., 1978), que poderão lesar membranas, lipídios, proteínas e DNA. Inicialmente a lesão ocorre nos axônios de neurônios dopaminérgicos no corpo estriado. A perda destes axônios levaria a uma situação de axotomia química, na qual os neurônios dopaminérgicos ficariam privados de fatores neurotróficos presentes no corpo estriado, o que pode ativar cascatas de reações intracelulares, resultando na morte celular (DUNNETT e BJÖRKLUND, 1999). Esta toxina tem sido predominantemente utilizada para produzir lesões unilaterais com depleção de dopamina, i.e., hemiparkinsonismo, as quais podem ser verificadas pelo exame comportamental de coordenação motora em resposta à anfetamina ou à apomorfina (UNGERSTEDT, 1968).

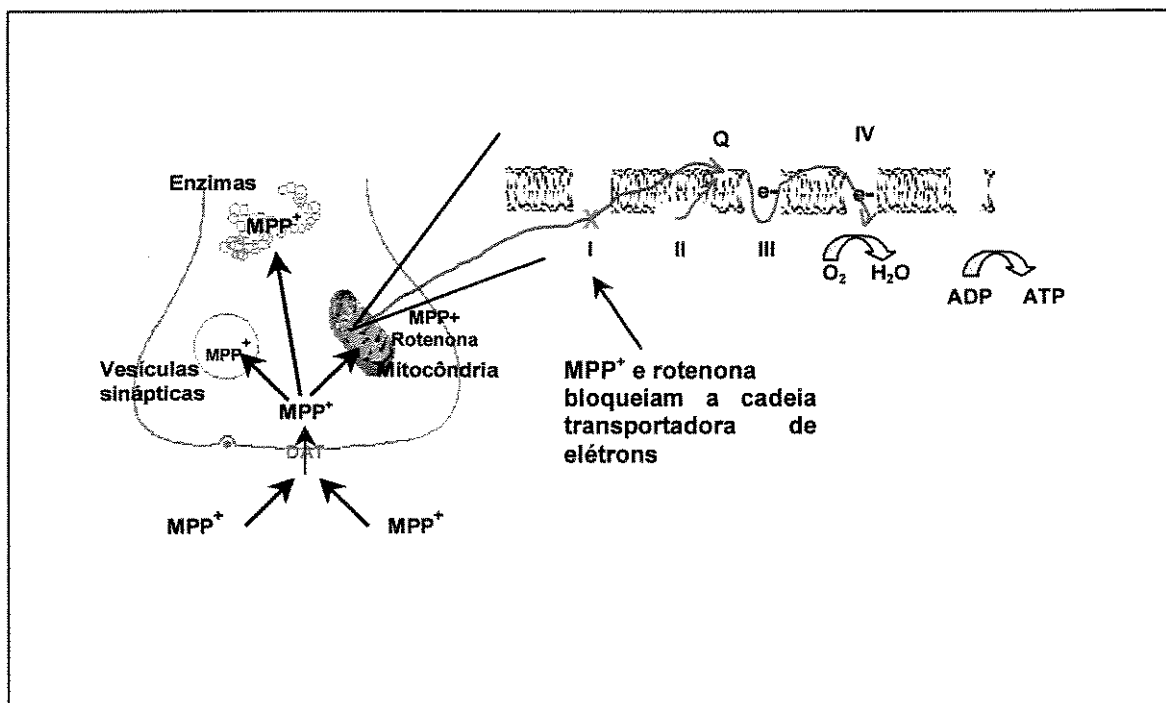
Uma segunda neurotoxina dopaminérgica é o MPTP (ver INTRODUÇÃO, item 1.2). Esta toxina tornou-se um modelo clássico para se estudar os mecanismos celulares presentes nos processos neurodegenerativos na doença de Parkinson. A toxicidade do MPTP em primatas reproduz grande parte dos sintomas da doença de Parkinson incluindo tremor, rigidez, bradicinesia e instabilidade postural (BURNS et al., 1983; BLOEM et al., 1990). O MPTP é uma molécula lipofílica que tem a capacidade de cruzar facilmente a barreira hematoencefálica e o seu mecanismo de ação dá-se a partir da conversão, ao seu metabólito ativo 1-metil-4-fenilpiridinium (MPP^+), pela monoamina oxidase B presente em células da glia e neurônios serotoninérgicos. O MPP^+ é captado pelos transportadores de dopamina (DAT) das células dopaminérgicas (para revisão ver: ZHANG et al., 2000). O

mecanismo de ação do MPTP - ou de seu metabólito 1-metil-4-fenilpiridinium (MPP^+) na indução da morte de neurônios dopaminérgicos é menos claro. O MPP^+ inibe o complexo I da cadeia respiratória mitocondrial com conseqüente inibição da oxidação de NADH, e eventual limitação da produção de ATP pela mitocôndria (BARRIENTOS e MORAES, 1999). A inibição do complexo I mitocondrial também aumenta o vazamento de elétrons com estímulo da formação de superóxido ($O_2^{\bullet-}$) (SKULACHEV, 1996; LIU, FISKUM e SCHUBERT, 2002; VOTYAKOVA e REYNOLDS, 2001). Estes fatores podem ter participação na cascata de eventos deletérios que levam à morte de neurônios dopaminérgicos após administração do MPTP (PREZEDBORSKI e JACKSON-LEWIS, 1998) (ver **Esquema 3**). Embora ambas as toxinas (6-OHDA e MPTP/ MPP^+) induzam o estresse oxidativo, há evidências obtidas em experimentos em culturas de células de que possam induzir a morte de neurônios dopaminérgicos por mecanismos distintos (PREZEDBORSKI e JACKSON-LEWIS, 1998; LOTHARIUS et al., 1999).

O herbicida Paraquat (N,N'-dimetil-4,4'-bipiridinium), que apresenta estrutura química similar à neurotoxina MPP^+ , também pode induzir sintomas parkinsonianos, sendo assim utilizado como modelo experimental para doença de Parkinson (DAY et al., 1999). A toxicidade do Paraquat parece ser mediada pela formação de superóxido (DAY et al., 1999). A sua administração sistêmica em camundongos pode levar à neurodegeneração dos neurônios dopaminérgicos na substância negra *pars compacta*, acompanhada de formações de agregados protéicos de α -sinucleína (MANNING-BOG et al., 2002).

BETARBET e colaboradores (2000) descreveram recentemente um modelo experimental para a doença de Parkinson a partir da administração sistêmica em roedores de uma quarta neurotoxina, a rotenona (**Esquema 3**), um clássico inibidor não competitivo do complexo I (NADH-coenzima Q redutase) da cadeia respiratória mitocondrial. A rotenona é classificada como um inibidor do tipo B do complexo I mitocondrial, por bloquear a redução do intermediário semiquinona dentro do complexo (DEGLI ESPOSTI, 1998). A rotenona é o mais potente membro dos rotenóides, uma família de isoflavonóides extraídos de plantas *Leguminosae* tropicais, bastante utilizados como inseticidas e veneno para pesca (DEGLI ESPOSTI, 1998). Devido à sua característica

extremamente hidrofóbica, ela atravessa facilmente as membranas biológicas sem a necessidade de um transportador (DAT), como acontece com o MPP^+ , para chegar ao citoplasma e inibir a respiração mitocondrial diretamente no complexo I. Constatou-se que a administração crônica, por via subcutânea, de rotenona a ratos reproduz alterações anatômicas, neuroquímicas e neuropatológicas presentes na doença de Parkinson (BETARBET et al., 2000). No entanto, LAPOINTE et al. (2004) observaram toxicidade sistêmica em ratos tratados cronicamente com rotenona.



Esquema 3 - Representação esquemática da ação de MPP^+ e rotenona no terminal sináptico. O MPP^+ entra em neurônios dopaminérgicos pelo transportador de dopamina (DAT). Uma vez no meio intracelular o MPP^+ , pode seguir 3 vias de atuação: (a) atravessar a membrana mitocondrial e bloquear o transporte de elétrons do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial, (b) interagir com enzimas citosólicas, (c) entrar em vesículas sinápticas, através de transportadores vesiculares de monoamina. Já a rotenona atravessa as membranas plasmática e mitocondrial e interrompe a transferência de elétrons do complexo I mitocondrial para a coenzima Q. A inibição do complexo I mitocondrial leva à produção de EROs e à diminuição da síntese de ATP. Adaptado de DAUER e PRZEDBORSKI, 2003.

1.3.2 - Células modificadas

Paralelamente aos modelos de neurotoxinas, vários outros modelos têm sido estabelecidos para se estudar a doença de Parkinson, assim como células modificadas e animais transgênicos que expressam proteínas mutadas relacionadas à forma familiar da doença de Parkinson.

Um modelo bastante utilizado é a linhagem celular PC12, derivada de feocromocitoma de rato, a qual tem a capacidade de sintetizar e secretar dopamina e de se diferenciar para um fenótipo neuronal quando tratada com o fator neurotrófico NGF (nerve growth factor) (TAKASHIMA e KOIKE, 1985). TANAKA e colaboradores (2001) criaram um modelo experimental com a linhagem celular PC12, expressando de maneira induzida a proteína α -sinucleína selvagem e com a mutação A30P (TANAKA et al., 2001). Esta linhagem foi estabelecida utilizando-se o sistema de expressão gênica Tet-Off; cuja regulação é obtida através de um transativador controlado por tetraciclina. Desta maneira, as células expressam o transgene na ausência de doxiciclina (condição induzida), e não o expressam na presença de doxiciclina. Utilizando esta linhagem celular, foi mostrado ainda um importante envolvimento da via de proteassoma na lesão celular provocada pela forma mutada A30P pela α -sinucleína (TANAKA et al., 2001). Outras linhagens de células que superexpressam α -sinucleína na sua forma selvagem (LOTHARIUS e BRUNDIN, 2002) e com as mutações A30P e A53T (LEE et al., 2002; STEFANIS et al., 2001; WEBB et al., 2003) também têm sido estudadas para se estabelecer mecanismos bioquímicos envolvidos na morte celular na doença de Parkinson.

1.3.3 - Animais Transgênicos

Como modelos de animais transgênicos para a doença de Parkinson, são utilizados principalmente *Drosophila sp* e camundongos. O modelo de *Drosophila sp* foi estabelecido por FEANY e BENDER (2000) com a superexpressão de α -sinucleína selvagem e com as mutações A30P e A53S. O modelo da *Drosophila sp* evidenciou três aspectos básicos da doença de Parkinson: início tardio, depleção preferencialmente de

células dopaminérgicas e produção de agregados citoplasmáticos de α -sinucleína. Estas alterações, assim como neurodegeneração e perda prematura da habilidade de voar, foram observadas nas três linhagens de *Drosophila* (FEANY e BENDER, 2000).

Estudos com camundongos transgênicos têm sido focados na proteína α -sinucleína (DAUER e PRZEDBORSKI, 2003). Múltiplas linhagens de camundongos transgênicos que superexpressam α -sinucleína humana normal e mutada (A30P e A53T) já foram estabelecidas. Para revisão sobre os diferentes modelos de animais transgênicos já estabelecidos, sobre a neuropatologia observada e déficits motores apresentados, ver LOTHARIUS e BRUNDIN (2002) e DAUER e PRZEDBORSKI (2003). De uma maneira geral, os estudos têm mostrado que a expressão de α -sinucleína mutada leva à neurotoxicidade, no entanto a supressão da expressão de α -sinucleína não está associada com neuropatologia. Notadamente, os camundongos transgênicos para α -sinucleína, na forma mutata, não têm mostrado uma degeneração específica de neurônios dopaminérgicos, embora haja evidências de atrofia neuronal, distrofia de axônios, astrocitose e acúmulo intracelular de corpúsculos que contêm α -sinucleína (MATSUOKA et al., 2001; GIASSEN et al., 2002; LEE et al., 2002). Uma das linhagens de camundongos que expressam a mutação humana α -sinucleína A53T desenvolveu neurodegeneração de início tardio com disfunção motora progressiva e morte, bem como acumulações patológicas de α -sinucleína (LEE et al., 2002).

1.4 - METABOLISMO ENERGÉTICO E HOMEOSTASE INTRACELULAR DE Ca^{2+}

1.4.1 - Homeostase Intracelular de Ca^{2+}

O íon cálcio (Ca^{2+}) é um importante segundo mensageiro em várias células, incluindo os neurônios. Alterações transitórias das concentrações intracelular de Ca^{2+} estão relacionadas com a transmissão de sinais extracelulares, regulando o metabolismo mitocondrial, a síntese protéica, a fosforilação e a expressão de genes (CARAFOLI, 1987; CLAPHAM, 1995; ORRENIUS, ZHIVOTOVSKY e NICOTERA,

2003). Nos neurônios a concentração de Ca^{2+} livre no citosol é de aproximadamente 0,1 μM , mantida cerca de 10.000 vezes abaixo da concentração extracelular (aproximadamente 1,3 mM) (CARAFOLI, 1987; CLAPHAM, 1995). Este alto gradiente eletroquímico de Ca^{2+} entre os meios intra e extracelulares é essencial para a sua função como carregador de sinais bioquímicos para o interior das células. A distribuição do Ca^{2+} intracelular é controlada por processos de transporte do íon através da membrana plasmática e das membranas de organelas subcelulares, como o retículo endo(sarco)plasmático, núcleo e mitocôndria (GUNTER e GUNTER, 1994; ORRENIUS et al., 2003). Notadamente, TYMIANSKY et al., 1993, evidenciaram que o influxo celular de Ca^{2+} através de canais dependentes de voltagem não apresenta toxicidade a neurônios, porém o influxo de Ca^{2+} através de receptores *N*-metil-D-aspartato pode resultar em morte neuronal. O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central e atua via *N*-metil-D-aspartato.

No retículo(sarco)endoplasmático a entrada de Ca^{2+} é catalisada por uma Ca^{2+} -ATPase, que transloca dois Ca^{2+} para cada ATP hidrolisado (DE MEIS e VIANNA, 1979). O efluxo de Ca^{2+} se dá por um canal estimulado por inositol trifosfato (IP_3) (BERRIDGE, 1993) e cafeína (receptor de rianodina) (SORRENTINO e VOLPE, 1993). A alta afinidade da Ca^{2+} -ATPase ao cátion confere ao retículo um importante papel na regulação da concentração de Ca^{2+} livre no citosol.

O influxo de Ca^{2+} mitocondrial ocorre por um processo eletroforético, em resposta ao potencial elétrico gerado pela membrana interna (negativo internamente) devido à atividade da cadeia respiratória ou hidrólise de ATP (GUNTER e GUNTER, 1994). Existem dois mecanismos de efluxo de íons Ca^{2+} : O dependente de íon sódio (Na^+), ocorre através do antiporter $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (troca um Ca^{2+} por um Na^+), neste mecanismo existe perda de energia, que é restaurada pelo gradiente eletroquímico gerado pela cadeia transportadora de elétrons; e o independente de Na^+ que ocorre através do antiporter $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ (troca um Ca^{2+} por dois H^+). A principal função do Ca^{2+} na matriz mitocondrial é, provavelmente, o estímulo da atividade de enzimas regulatórias do Ciclo do Ácido Cítrico (desidrogenases pirúvica, cetoglutarica e isocítrica).

1.4.2 - Transporte Mitochondrial de Ca^{2+} e Morte Celular

A mitocôndria é a principal organela responsável por sequestrar Ca^{2+} quando a concentração citosólica deste íon excede 0,3-0,5 μM , como o que ocorre na hiperativação de receptores *N*-metil-D-aspartato (NICHOLLS e BUDD, 2000). Entretanto, isto não é um processo isento de problemas, uma vez que o acúmulo excessivo de Ca^{2+} na matriz mitocondrial pode interferir na produção mitocondrial de ATP (para revisão ver: GUNTER e PFEIFFER, 1990; NICHOLLS e BUDD, 2000). Mitocôndrias carregadas de Ca^{2+} podem apresentar um aumento na produção de EROs e permeabilidade mitocondrial transitória (para revisão ver: GUNTER e PFEIFFER, 1990; KOWALTOWSKI et al., 2001). Este fenômeno é caracterizado por uma permeabilização da membrana mitocondrial interna para íons, suporte osmótico e pequenas proteínas (< 1500 Da) (GUNTER e PFEIFFER, 1990; ZORATTI e SZABÒ, 1995; KOWALTOWSKI et al., 2001). A permeabilidade mitocondrial transitória é seguida por inchamento mitocondrial e disfunção mitocondrial irreversível.

Estudos recentes mostraram que a permeabilidade mitocondrial transitória é um importante evento na morte celular por necrose e apoptose em diversos modelos experimentais (para revisão ver: GREEN e REED, 1998; KOWALTOWSKI, CASTILHO e VERCESI, 2001; SMAILI et al., 2003). É proposto que a permeabilidade mitocondrial transitória resulte na liberação de fatores pró-apoptóticos mitocondriais após o inchamento mitocondrial e conseqüente ruptura da membrana externa (GREEN e REED, 1998). Até o momento, alguns desses fatores estão bem caracterizados: citocromo *c*, pró-caspase 9, Fator Indutor de Apoptose (AIF) e Smac/Diablo. O citocromo *c*, um componente da cadeia respiratória, está presente na face externa da membrana mitocondrial interna e é responsável pela formação do apoptossomo no citosol, com conseqüente ativação de caspase-9 e caspase-3, as quais estão envolvidas na morte celular por apoptose (LIU et al., 1996; GREEN e REED, 1998; RAVAGNAN, ROUMIER e KROEMER, 2002).

1.5 - CADEIA RESPIRATÓRIA MITOCONDRIAL E PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROs)

Em organismos aeróbicos, os metabolismos de carboidratos, lipídios e aminoácidos convergem para uma etapa final que envolve a doação dos elétrons removidos desses nutrientes para o oxigênio. Este processo ocorre na cadeia de transporte de elétrons (cadeia respiratória) mitocondrial, gerando água e liberando energia. A energia liberada é conservada primeiramente na forma de um gradiente transmembrana de prótons e, posteriormente, na forma de ATP, sintetizado via fosforilação oxidativa (MITCHELL, 1966), a principal fonte de compostos fosfatados ricos em energia dos organismos aeróbicos. O ATP formado pela fosforilação oxidativa é essencial para a manutenção de atividades celulares dependentes de energia, como a contração muscular, formação de impulsos nervosos, transporte iônico e síntese de macromoléculas. Deste modo, não é surpreendente que falhas do metabolismo energético mitocondrial estejam associadas à morte celular por causas diversas, incluindo infarto cardíaco, acidente vascular cerebral, doenças de Parkinson, Huntington e Alzheimer (para revisão, veja BEAL, 1992). Por outro lado, alterações do metabolismo energético podem promover a falha de eliminação de células indesejadas ou seu crescimento desordenado, levando ao desenvolvimento de tumores e doenças auto-imunes (ARCH e THOMPSON, 1999).

A produção de EROs por mitocôndrias é um evento fisiológico e contínuo em condições aeróbicas. Apesar de o funcionamento da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial ter um importante papel na síntese de ATP, por meio do potencial eletroquímico de prótons gerado, a cadeia respiratória mitocondrial produz constantemente EROs. O radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) é gerado principalmente pela NADH desidrogenase (Complexo I) e pela coenzima Q/complexo III (BOVERIS e CHANCE, 1973; TURRENS e BOVERIS, 1980). A produção de $O_2^{\bullet-}$, no nível do complexo I, pode ser promovida pela presença de substratos respiratórios que geram NADH, como o malato, o glutamato e o piruvato (TURRENS e BOVERIS, 1980), e estimulada por rotenona, um inibidor da transferência de elétrons entre o complexo I (SKULACHEV, 1996; LIU, VOTYAKOVA e REYNOLDS, 2001; FISKUM e SCHUBERT, 2002). A coenzima Q também promove a geração de $O_2^{\bullet-}$ pelo complexo I e a coenzima Q (TURRENS, 1997). O vazamento de elétrons, no nível da coenzima Q/complexo III, é estimulado por succinato, cianeto e

antimicina A (BOVERIS et al., 1973; TURRENS, 1997; KOWALTOWSKI, NETTO e VERCESI, 1998). O efeito estimulatório da antimicina A é relacionado ao acúmulo de radicais semiquinona, formados na face citosólica da membrana mitocondrial interna. O mixotiazol, um inibidor do complexo III mitocondrial, bloqueia a formação de radicais semiquinona na face citosólica da membrana interna mitocondrial, prevenindo a geração de radicais $O_2^{\bullet-}$ (TURRENS, 1997; KOWALTOWSKI, NETTO e VERCESI, 1998). Em condições normais, o $O_2^{\bullet-}$ é transformado em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela ação da superóxido dismutase (SOD). O H_2O_2 é reduzido a H_2O pela glutathione peroxidase ou tioredoxina peroxidase, consumindo glutathione reduzida (GSH) ou tioredoxina, respectivamente, as quais são mantidas neste estado pela glutathione redutase e tioredoxina redutase, que utilizam NADPH. Assim, a mitocôndria possui um sistema antioxidante eficiente composto por GSH, SOD, NADPH, glutathione peroxidase (GPx), tioredoxina peroxidase, glutathione redutase (GRd) e tioredoxina redutase, além de vitaminas C e E (KOWALTOWSKI e VERCESI, 1999; GUTTERIDGE e HALLIWELL, 2000).

O Ca^{2+} pode estimular a geração de espécies reativas de oxigênio pela mitocôndria (KOWALTOWSKI, CASTILHO e VERCESI, 2001). O Ca^{2+} intramitocondrial liga-se à cardiolipinas na face interna da membrana mitocondrial interna, causando alterações ultraestruturais da cadeia respiratória mitocondrial que facilitam a produção de $O_2^{\bullet-}$ e, conseqüentemente, de H_2O_2 (GRIJALBA et al., 1999). As cardiolipinas possuem cabeça polar eletronegativa e estão presentes em altas concentrações na membrana mitocondrial interna. Simultaneamente, o Ca^{2+} mobiliza o Fe^{2+} na matriz mitocondrial, o que estimula a reação de Fenton e a produção do radical hidroxil ($HO^{\bullet}$), que ataca tióis de proteínas, lipídios e DNA mitocondrial (CASTILHO et al., 1995; VERCESI et al., 1997).

1.6 - MECANISMOS DE MORTE CELULAR E EXPRESSÃO DA PROTEÍNA CINASE ATIVADA POR MITÓGENO (MAPK) p38

1.6.1 - Apoptose e Necrose

A morte celular pode ocorrer por apoptose ou necrose, embora existam processos intermediários (PETTMANN e HENDERSON, 1998). A apoptose pode ser definida como uma morte celular programada, em que há participação ativa de enzimas

celulares endógenas, com destaque para um grupo de proteases denominadas caspases (PETTMANN e HENDERSON, 1998). Este processo é caracterizado por eventos morfológicos clássicos, incluindo redução do volume celular, fragmentação e condensação da cromatina, com manutenção inicial da integridade da membrana plasmática e da função de organelas (BREDESEN, 1995; LEIST e NICOTERA, 1998; ORRENIUS, ZHIVOTOVSKY e NICOTERA, 2003). Em seguida, ocorre o empacotamento de constituintes celulares em corpos apoptóticos, que serão fagocitados sem que ocorra importante reação inflamatória (KERR, WYLLIE e CURRIE, 1972; WYLLIE, KERR e CURRIE, 1980; MATTSON et al., 2000). A apoptose ocorre naturalmente durante o desenvolvimento do sistema nervoso, sendo um processo dependente de energia, com o envolvimento de organelas celulares internas, como a mitocôndria e o retículo endoplasmático. Este evento de morte também é implicado em processos de isquemia e em muitas doenças neurodegenerativas, como a doença de Parkinson (JELLINGER, 2002; FRIEDLANDER, 2003). A necrose celular é caracterizada por perda de homeostase iônica seguida de inchamento celular, perda de energia e quebra aleatória de DNA e conteúdos celulares. Ocorre também lise da membrana celular e liberação de constituintes intracelulares citosólicos, com freqüente evocação de reações inflamatórias, causando infiltração celular local, dano vascular, edema, perda de síntese protéica e deterioração de tecidos locais (WYLLIE, KERR e CURRIE, 1980; LEIST e NICOTERA, 1998; MATTSSON, 2000). Muitas das peculiaridades destes dois processos de morte celular, apoptose e necrose, foi inicialmente abordada em células carcinogênicas e posteriormente validada pelo estudo de células neuronais (KERR, WYLLIE e CURRIE, 1972; WYLLIE, KERR e CURRIE, 1980; PETTMANN e HENDERSON, 1998; LEIST e JÄÄTTELÄ, 2001). É sabido, ainda, que a apoptose e a necrose ocorrem nas injúrias neuronais, podendo ser ativadas simultaneamente num mesmo neurônio (NICOTERA e LIPTON, 1999; LEIST e JÄÄTTELÄ, 2001).

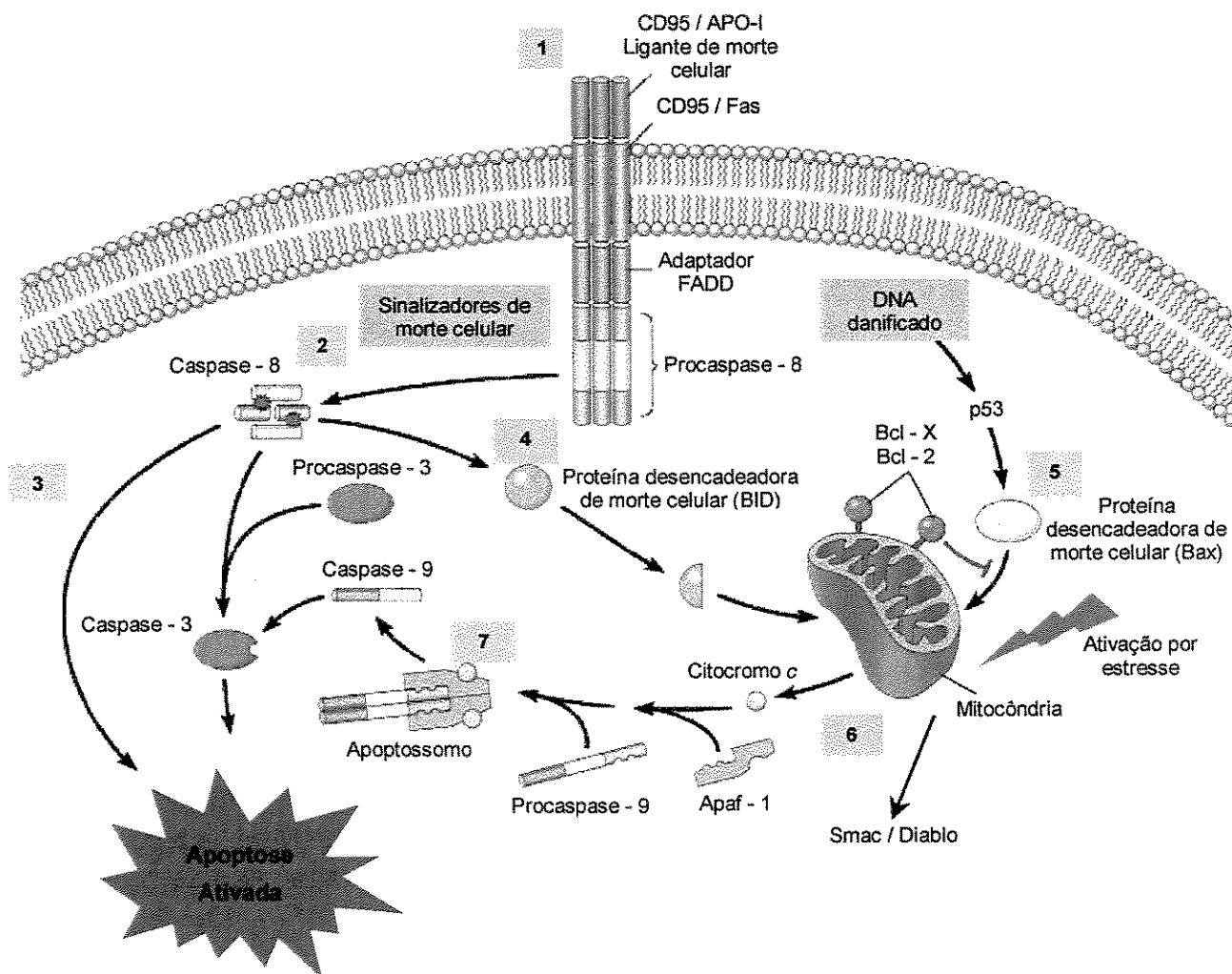
Dentre os processos de morte celular, caracterizou-se também a morte celular autofágica, uma segunda forma de morte programada, ativa, observada também em distúrbios neurodegenerativos, como nas doenças de Alzheimer e Huntington e isquemia cerebral (CATALDO et al., 1995; ANGLADE et al., 1997; LIPTON, 1999; KEGEL et al., 2000). Neste processo, ocorre a formação de um vacúolo de membrana dupla, o

autofagossoma, originado no retículo endoplasmático, que pode ter a capacidade de se fundir com lisossomos, endossomos ou complexo de Golgi e formar um outro vacúolo conhecido como autolisossomo (DUNN, 1994; KLIONSKY e EMR, 2000; OHSUMI, 2001). Este vacúolo de autolisossomo tem a capacidade de degradar partes do citoplasma e organelas em etapas que geralmente precedem a degradação nuclear neste tipo de morte celular (BURSCH et al., 2000).

A apoptose é coordenada por um conjunto de proteases conhecidas como caspases (THORNBERRY e LAZEBNIK, 1998; ZIMMERMANN et al., 2001) que são sintetizadas como precursores inativos que, quando ativadas, clivam substratos intracelulares ativando outras caspases, resultando em uma cascata de eventos que levam à morte celular (THORNBERRY e LAZEBNIK, 1998; WOLF e GREEN, 1999). As caspases envolvidas na apoptose podem ser divididas em caspases que iniciam a cascata, caspases-8 e -9, e em caspases que executam a destruição das células, incluindo as caspases-3, -6 e -7 (THORNBERRY e LAZEBNIK, 1998). Várias proteínas podem regular a ativação destas caspases, sendo que um número grande dessas proteínas tem localização ou interação mitocondrial (RAVAGNAN, ROUMIER e KROEMER, 2002). A iniciação da cascata de caspases pode ocorrer por duas vias principais (**Esquema 4**). Na primeira, através de uma via dependente de fatores mitocondriais, conhecida como via intrínseca. Proteínas da família do Bcl-2 como Bax, Bad, Bak e Bid são mobilizadas ou ativadas e promovem a formação de poros na membrana mitocondrial externa. Através destes poros há a liberação de fatores pró-apoptóticos do espaço intermembranas mitocondrial para o citosol, como o citocromo *c*, Fator Indutor de Apoptose (AIF) e pró-caspases. Na segunda via, a via extrínseca, a morte celular por apoptose é iniciada pela ativação de receptores de morte celular presentes na membrana plasmática. Estes receptores incluem o receptor de fator de necrose tumoral, o receptor CD95 (Fas, Apo I), dentre outros. A ativação destes receptores resultará na ativação da caspase-8, a qual irá ativar a caspase-3 (**Esquema 4**). Entretanto, pode haver interconexões entre estas duas vias; por exemplo, a caspase-8 pode levar à ativação da proteína Bid, que por sua vez irá promover a formação de poros na membrana mitocondrial externa, juntamente com proteínas Bak ou Bax (GREEN e REED, 1998; LEIST e JÄÄTTELÄ, 2001). No citosol, o citocromo *c* se liga à Apaf-1 (“apoptosis activating factor 1”) e ao ATP, que se ligam à pró-caspase-9, formando

um complexo denominado apoptossomo. Este complexo causa a dimerização e ativação da caspase-9, que ativa a caspase-3 (LIU et al., 1996; RAVAGNAN, ROUMIER e KROEMER, 2002). As mitocôndrias também contêm a proteína Smac/DIABLO, que inativa um grupo de proteínas citosólicas responsáveis pela inibição de caspases, provavelmente relacionadas à mesma via do citocromo *c* (DU et al., 2000; RAVAGNAN, ROUMIER e KROEMER, 2002).

A proteína Bcl-2 foi a primeira proteína a ser identificada (TSUJIMOTO, YIP e VILCEK et al., 1985), de uma família de proteínas que regulam a viabilidade celular (VAUX et al., 1988). Algumas destas proteínas promovem a morte celular, como: Bax, Bad, Bcl-X_s e Bid, porém, existem outras proteínas que promovem a sobrevivência celular, como Bcl-2 e Bcl-X_L (ADAMS e CORY, 1998; KROEMER, DALLAPORTA e RESCHE-RIGON, 1998; SMAILI et al., 2003). A proteína Bcl-2 está envolvida em várias vias regulatórias que determinam a sobrevivência celular. Por exemplo, a hiperexpressão de Bcl-2 preserva o potencial de membrana e a respiração mitocondrial em mitocôndrias expostas a altas concentrações de Ca^{2+} (MURPHY et al., 1996). O mecanismo pelo qual a proteína Bcl-2 protege a integridade da membrana mitocondrial interna ainda é controverso (KOWALTOWSKI et al., 2002). Possivelmente, Bcl-2 exerça um efeito direto na estrutura da membrana interna (de JONG et al., 1994) ou indiretamente, tendo um efeito anti-oxidante (BOGDANOV et al., 1999; KOWALTOWSKI, VERCESI, FISKUM, 2000) ou modificando o fluxo de moléculas e pequenas proteínas que atravessam as membranas (ANTONSSON et al., 1997; SCHENDEL et al., 1997). A Bcl-2 inibe sobretudo a via apoptótica intrínseca, dependente da liberação de fatores pró-apoptóticos mitocondriais (GREEN e REED, 1998). Em adição, Bcl-2 é um importante inibidor da permeabilidade mitocondrial transitória (MURPHY et al., 1996). A importância da família de proteínas Bcl-2 no sistema nervoso central foi evidenciada a partir de estudos nos quais neurônios de camundongos transgênicos que hiperexpressam a proteína Bcl-2 apresentaram proteção parcial contra injúrias decorrentes de isquemia focal (MARTINOU et al., 1994) ou global (KITAGAWA et al., 1998).



Esquema 4 - Esquema que representa duas vias distintas de morte celular por apoptose. Uma das vias é dependente da ativação de receptores de morte celular (p.ex.: Fas/CD95/APO-I) e outra via é dependente da liberação de citocromo c mitocondrial para o citosol. Ambas as vias de iniciação resultam em ativação de caspase-3 que procederá à execução da apoptose. A numeração de (1) a (7) representa a seqüência de eventos envolvida na ativação da apoptose.

Adaptado de: www.mun.ca/biology/desmid/brian/bio2060

1.6.2 - Expressão da Proteína Cinase Ativada por Mitógeno (MAPK) p38

Existe um grupo de proteínas que possuem atividade de cinases serina/treonina conhecidas como proteínas cinases ativadas por mitógeno (MAPKs) que estão envolvidas na transdução de sinais intracelulares (KYRIAKIS e AVRUCH, 1996), em células eucarióticas, tendo papel fundamental em inúmeras funções celulares (TAKEDA e ICHIJO, 2002). Os membros da família das MAPKs possuem grupamentos estruturais semelhantes e são ativados por uma fosforilação dupla mediada por uma MAPKK cinase (MAPKK) específica. As MAPKs de mamíferos podem ser subdivididas em três grupos: cinases reguladas por sinais extracelulares (ERKs), Jun cinases N-terminal (JNKs) e MAPK p38. As JNK e MAPK p38 podem ser ativadas por citocinas pro-inflamatórias, hiperosmolaridade, endotoxinas, choque térmico e outras situações de estresse celular (KYRIAKIS et al., 1994; MIELKE e HERDEGEN, 2000). Uma vez ativada, a MAPK p38 pode agir no DNA nuclear ativando a transcrição de diversas proteínas e citocinas que possuem papel fisiológico, mas em algumas situações participam da morte celular por apoptose (TAKEDA e ICHIRO, 2002). Assim, enquanto em estados fisiológicos de atividade neuronal a MAPK p38 atua como um mediador da sobrevivência celular, esta mesma cinase, quando a célula está exposta a situações de estresse, pode levar à ativação de vias e fatores relacionados à morte neuronal por apoptose, como o estímulo na produção de fator de necrose tumoral α (TNF- α) e interleucina 1 β (IL-1 β) (HARPER e LoGRASSO, 2001).

A ativação da MAPK p38 tem sido implicada na indução da morte de neurônios em alguns estados de estresse, como após excessiva estimulação de receptores N-metil-D-aspartato (KAWASAKI et al., 1997; KIKUCHI et al., 2000; TENNETI e LIPTON, 2000), axotomia de nervo ótico (KIKUCHI et al., 2000), transplante de células fetais dopaminérgicas (ZAWADA et al., 2001) e reação inflamatória (de BOCK et al., 1998; KAUL e LIPTON, 1999).

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
DESENVOLVIMENTO DE COLEÇÃO

1.7 - ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS E REPOSIÇÃO CELULAR

A necessidade de um tratamento eficaz que possa bloquear ou retardar os sintomas da doença de Parkinson tem estimulado estudos para se estabelecer novas terapias para esta patologia. Transplantes de células dopaminérgicas, provenientes de tecidos embrionários, de cultura celular primária ou de linhagem celular geneticamente modificada têm sido utilizados como alternativa terapêutica.

Estudos em roedores e primatas têm mostrado que neurônios dopaminérgicos fetais transplantados podem sobreviver no corpo estriado, estabelecendo inervações funcionais (LINDVALL, 1997; DUNNETT e BJÖRKLUND, 1999; CASTILHO, HANSSON e BRUNDIN, 2000). Estudos *post-mortem* em pacientes que se submeteram a este transplante, mostraram que o implante de células dopaminérgicas embrionárias fetais resulta em reinervação de aproximadamente 5%-10% da área estriatal (LINDVALL, 1997). Novas estratégias e tratamentos farmacológicos para melhorar a sobrevivência de neurônios dopaminérgicos transplantados (CASTILHO, HANSSON e BRUNDIN, 2000), assim como para promover um melhor desenvolvimento de axônios e integração sináptica dos neurônios transplantados, têm sido intensamente estudados (para revisão ver: SANBERG e BRUNDIN, 1999; CASTILHO, HANSSON e BRUNDIN, 2000).

Recentemente, evidenciou-se que ligantes de imunofilinas, como FK506 e ciclosporina A, podem exercer um importante efeito neurotrófico em modelos experimentais *in vivo* e *in vitro* (SNYDER, LAI e BURNETT, 1998). Para FK506 e ciclosporina A, este efeito estaria relacionado principalmente à ligação destes compostos a imunofilinas intracelulares, num mecanismo independente de inibição de calcineurina (SNYDER, LAI e BURNETT, 1998). Observou-se importante efeito neurotrófico de ligantes de imunofilinas em células da linhagem PC12 (STEINER et al., 1997), em neurônios sensoriais (STEINER et al., 1997) e mais recentemente em neurônios dopaminérgicos em cultura primária (COSTATINI et al., 1998; COSTATINI e ISACSON, 2000). Na presença de FK506 ou de ciclosporina A, observou-se sobretudo um aumento no alongamento, mas não no número de neuritos de neurônios dopaminérgicos em cultura (COSTANTINI e ISACSON, 2000).

Atualmente uma outra estratégia de reparo tem recebido grande atenção e consiste no uso de células-tronco (stem cells), que são células primordiais indiferenciadas encontradas em tecidos embrionários e em alguns tecidos adultos, como nos tecidos hematopoiético, muscular e hepático. Este tipo celular tem grande potencial para ser utilizado em terapias de patologias crônicas neurodegenerativas, como a doença de Parkinson, diabetes, doenças cardiovasculares e nefropatias (DAWSON e DAWSON, 2002; LAZIC e BARKER, 2003).

2 - OBJETIVOS

O melhor conhecimento dos mecanismos que levam à degeneração e conseqüente morte de neurônios dopaminérgicos, em modelos experimentais para a doença de Parkinson, poderá permitir novas abordagens farmacológicas para prevenir, bloquear ou retardar a neurodegeneração relacionada a esta desordem neurológica. Considerando que estresse oxidativo e ativação de receptores de morte celular têm sido implicados na indução de apoptose em tecidos neuronais em algumas desordens neurodegenerativas (para revisão ver: PETTMANN e HENDERSON, 1998; LEIST e JÄÄTTELÄ, 2001), propomos nesta tese, abordar ambos os temas de acordo com os seguintes objetivos:

- 1) Avaliar os perfis de liberação de espécies reativas de oxigênio por mitocôndrias isoladas de cérebro tratadas com as neurotoxinas indutoras de parkinsonismo, rotenona e MPP⁺;
- 2) Verificar um possível efeito sinérgico da inibição parcial do complexo I mitocondrial e do aumento intracelular de Ca²⁺ na indução da morte de células PC12, bem como a proteção desse efeito pelo antioxidante natural melatonina;
- 3) Estudar o envolvimento de receptores de morte celular e da proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK) p38 na neurodegeneração progressiva e morte de células dopaminérgicas no modelo *in vivo* para a doença de Parkinson, obtido pela infusão intra-estriatal da neurotoxina 6-hidroxidopamina;
- 4) Estudar o efeito neurotrófico dos ligantes de imunofilinas FK506 e ciclosporina A em neurônios dopaminérgicos embrionários transplantados no corpo estriado de ratos com hemiparkinsonismo.

3 – MÉTODOS E MATERIAIS

3.1 - ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

Para o isolamento de mitocôndrias foram utilizadas ratas Wistar adultas (250-300g), obtidas no Centro de Bioterismo (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Para os experimentos de transplante de células dopaminérgicas embrionárias foram utilizadas ratas Sprague-Dawley obtidas do B&K Universal, Sollentuna, Suécia. Para os experimentos sobre o envolvimento de receptores de morte celular Fas/CD95/APO-I, camundongos lpr (B6.MRL-Fas lpr; mutação pontual no receptor Fas/CD95/APO-I, homozigotos), originalmente obtidos junto ao Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, EUA), foram utilizados com 9 semanas de idade (TAKAHASHI et al., 1994). Como controles foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6J com a mesma idade.

3.2 - ISOLAMENTO DE MITOCÔNDRIA DE CÉREBRO DE RATO

Mitocôndrias de cérebro foram isoladas de acordo com ROSENTHAL et al., (1987), com algumas modificações. Cérebros de 2-3 ratas adultas foram rapidamente removidos e logo a seguir colocados em 10 ml de meio de isolamento (4°C) contendo 225 mM de manitol, 75 mM de sacarose, 10 mg de albumina de soro bovino (BSA), 1 mM de EGTA, 5 mM de meio HEPES pH 7.2 e 5 mg/ml de nágarse. Os tecidos foram dissecados e homogeneizados manualmente em meio de isolamento. O homogenato foi centrifugado a 2000 g por 3 min a 4°C, o sedimento foi ressuspensionado em 20 ml de meio contendo: 225 mM de manitol, 75 mM de sucrose, 1 mM de EGTA e 5 mM de HEPES, pH 7.2 e 0.04% de digitonina e novamente centrifugado a 12.000 g por 8 min a 4°C. Este procedimento foi repetido mais uma vez, sendo que o sedimento foi ressuspensionado em meio sem digitonina centrifugado a 12000 g por 10 min a 4°C. Na etapa final, o sedimento foi ressuspensionado em meio contendo 225 mM de manitol, 75 mM de sucrose e 5 mM de HEPES, pH 7.2, obtendo-se uma concentração final de aproximadamente 25 mg/ml de proteína.

3.3 - ISOLAMENTO DE MITOCÔNDRIAS DE FÍGADO E DE MÚSCULO DE RATO

Mitocôndrias de fígado e de músculo gastrocnêmio foram isoladas a partir dos mesmos procedimentos utilizados para isolar mitocôndrias de cérebro, descritos anteriormente, incluindo a adição de 0.04% de digitonina ao segundo sedimento.

3.4 - DOSAGEM DE PROTEÍNA

A concentração de proteína das suspensões mitocondriais foi determinada pelo método de biureto (GORNALL, BARDAWILL e DAVID, 1949), modificado pela adição de colato 1% (KAPLAN e PEDERSEN, 1983). O princípio do método baseia-se na determinação da concentração de ligações peptídicas por meio da medida da absorbância do complexo cobre-nitrogênio. Este complexo absorve em comprimento de onda de 540 nm. A absorbância é considerada diretamente proporcional à concentração de proteína na solução analisada, quando uma solução de BSA a 1% foi utilizada como padrão.

3.5 - CONSUMO DE OXIGÊNIO MITOCONDRIAL

O consumo de oxigênio por mitocôndrias foi medido utilizando-se um eletrodo do tipo Clark (Yellow Springs Instrument Co., Yellow Springs, OH, EUA), conectado a um registrador potenciométrico, em uma câmara de vidro de 1,3 ml equipada com agitador magnético e mantida a uma temperatura constante de 30°C. A concentração de oxigênio inicial no meio de reação é de 225 nmol O₂/ml.

3.6 - PRODUÇÃO MITOCONDRIAL DE EROs

A produção de EROs em suspensões mitocondriais, foi determinada em espectrofluorômetro (F-4010 Hitachi spectrofluorometer, Hitachi Ltd., Tokyo, Japan), utilizando-se o marcador fluorescente permeável à membrana diclorodihidrofluoresceína a 1 µM (H₂-DCFDA) (GARCIA-RUIZ et al., 1997; LeBEL, ISCHIROPOULOS e BONDY, 1992), com comprimento de onda de excitação em 488 nm e emissão em 525 nm, e slit de 5

nm. A calibração foi feita adicionando-se concentrações conhecidas de diclorofluoresceína (DCF), que é o produto da oxidação do H₂-DCF. Alternativamente foi utilizado: i) 200 nM MitoTracker® Red CM-H₂XROs, com excitação em 579 nm e emissão em 599 nm, e slit de 5 nm (ESPOSTI et al., 1999); ii) 1 µM de escopoletina e 1 µM de peroxidase, com excitação em 365 nm e emissão em 450 nm, e slit de 5 nm; ou ainda iii) 50 µM de Amplex Red e 0.025 µM de peroxidase, com excitação em 563 nm e emissão em 587 nm, e slit de 5 nm (ZHOU e PANCHUK-VOLOSHINA, 1997).

A produção de EROs em células PC12 foi determinada em espectrofluorímetro (F-4010 Hitachi spectrofluorometer, Hitachi Ltd., Tokyo, Japan). Após 1 hora de incubação das células nas diferentes situações experimentais, adicionaram-se 50 µM de Amplex Red e 0.025 µM de peroxidase. Após 20 minutos, a fluorescência do sobrenadante foi determinada, utilizando-se comprimento de onda de excitação em 563 nm e emissão em 587 nm, e slit de 5 nm (ZHOU e PANCHUK-VOLOSHINA, 1997).

3.7 - QUANTIFICAÇÃO DE PRODUTOS REATIVOS COM O ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS)

A oxidação de lipídios foi determinada a partir da quantificação dos produtos de sua reação com o ácido tiobarbitúrico, de acordo com BUEGE e AUST (1978). Após um período de incubação de 30 min a 30°C, 0,4 ml das amostras (suspensão de mitocôndrias isoladas) que foram misturadas a 0,4 ml de 1% de ácido tiobarbitúrico diluído em 50 mM de NaOH, 0,2 ml de H₃PO₄ 20% e 40 µl de NaOH 10 M. A mistura foi aquecida a 90°C por 20 min na presença de 1 mM de butilato hidroxitolueno (BHT) e em seguida resfriada por 5 min em banho de gelo. Adicionou-se 1,5 ml de butanol à mistura, que foi centrifugada a 1.000 rpm por 1 min. A densidade óptica da parte orgânica foi determinada a 535 nm. Sob estas condições, o coeficiente de extinção de molar usado para calcular a concentração de TBARS é $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (BUEGE e AUST, 1978).

3.8 - MANUTENÇÃO DE LINHAGEM CELULAR DERIVADA DE FEOCROMOCITOMA, CÉLULAS PC12

A linhagem de células PC12 derivada de feocromocitoma de rato, foi mantida em meio modificado Dulbecco/DMEM contendo 4.5 g/l de glicose (Cultilab - Campinas/SP), suplementado com 10% de soro fetal equino (Cultilab - Campinas/SP) e 5% de soro fetal bovino (Cultilab, Campinas/SP), em estufa contendo 5% de CO₂ a 37°C em garrafas para cultivo celular de 75 cm². Nestas condições, o tempo de duplicação é de 3 dias. As células forma cultivadas por pelo menos 24 horas antes de cada experimento, apresentando uma densidade de aproximadamente 40.000 células/cm².

3.9 - LIBERAÇÃO DE LACTATO DESIDROGENASE (LDH)

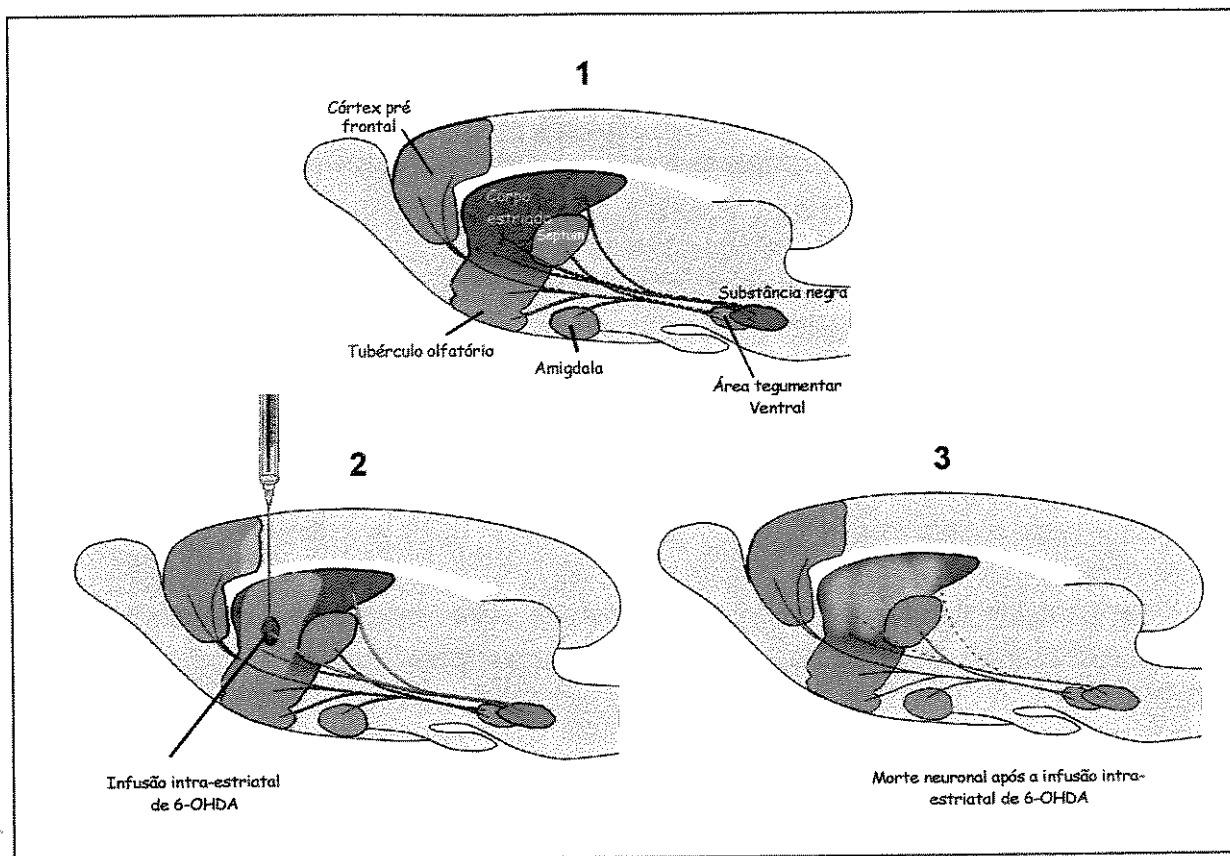
Para análise da liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH) para o meio extracelular, uma alíquota de 1 ml do sobrenadante de células PC12 em cultura foi obtida após as incubações descritas. A atividade de lactato desidrogenase foi determinada por espectrofotometria com o uso de um kit de bioquímica clínica *Doles reagentes* (Goiânia, GO, Brasil), composto de solução de lactato 0.1 M, solução de fenantrolina em Tris 0.2 M pH 8.8, solução de ácido clorídrico 0.1 M (solução estabilizadora), solução de sulfato de ferro amoniacal 0.012 M (alúmen férrico), e NAD-FMS. As amostras foram incubadas a 37°C por 3 minutos. A leitura de absorbância foi realizada utilizando-se o comprimento de onda de 510 nm num espectrofotômetro U-3000 (Hitachi Ltd., Tokyo, Japan Hitachi, Japão). Resumidamente, este método baseia-se na produção de NADH e piruvato a partir de lactato e NAD⁺, reação catalisada pela lactato desidrogenase. O NADH produzido irá promover a redução de Fe³⁺ a Fe²⁺, o qual reage com fenantrolina dando um produto avermelhado. A cada experimento foi utilizada uma amostra controle com a adição de 0,3% de Triton-X100 para se estimar a máxima liberação de LDH no meio.

3.10 - LESÃO UNILATERAL DE NEURÔNIOS DOPAMINÉRGICOS COM 6-HIDROXIDOPAMINA (6-OHDA) GERANDO RATOS E CAMUNDONGOS COM HEMIPARKINSONISMO

Uma lenta, progressiva e seletiva degeneração de neurônios dopaminérgicos foi induzida pela injeção intra-estriatal de 6-hidroxidopamina (UNGERSTEDT, 1968 e SAUER e OERTEL, 1994) em ratos adultos. Durante as microcirurgias os animais foram mantidos sob anestesia, pela aplicação intraperitoneal de 40-50 mg/kg de pentobarbital sódico. Os ratos receberam duas injeções unilaterais (1,0 µl/cada) intra-estriatais no total de 26 µg de 6-hidroxidopamina dissolvida em 2,0 µl de solução salina contendo 0,4 mg/ml de ácido ascórbico, seguindo as coordenadas para a primeira lesão: ântero-posterior (AP): +1,0 mm; médio-lateral (ML): -2,7mm; ventral à superfície dural (VS): -4,5 mm e para a segunda lesão: AP: -0,5 mm; ML: -3,0mm; VS: -5,0 mm. As lesões foram realizadas no corpo estriado direito pela infusão de 0,5 µl da toxina a cada 30 segundos, com permanência da cânula de microinjeção no local por 2 minutos antes de sua cuidadosa retirada (**Ver Esquema 5**).

Um procedimento similar foi realizado em camundongos, com a injeção de 8 µg de 6-hidroxidopamina em 1,5 µl de solução salina contendo 0,4 mg/ml de ácido ascórbico, seguindo-se as coordenadas AP: +0,8 mm; ML: -2,0 mm; VS: -2,8 mm.

Para a obtenção de ratos adultos com hemiparkinsonismo a serem transplantados, a lesão unilateral de neurônios dopaminérgicos foi obtida pela injeção de 6-hidroxidopamina no mesoestriato ascendente direito (UNGERSTEDT, 1968). 6-Hidroxidopamina (3 mg/ml) foi dissolvida em solução salina-ácido ascórbico (0,4 mg/ml). Foram infundidos 2 µl utilizando-se as coordenadas: AP: -4,4 mm, ML: -1,2 mm, VS: -7,3 mm, com a barra de dente a -2,3 mm; e 2 µl utilizando-se as coordenadas: AP: -4,0 mm, ML: -0,8 mm, VS: -7,5 mm, com a barra de dente a 0 mm.



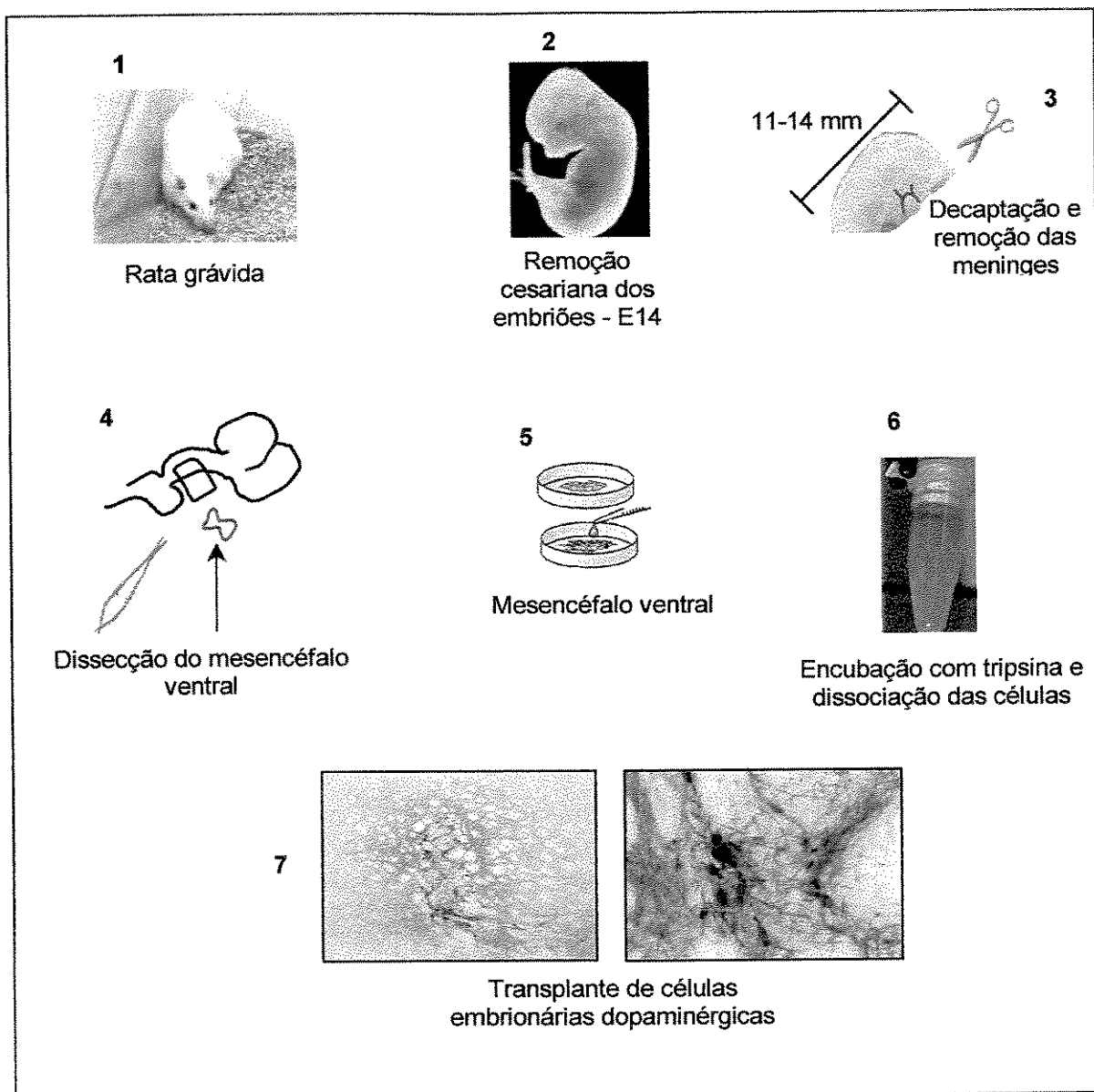
Esquema 5 - Esquema que sumariza as etapas envolvidas durante a infusão intra-estriatal da neurotoxina 6-hidroxidopamina em ratos. Ilustração em cortes sagitais: 1 - Projeções neuronais dopaminérgicas ascendentes em cérebro de rato, 2 - infusão de 6-hidroxidopamina no corpo estriado e 3 - morte neuronal após infusão intra-estriatal, com perda das inervações dopaminérgicas.

3.11 - TRANSPLANTE DE CÉLULAS EMBRIONÁRIAS

Três grupos de ratos previamente lesados com 6-hidroxidopamina foram transplantados com suspensões de células de mesencéfalo ventral de embriões (14º de gestação) (NAKAO et al., 1994). Cada rato recebeu o equivalente a 25% de um mesencéfalo ventral, i.e., um total aproximado de 8.700 células positivas para tirosina hidroxilase. Dois implantes de 1,5 µl foram realizados no corpo estriado direito dos ratos adultos com hemiparkinsonismo, utilizando-se as seguintes coordenadas: AP: +1,0 mm, ML: -2,7 mm, VS: -4,5 mm e VS: -4,0 mm com a barra de dente a +3,4 mm (ver Esquema 6).

3.12 - PROVAS DE COMPORTAMENTO

As provas de comportamento foram realizadas em ratos lesionados unilateralmente por 6-hidroxidopamina, para avaliar a eficácia da lesão em induzir hemiparkinsonismo bem como a eficácia do reparo por células dopaminérgicas transplantadas. A lesão unilateral por 6-hidroxidopamina causa um desbalanço na atividade dopaminérgica estriatal que resulta em movimentos de rotação do animal no sentido do lado lesionado, evidenciado após a administração sistêmica de anfetamina (2.5 mg/kg, i.p.). (NAKAO et al., 1994). Após a administração de anfetamina, os ratos são levados a uma cuba e conectados a um sistema de computador (programa ROTAMAX 130), por um período de 90 minutos. Este sistema irá detectar o número de vezes que o animal irá efetuar movimentos de rotação em ângulos de 90° por minuto. Os ratos que apresentaram pelo menos 5 rotações por minuto foram considerados viáveis para o transplante de células. Após o transplante, o teste de rotação foi efetuado a cada 2 semanas, até 8 semanas.



Esquema 6 - Esquema que sumariza as etapas envolvidas na preparação de suspensão celular para transplante *in vivo* de células embrionárias dopaminérgicas, utilizado no reparo celular para a doença de Parkinson.

3.13 - PERFUSÃO E SECÇÕES

Após os tempos definidos nos experimentos os ratos foram anestesiados com pentobarbital sódico e perfundidos através da aorta ascendente com 200 ml de salina (pH 7,4) seguido de 300 ml de solução de paraformaldeído 4% em 0,1 M de tampão fosfato, pH 7,4. Os cérebros foram pós-fixados nesta mesma solução por 24 horas e depois transferidos para uma solução de sacarose 20% em 0,1 M de tampão fosfato. Secções coronais de 40 µm de espessura foram feitas com o cérebro, utilizando-se um micrótomo de congelamento. As secções foram divididas em 3 séries. Camundongos foram perfundidos com 80 ml de salina, seguido de 80-100 ml de solução de paraformaldeído. Os cérebros foram pós-fixados por 4 horas. Secções coronais de 30 µm de espessura foram feitas utilizando-se um micrótomo de congelamento.

3.14 - IMUNOHISTOQUÍMICA PARA TIROSINA HIDROXILASE

Técnica de imunohistoquímica foi utilizada para identificação de neurônios dopaminérgicos (positivos para tirosina hidroxilase, TH+), por meio do uso de um anticorpo anti-TH (NAKAO et al., 1994; CASTILHO et al., 2000). Cortes de cérebro de ratos foram submetidos a 3 lavagens em PBS, incubados por 10 min em solução de 3% H₂O₂ e 10% metanol em PBS, seguida de nova seqüência de lavagem em PBS (3 vezes). As secções foram incubadas por 1 hora em solução de 5% de soro de cavalo (NHS) e 0,3% Triton X-100 em PBS e posteriormente incubadas por 16 horas a 4°C com anticorpo monoclonal anti-TH (Chemicon, Temecula, CA, EUA) na diluição de 1:2000, sob leve agitação. Seguiu-se lavagem e incubação de 1 hora com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (Calbiochem, San Diego, CA, USA) na diluição 1:2000. Por fim, foi realizada revelação com diaminobenzidina (DAB) e montagem das lâminas. Para imunohistoquímica de tirosina hidroxilase em cortes de cérebro de camundongos foi realizado o mesmo procedimento, porém utilizou-se um anticorpo policlonal anti-tirosina hidroxilase (1:500) (Pel-Freez, Rogers, AR, EUA) e um anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase (Calbiochem, San Diego, CA, EUA).

3.15 - IMUNOHISTOQUÍMICA PARA FOSFO-MAPK P38

Protocolo 1: Cortes de cérebro foram submetidos a 3 lavagens em PBS, incubação de 30 min em uma solução de 10% metanol e 10% H₂O₂ em PBS, seguida de mais 3 lavagens em PBS. As secções foram incubadas por 1 hora em solução de 1% de BSA e 0,3% Triton X-100 em PBS e posteriormente incubadas por 16 horas a 4°C com anticorpo policlonal anti-fosfo MAPK p38 de coelho (Cell Signalling Technology, Beverly, MA, EUA) na diluição de 1:250. Seguiu-se lavagem e incubação por 2 h e 30 min com anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase (Calbiochem, San Diego, CA, USA) na diluição de 1:2000, seguidas de nova lavagem em PBS. Por fim, foi realizada revelação com DAB e montagem das lâminas.

Protocolo 2: Cortes de cérebro de rato foram submetidos a 3 lavagens em TBS (0,1 M Tris-HCl pH 7,4; 0,15 M NaCl) com 0,1% de Triton X-100, e incubados com 1% de H₂O₂ em TBS por 30 minutos à temperatura ambiente. As secções foram novamente lavadas em TBS/Triton por 3 vezes de 30 min cada, incubadas em 3% de BSA em TBS/Triton por 45 min, e depois submetidas à incubação por 12 horas a 4°C com anticorpo policlonal anti-fosfo MAPK p38, na diluição de 1:100 sob leve agitação. Seguiu-se nova lavagem com TBS/Triton, 3 vezes, 10 min cada e incubação com anticorpo secundário anti-IgG de coelho na diluição de 1:2000 em 1% de BSA em TBS/Triton por 1 hora. Após 3 lavagens de 10 minutos com TBS/Triton, foi realizada revelação com DAB e montagem das lâminas.

Protocolo 3: Um anticorpo monoclonal foi utilizado para identificação da forma fosforilada da MAPK p38. Cortes de cérebro foram submetidos a 2 lavagens em H₂O (5 min cada), 5 lavagens em PBS (5 min cada) seguidas de aquecimento a 80°C em solução 10 mM de citrato de sódio por 10 minutos. Após resfriamento para temperatura ambiente, foram feitas 3 lavagens em H₂O (5 min cada), seguidos por incubação com 1% de H₂O₂ por 10 minutos, mais 3 lavagens em H₂O (5 min cada) e 1 lavagem em PBS (5 min). As secções foram pré-incubadas por 1 h em uma solução de 5% de NHS e 0,3% Triton X-100 em PBS e posteriormente incubadas por 16 h com anticorpo monoclonal anti-fosfo MAPK p38 (Cell Signalling Technology, Beverly, MA, EUA), na diluição 1:75. Seguiu-se nova lavagem e incubação por 1 h e 30 min com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo

conjugado com peroxidase (Calbiochem, San Diego, CA, USA) na diluição 1:500, seguida de nova lavagem em PBS. Por fim, foi realizada revelação com DAB e montagem das lâminas.

3.16 - IMUNOHISTOQUÍMICA PARA MARCAÇÃO DUPLA FOSFO-MAPK P38 E TH

Cortes de cérebro de ratos foram inicialmente lavados em PBS (5 min), seguido por lavagem em cloreto de amônio 50 mM (5 min) e 3 lavagens em PBS (5 min cada). As secções foram incubadas por 1 hora em solução 5% NHS e 0,3% Triton X-100 e posteriormente incubadas com anticorpo policlonal anti-fosfo MAPK p38 (Cell Signalling Technology, Beverly, MA, EUA) na diluição de 1:250 por 16 horas. Os cortes foram lavados 3 vezes em PBS (5 min cada) e, em seguida, incubados com anticorpo monoclonal anti-TH (Chemicon, Temecula, CA, EUA) na diluição de 1:2000 por 16 horas. Após 3 lavagens em PBS (5 min cada), as secções foram incubadas com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com o fluoróforo Cy3 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, EUA) na diluição de 1:250 por 1 hora e seguido por incubação com anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com o fluoróforo Cy2 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, EUA) na diluição de 1:50 por 1 hora. Por fim, os cortes foram novamente lavados em PBS por 3 vezes (5 min cada) e montadas as lâminas com meio DPX. As lâminas foram armazenadas em geladeira protegidas da luz.

3.17 - ANÁLISE E FOTODOCUMENTAÇÃO

As secções foram analisadas em microscópio de fluorescência LEICA DMIRB invertido e fotos digitalizadas foram obtidas com o uso de uma câmera Roper Scientific. Imagens também foram obtidas por um microscópio Confocal LSM 510 - ZEISS.

3.18 - MATERIAIS

Químicos: ATP, antimicina A, ciclosporina A, digitonina, HEPES, malato, succinato, MPP⁺, mixotiazol, pivurato, rotenona (R-8875, 95%), escopoletina, ácido tiobarbitúrico, ionóforo de Ca²⁺ A23187, melatonina, arsenazo III, 6-hidroxidopamina e Triton X-100 foram comprados da Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, EUA). Amplex Red, H₂-DCFDA e Mitotracker CM-H₂Xros foram comprados da Molecular Probes (Eugene, OR, EUA). O kit de bioquímica clínica para determinação de atividade de LDH foi comprado da *Doles reagentes* (Goiânia, GO, Brasil). O substrato cromogênico 3,3'-diaminobenzidina (DAB) foi comprado da Vector Laboratories (Burlingame, CA, EUA). O imunossupressor FK506 (tacrolimus) foi doado pela empresa Fujisawa (Osaka, Japão). A ciclosporina A (Sandimmun) utilizada foi a apresentação comercial 50 mg/ml, solução oleosa, da Novartis Pharma AG (Basiléia, Suíça).

Anticorpos:

- Primário monoclonal anti-tirosina hidroxilase: Chemicon, Temecula, CA, EUA;
- Primário policlonal anti-tirosina hidroxilase: Pel-Freez, Rogers, AR, EUA;
- Secundário anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase, produzido em cabra: Calbiochem, San Diego, CA, EUA;
- Secundário anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase, produzido em cabra: Calbiochem, San Diego, CA, EUA;
- Primário policlonal anti-fosfo MAPK p38: Cell Signalling Technology, Beverly, MA, EUA;
- Primário monoclonal anti-fosfo MAPK p38: Cell Signalling Technology, Beverly, MA, EUA;

- Secundário anti-IgG de camundongo conjugado com o fluoróforo Cy3, produzido em cabra: Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, EUA;
- Secundário anti-IgG de coelho conjugado com o fluoróforo Cy2, produzido em cabra: Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, EUA;
- Soros para imunohistoquímica: foram utilizados soros de cavalo e de cabra da Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA.

4 - RESULTADOS

4.1 - ESTRESSE OXIDATIVO MITOCONDRIAL INDUZIDO POR ROTENONA E Ca^{2+}

Recentemente mostrou-se que o tratamento sistêmico e crônico de ratos com rotenona, um inibidor do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial, resulta em degeneração e morte de neurônios dopaminérgicos (BETARBET et al., 2000), fornecendo um modelo experimental para a doença de Parkinson. Na primeira parte desta tese, testamos o efeito de rotenona na produção mitocondrial de espécies reativas de oxigênio (EROs), assim como o papel de íons Ca^{2+} neste processo.

Na **Figura 1 (Painel A)**, observamos que a adição da rotenona e Ca^{2+} a uma suspensão de mitocôndrias isoladas de cérebro resultou num aumento na produção mitocondrial de EROs (*linha d*). Um pequeno aumento na produção de EROs foi observado somente com a adição de Ca^{2+} (*linha c*), enquanto a adição de rotenona não teve qualquer efeito (*linha b*), quando comparada com a situação controle (*linha a*). A adição de EGTA (**Painel B**, *linha b*) ou dos antioxidantes ebselen e glutathiona (*linha c*) inibiu a oxidação de $\text{H}_2\text{-DCF}$ na presença de rotenona e Ca^{2+} , indicando que o aumento de fluorescência nesta condição é resultado da oxidação de $\text{H}_2\text{-DCF}$ por EROs num processo dependente de Ca^{2+} . No **Painel C**, o efeito da rotenona foi comparado com MPP^+ , outro inibidor do complexo I da cadeia respiratória. MPP^+ é o produto do metabolismo de MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina), um clássico indutor de parkinsonismo em animais de experimentação (BURNS et al., 1983; ZHANG, DAWSON e DAWSON, 2000). Verificamos que somente MPP^+ resultou num grande aumento da produção mitocondrial de EROs (*linha b*), o que está de acordo com resultados anteriores da literatura (Di MONTE et al., 1986; ADAMS, KLAIDMAN, e LEUNG, 1993). A adição de Ca^{2+} não resultou em aumento na produção de EROs na presença de MPP^+ (*linha c*), indicando que o efeito estimulador de Ca^{2+} é específico para rotenona. O estímulo da produção mitocondrial de EROs mostrou-se dependente da concentração de rotenona e Ca^{2+} (**Painel D**).

De acordo com BETARBET e colaboradores (2000) e FERRANTE e colaboradores (1997), a administração sistêmica e crônica de rotenona a ratos resulta em efeito tóxico preferencialmente no sistema nervoso central. Para verificar se o aumento na

geração de EROs promovido por rotenona e Ca^{2+} é específico para mitocôndrias de cérebro, realizamos experimentos comparativos com mitocôndrias isoladas de fígado e de músculo de rato (**Figura 2**). Observamos que a adição de Ca^{2+} resultou num pequeno estímulo na produção de EROs em mitocôndrias de fígado (*linha d*), o que está de acordo com trabalhos anteriores (CASTILHO et al., 1995; KOWALTOWSKI et al., 1996). Em mitocôndrias de músculo, somente a adição de rotenona (*linha b*) causou um pequeno estímulo na produção de EROs. No entanto, a adição de rotenona e Ca^{2+} não estimulou a produção de EROs em mitocôndrias isoladas de fígado ou músculo (*linhas c*).

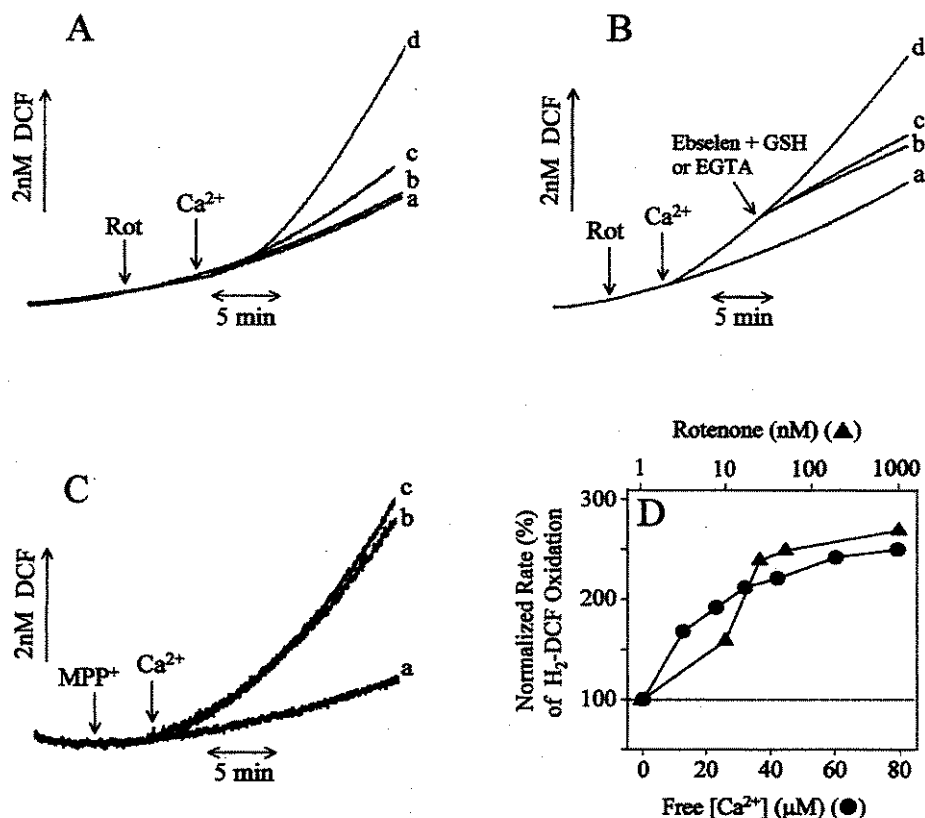


Figura 1 - Ca^{2+} induz um aumento na detecção de EROs em mitocôndrias de cérebro de rato, tratadas com rotenona: efeito da concentração de rotenona e Ca^{2+} . Mitocôndrias de cérebro de rato (MCR; 0,5 mg/ml) foram adicionadas ao meio de reação (sacarose 100 mM, KCl 65 mM, HEPES- K^+ 10 mM pH 7.2, EGTA 50 μM , P_i 1 mM, Mg^{2+} 2 mM, malato 5 mM, piruvato 10 mM, ATP 200 μM e oligomicina 1 $\mu\text{g/ml}$) contendo 1 μM de diclorodihidrofluoresceína diacetato (H_2 -DCFDA), a 30°C.

Painel A: Onde indicado pelas setas foram adicionados 50 nM de rotenona (*linhas b e d*) e 120 μM de Ca^{2+} (*linhas c, d*). A *linha a* representa um experimento controle sem adições.

Painel B: Onde indicado foram adicionados 50 nM de rotenona (*linhas b-d*), 120 μM de Ca^{2+} (*linhas b-d*), 10 μM de ebselen e 200 μM de glutathiona (*linha b*), 500 μM de EGTA (*linha c*). A *linha a* representa um experimento controle sem adições.

Painel C: Onde indicado foram adicionados 1 mM de MPP⁺ (*linhas b-c*) e 120 μM de Ca^{2+} (*linha c*). A *linha a* representa um experimento controle sem adições.

Painel D: Mostra o efeito sobre a oxidação de H_2 -DCFDA de diferentes concentrações de Ca^{2+} , na presença de rotenona 50 nM (●), ou de diferentes concentrações de rotenona, na presença de Ca^{2+} 100 μM , " Ca^{2+} livre $\approx 50 \mu\text{M}$ " ($\blacktriangle$).

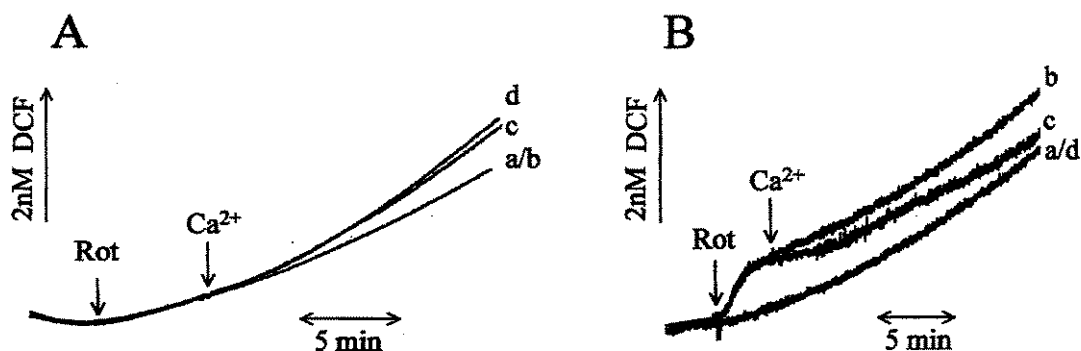


Figura 2 - Rotenona e Ca^{2+} não aumentam a produção EROs em mitocôndrias isoladas de fígado e de músculo de rato. Mitocôndrias de fígado de rato (MFR; 0,5 mg/ml) (Painel A) e mitocôndrias de músculo de rato (MMR; 0,5 mg/ml) (Painel B) foram adicionadas ao meio de reação, como descrito na legenda da Figura 1, contendo 1 μM de diclorodihidrofluoresceína diacetato ($\text{H}_2\text{-DCFDA}$). Onde indicado pelas setas foram adicionados 50 nM de rotenona (linhas b, c) e 120 μM de Ca^{2+} (linhas c, d). As linhas a representam experimentos controle sem adição de Ca^{2+} e rotenona.

Em tecidos pós-morte de substância negra obtidos de pacientes com doença de Parkinson é reportada uma redução de aproximadamente 30% na atividade do complexo I da cadeia respiratória (SCHAPIRA et al., 1990). Com o objetivo de testar uma concentração de rotenona em nossos experimentos que resultasse numa inibição parcial do complexo I, estudamos o efeito de diferentes concentrações de rotenona na respiração de mitocôndrias de cérebro (Figura 3, Painel A). Verificamos que 5 nM de rotenona inibiram em aproximadamente 30% a respiração mitocondrial no estado 3 (durante fosforilação de ADP, símbolo ●). Acima de 100 nM de rotenona, observamos uma inibição maior que 95% da respiração mitocondrial. No Painel B, observamos que a adição de 5 nM de rotenona foi suficiente para resultar em aumento na geração de EROs na presença de Ca^{2+} (linha c). Este resultado indica que a inibição parcial do complexo I mitocondrial observada na doença de Parkinson pode ser suficiente para aumentar a geração mitocondrial de EROs na presença de concentrações micromolares de Ca^{2+} .

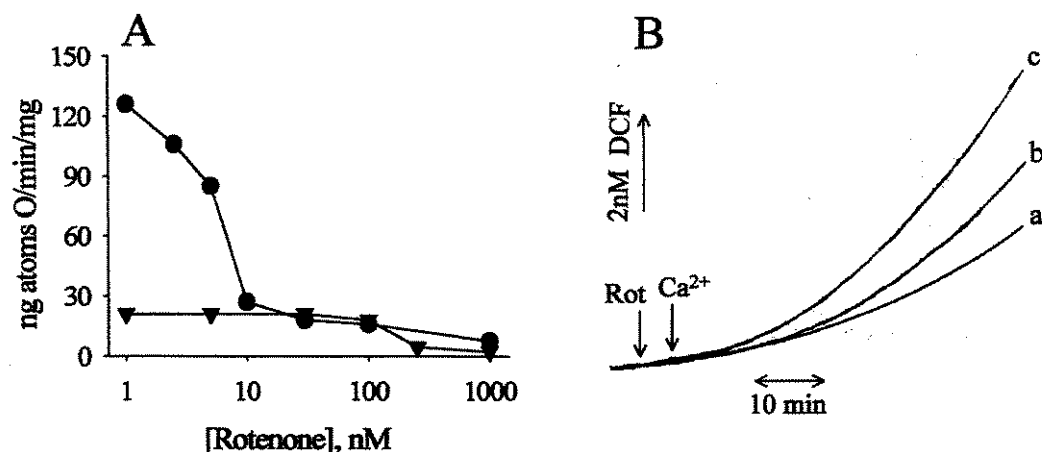


Figura 3 - Inibição parcial da cadeia respiratória mitocondrial por rotenona resulta em estresse oxidativo na presença de Ca^{2+} . Painei A, mitocôndrias de cérebro de rato (MCR 0,5 mg/ml) foram adicionadas ao meio de reação (sacarose 100 mM, KCl 65 mM, HEPES- K^+ 10 mM pH 7.2, EGTA 50 μM , P_i 1 mM, Mg^{2+} 2 mM, malato 5 mM e piruvato 10 mM) a 30°C, na ausência (▼) ou na presença de 1 mM de ADP (●). No painei B, MCR (0,5 mg/ml) foram incubadas em meio de reação como descrito na Figura 1 e onde indicado pelas setas foram adicionados 5 nM de rotenona (linha c) e 120 μM de Ca^{2+} (linhas b-c). A linha a representa um controle experimental sem adições de rotenona e Ca^{2+} .

Na Figura 4, testamos o efeito de ciclosporina A, um inibidor do poro de permeabilidade mitocondrial transitória (PMT, para revisão ver CROMPTON, 1999), na liberação de EROs mitocondrial. Ciclosporina A não teve qualquer efeito na produção mitocondrial de EROs (linha c) na presença de Ca^{2+} e rotenona, indicando que a abertura do poro de PMT (ZORATTI e SZABÒ, 1995) não está envolvida nesse processo. Adicionalmente, mostramos ainda que o protonóforo carbonil cianido-*p*-trifluorometoxil-fenil hidrazona (FCCP; linha d) não inibe o aumento da liberação mitocondrial de EROs estimulado por Ca^{2+} e rotenona. Por fim, testamos outros inibidores da cadeia respiratória mitocondrial, antimicina A (linha e) e mixotiazol (linha f), no estímulo da produção mitocondrial de EROs promovido por rotenona e Ca^{2+} . Observamos que estes inibidores não substituem o efeito da rotenona no estímulo da produção mitocondrial de EROs.

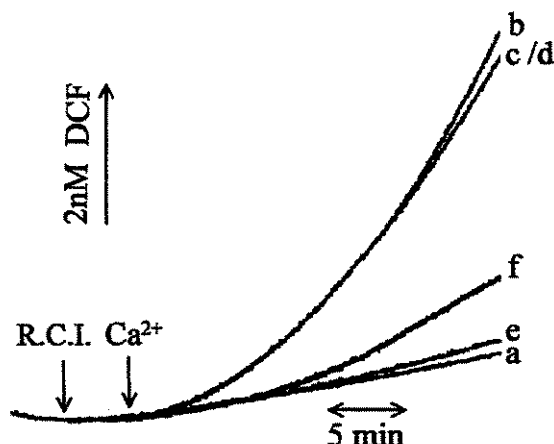


Figura 4 - Efeito de ciclosporina A, FCCP e inibidores da cadeia respiratória mitocondrial na produção mitocondrial de EROs estimulada por rotenona e Ca^{2+} . MCR (0,5 mg/ml) foram adicionadas ao meio de reação, como descrito na legenda da Figura 1, contendo 1 μM de ciclosporina A (*linha c*), 1 μM de FCCP (*linha d*), ou sem outras adições (*linhas a, b, e, f*). Inibidores da cadeia respiratória mitocondrial (RCI), 50 nM de rotenona (*linhas b-d*), 0,5 μM de antimicina A (*linha e*) ou 0,5 μM de mixotiazol (*linha f*) foram adicionados onde indicados pela seta (R.C.I.). Ca^{2+} foi adicionado aos experimentos representados pelas *linhas b-f*, onde indicado pela seta. A *Linha a* representa experimento controle, livre de adições de inibidores da cadeia respiratória mitocondrial e de adição de Ca^{2+} .

Para complementar os resultados obtidos com $\text{H}_2\text{-DCFDA}$, nos experimentos da **Figura 5** foram utilizados 3 outros marcadores fluorescentes permeáveis à membrana mitocondrial, para demonstrar a liberação mitocondrial de EROs: Mito-Tracker Red CM- H_2XROS (**Painel A**) e os substratos fluorescentes de peroxidase de raiz-forte escopoletina (**Painel B**) e Amplex Red (**Painel C**). Na presença de rotenona, o Ca^{2+} estimulou fortemente a liberação de EROs verificada com os três diferentes marcadores. A presença de apenas rotenona resultou em um pequeno aumento na detecção de EROs, que foi mais evidente quando Amplex Red foi utilizado. Ca^{2+} sozinho não estimulou a liberação de EROs. Os resultados obtidos com Mito-Tracker Red e Amplex Red (**Painéis A e C**) estão de acordo com dados recentes da literatura que mostram o estímulo causado por rotenona na liberação mitocondrial de EROs (VOTYAKOVA e REYNOLDS, 2001 e LIU, FISKUM, e SCHUBERT, 2002).

Na **Figura 6**, objetivamos correlacionar a produção mitocondrial de EROs com a oxidação de lipídios de membrana por meio da quantificação de produtos reativos com ácido tiobarbitúrico (TBARS). Observamos que houve um estímulo de 3 a 4 vezes na produção de TBARS na presença de rotenona e Ca^{2+} , quando comparado com a condição controle. Fe^{2+} -citrato foi utilizado como um indutor de TBARS independente da produção mitocondrial de EROs (CASTILHO et al., 1994).

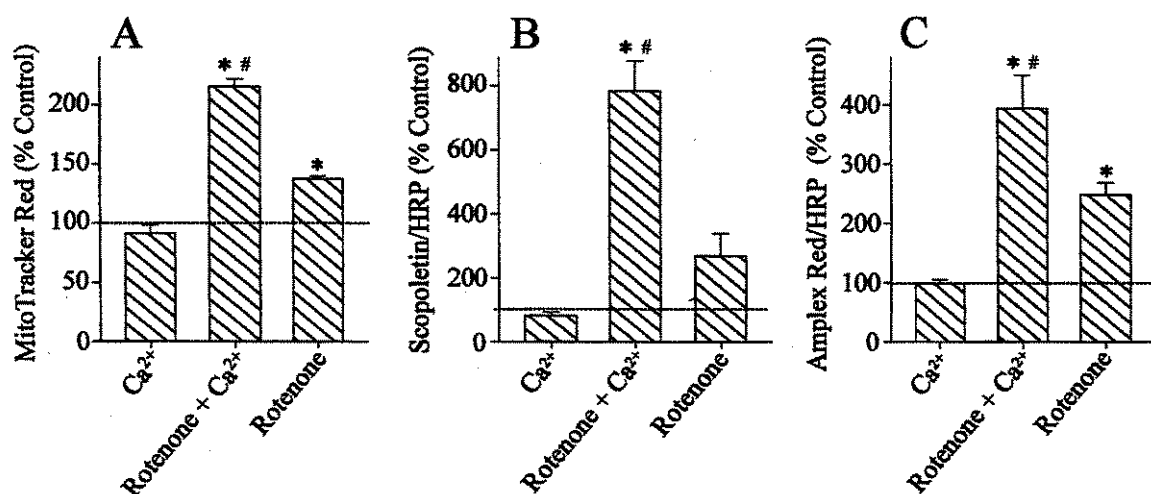


Figura 5 - Rotenona e Ca^{2+} induzem aumento na detecção de EROs, em mitocôndrias isoladas de cérebro de rato: Medidas de EROs a partir do uso de diferentes marcadores fluorescentes. Mitocôndrias de cérebro de rato (MCR; 0,5 mg/ml) foram adicionadas ao meio de reação contendo 200 nM de MitoTracker Red CM-H₂XROS (**Painel A**), 1 μM do substrato fluorescente escopoletina na presença de 1 μM peroxidase de raiz-forte (**Painel B**) ou 50 μM de Amplex Red na presença de 0.025 μM de peroxidase de raiz-forte (**Painel C**). Rotenona (50 nM) e/ou 120 μM de Ca^{2+} foram adicionados aos experimentos como indicados na figura. Os valores representam médias de 4 experimentos ($\pm$ S.E.M.), usando diferentes preparações mitocondriais. * $P < 0.01$, teste *post-hoc* Bonferroni/ Dunn comparado com o controle. # $P < 0.01$, teste *post-hoc* Bonferroni/Dunn comparado com a rotenona.

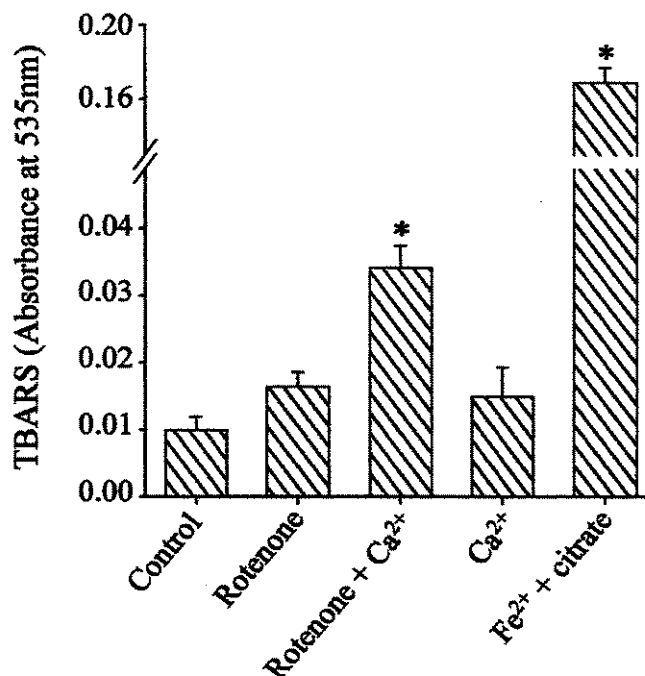


Figura 6 - Rotenona e Ca^{2+} induzem formação de TBARS em mitocôndrias isoladas de cérebro de rato. MCR (0,5 mg/ml) foram incubadas em meio de reação, como descrito na Figura 1, por 30 min na presença de 50 nM de rotenona e/ou 120 μM de Ca^{2+} como indicado na figura. Fe^{2+} (20 μM) e 2 mM de citrato foram utilizados para induzir peroxidação lipídica independente da produção mitocondrial de EROs. Os valores representam a média de 4 experimentos ($\pm$ S.E.M.), utilizando diferentes preparações mitocondriais. * $P < 0.01$, teste *post-hoc* Bonferroni/Dunn, comparado com o controle.

Na **Figura 7**, testamos ainda o efeito de cátions divalentes, Mn^{2+} , Mg^{2+} e Sr^{2+} , na detecção de EROs, na presença do inibidor da cadeia respiratória mitocondrial rotenona e Ca^{2+} . Os resultados mostraram que Mn^{2+} (100 μM), Mg^{2+} (2-5 mM), mas não Sr^{2+} (100 μM), inibem o estímulo da liberação de EROs promovido por Ca^{2+} e rotenona (**Painéis A e B**). Verificamos ainda que Mn^{2+} , Mg^{2+} e Sr^{2+} não substituem o Ca^{2+} no estímulo da liberação de EROs em mitocôndrias de cérebro de rato tratadas com rotenona.

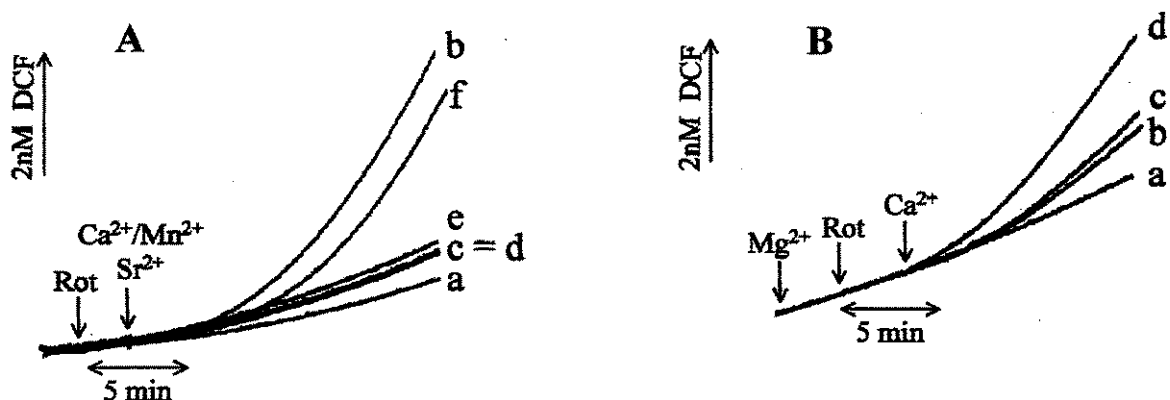


Figura 7 - Efeito de cátions divalentes sobre o aumento da produção mitocondrial de EROs estimulado por rotenona e Ca^{2+} .

Painel A - MCR (0.5 mg/ml) foram incubadas em meio de reação contendo 100 μM de MnCl_2 (linha d) ou 100 μM de SrCl_2 (linha f). Rotenona (50 nM) (linhas b-f), 100 μM de Ca^{2+} (linhas b, d, f), 100 μM de MnCl_2 (linha c), 100 μM de SrCl_2 (linha e) foram adicionados como indicado pelas setas. A Linha a representa um experimento controle sem adições de cátions divalentes e rotenona.

Painel B - MCR (0.5 mg/ml) foram incubadas em meio de reação suplementado com 2 mM de MgCl_2 (linha b) e 5 mM de MgCl_2 (linha c). Rotenona (50 nM) (linhas b-d) e 100 μM de Ca^{2+} (linhas b-d) foram adicionados onde indicado pelas setas. A Linha a representa um experimento controle sem adições de cátions divalentes e rotenona.

4.2 - ESTRESSE OXIDATIVO E MORTE CELULAR INDUZIDA POR ROTENONA E Ca^{2+}

Os resultados obtidos na primeira parte desta tese deram origem a um segundo estudo em que avaliamos o efeito protetor de melatonina, um antioxidante natural, na produção de EROs em mitocôndrias isoladas e na morte de células PC12 intactas mantidas em cultura. A morte de células PC12 foi induzida pelo aumento de Ca^{2+} citosólico e inibição do complexo I por rotenona. A linhagem de células PC12 é derivada de feocromocitoma, um tumor de medula de supra renal de ratos.

Os resultados obtidos com mitocôndrias isoladas de cérebro de rato estão de acordo com a sequência de resultados anteriores (**Figuras 1-7**), em que o tratamento de organelas com rotenona (50 nM), na presença de Ca^{2+} (100 μM), estimula a produção mitocondrial de EROs. Constatamos que uma concentração micromolar de melatonina (50 μM) inibe em aproximadamente 70% a detecção de EROs em MCR (*linhas c*). A produção de EROs foi analisada com diclorodihidrofluoresceína diacetato ($\text{H}_2\text{-DCFDA}$) ou com o substrato fluorescente de peroxidase Amplex Red (**Figura 8, Painéis A e B**).

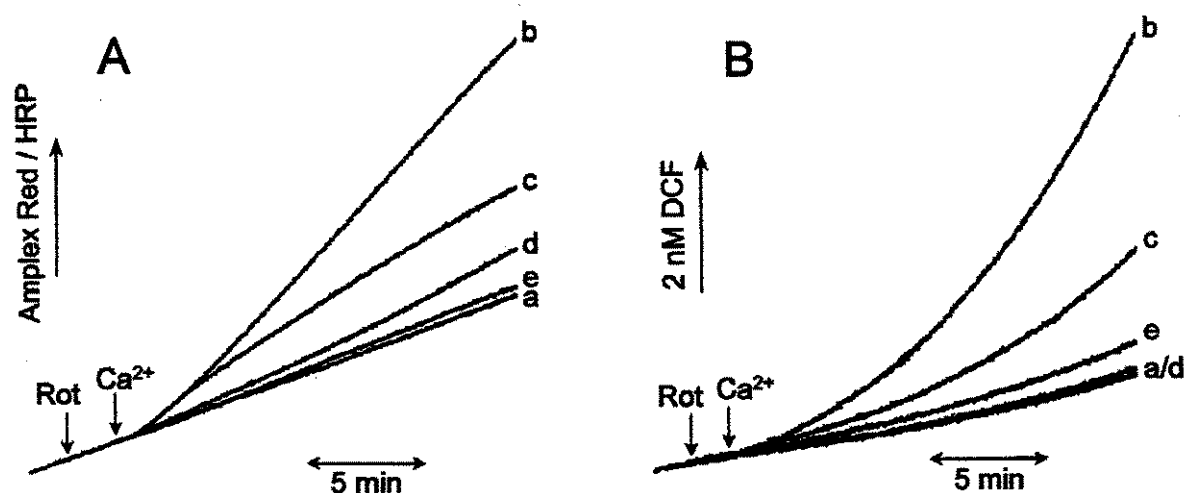


Figura 8 - Efeito de melatonina na liberação de EROs em MCR tratadas com rotenona e Ca^{2+} . Painel A: MCR (0.5 mg/ml) foram incubadas em meio de reação contendo 20 μM de Amplex Red e 0,025 μM de peroxidase de raiz-forte. Foram adicionados 50 nM de rotenona (*linhas b, c, d*), 120 μM de Ca^{2+} (*linhas b, c, e*) e 50 μM de melatonina (*linha c*) como indicado pelas setas. Painel B: MCR (0.5 mg/ml) foram incubadas em meio de reação contendo 1 μM de $\text{H}_2\text{-DCFDA}$. Foram adicionados 50 nM de rotenona (*linhas b, c, d*), 120 μM de Ca^{2+} (*linhas b, c, e*) e 50 μM de melatonina (*linha c*) como indicado pelas setas. As *linhas a* representam experimentos controle sem adições de rotenona e Ca^{2+} .

A fim de estudarmos uma possível interferência da melatonina na concentração de Ca^{2+} livre, realizamos experimentos com o marcador arsenazo III, em que foram feitas 4 adições de 10 μM de Ca^{2+} e uma adição de 500 μM de EGTA, na presença e na ausência de 50 μM de melatonina. Observamos que a melatonina não apresentou propriedade de complexar Ca^{2+} nas condições estabelecidas (**Figura 9, Painel A**). Paralelamente, investigamos a influência da melatonina na inibição do complexo I mitocondrial promovida pela rotenona. Em nossas condições experimentais, uma concentração de melatonina de 50 μM , capaz de proteger a produção excessiva de EROs, não interferiu na inibição da respiração mitocondrial promovida por rotenona (**Figura 9, Painel B**).

Nos experimentos da **Figura 10** testamos o efeito protetor da melatonina na morte celular induzida por ionóforo de Ca^{2+} A23187 e rotenona em células PC12 intactas mantidas em cultura. O ionóforo de Ca^{2+} A23187 promove a entrada de Ca^{2+} (troca de 1 Ca^{2+} por 2 H^+) para o meio intracelular. Observamos que na presença do ionóforo de Ca^{2+} A23187 (8 μM) ou rotenona (500 nM), isoladamente durante 5 horas, houve um pequeno aumento da morte celular quantificada pela liberação de lactato desidrogenase (LDH), enzima liberada para o meio quando as células morrem. A presença simultânea de rotenona e ionóforo de Ca^{2+} A23187 resultou num acentuado aumento da morte celular. Uma proteção significativa contra a morte de células PC12 foi observada quando adicionamos melatonina em concentrações de 10 μM e 50 μM , na presença de rotenona e ionóforo de Ca^{2+} A23187.

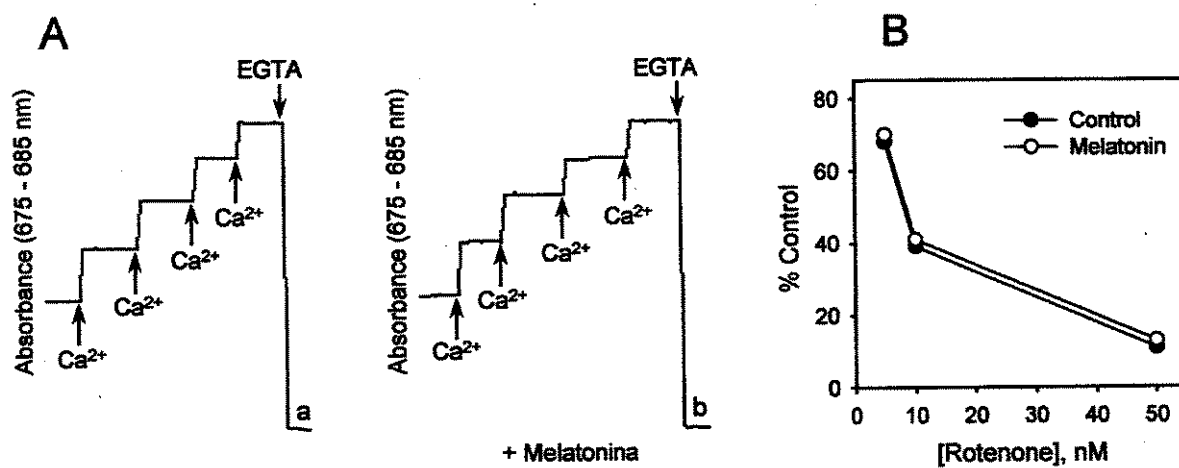


Figura 9 - Estudo da interferência da melatonina na concentração de Ca^{2+} livre e consumo de O_2 mitocondrial. Painel A: Concentração de Ca^{2+} livre avaliada com arsenazo III, na ausência (*linha a*) e presença (*linha b*) de melatonina 50 μM . Foram feitas 4 adições de 10 μM de Ca^{2+} e uma adição de 500 μM de EGTA, como indicado pelas setas. **Painel B:** Efeito de melatonina 50 μM na inibição da cadeia respiratória mitocondrial induzida por concentrações nanomolares de rotenona.

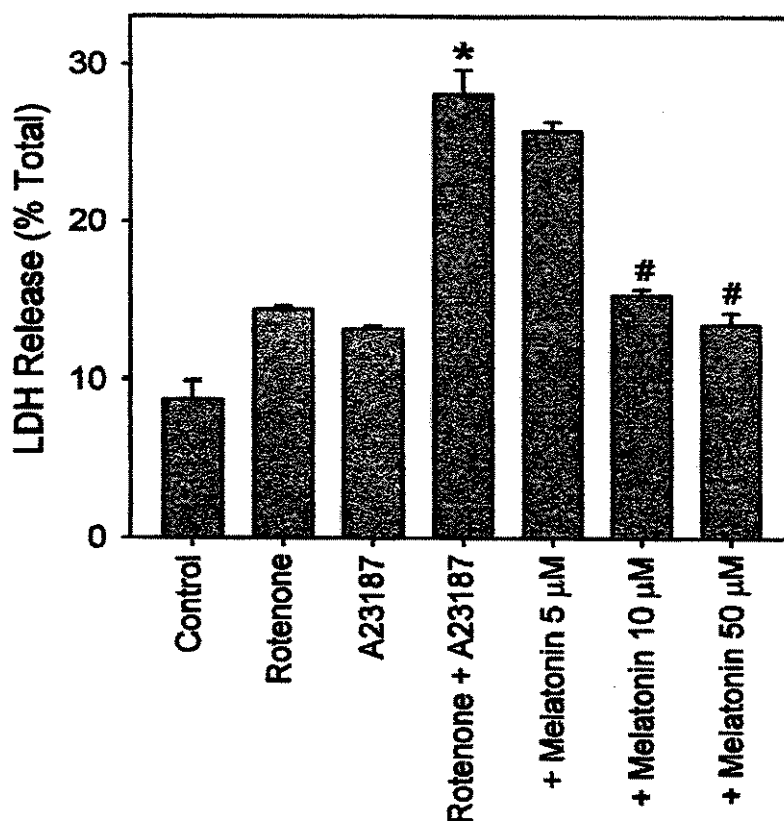


Figura 10 - Efeito da melatonina na liberação de LDH de células PC12 induzida por rotenona e ionóforo de Ca^{2+} A23187. Melatonina a 5 μM , 10 μM e 50 μM foram adicionadas a culturas de células PC12 e incubadas durante 5 horas, na presença de 500 nM de rotenona, 8 μM de ionóforo de Ca^{2+} A23187, como indicado na figura. Sobrenadante (1 ml) de cada cultura foi retirado para determinação da quantidade de LDH liberada. N = 3 experimentos independentes feitos em duplicata. * $P < 0.01$, teste *post-hoc* Bonferroni/Dunn comparado com o controle. # $P < 0.01$, teste *post-hoc* Bonferroni/Dunn comparado com "rotenone + A23187".

Paralelamente à detecção de liberação de LDH, investigamos a produção de EROs em células PC12 tratadas nas mesmas condições anteriores (rotenona 500 nM, ionóforo de Ca^{2+} A23187 8 μM e melatonina 5-50 μM), utilizando o

substrato fluorescente de peroxidase Amplex Red. Constatamos mais uma vez o efeito protetor da melatonina, que inibiu em aproximadamente 60% a detecção de EROs (Figura 11). Estes resultados indicam que a melatonina é capaz de inibir a morte neuronal induzida por inibição do complexo I mitocondrial na presença de altas concentrações citosólicas de Ca^{2+} , por possuir propriedade antioxidante. Concentrações de melatonina maiores que 50 μM não foram utilizadas nos experimentos por alterarem a função mitocondrial, avaliada pelo controle respiratório (resultados não mostrados).

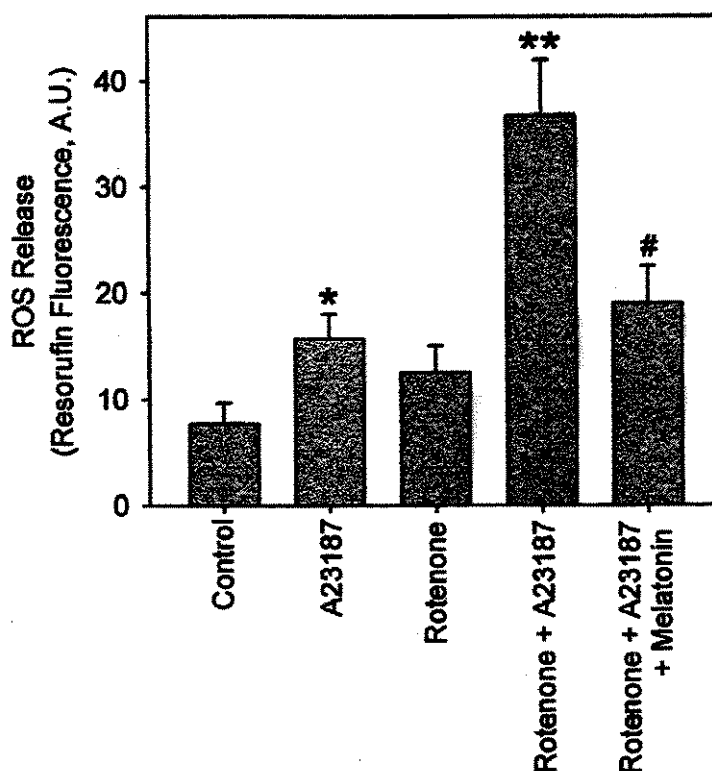


Figura 11 - Efeito de melatonina na liberação de EROs por células PC12 induzida por rotenona e ionóforo de Ca^{2+} A23187. As células PC12 foram expostas, por um período de 1 hora, à rotenona 500 nM, ionóforo de Ca^{2+} A23187 8 μM e/ou melatonina 10-50 μM , como indicado na figura. Após este período, a liberação de EROs pelas células PC12 foi estimada como descrito em Métodos e Materiais.

* $p < 0,05$ comparado com o controle, ** $p < 0,01$ comparado com o controle, # $p < 0,01$ comparado com a situação "rotenona + A23187". Análise ANOVA, *post-hoc* Bonferroni teste. Média $\pm$ S.E.M.

4.3 - ESTUDO DA NEURODEGENERAÇÃO PROGRESSIVA E MORTE DE CÉLULAS DOPAMINÉRGICAS NUM MODELO *IN VIVO* PARA A DOENÇA DE PARKINSON

Neste estudo verificamos o envolvimento do receptor de morte celular Fas/CD95/APO-I na degeneração de neurônios dopaminérgicos num modelo *in vivo* para a doença de Parkinson em camundongos. Neurônios dopaminérgicos foram seletivamente lesados pela injeção intra-estriatal da toxina 6-hidroxidopamina (**Figura 12**). A infusão desta toxina no corpo estriado leva a uma lenta e retrógrada degeneração de neurônios dopaminérgicos da substância negra com projeções nesta região (SAUER e OERTEL, 1994). O efeito de 6-hidroxidopamina foi comparado entre camundongos controles e camundongos com mutação pontual no receptor Fas/CD95/APO-I (camundongo *lpr*). Esta mutação torna este receptor parcialmente inativo (TAKAHASHI et al., 1994).

Pelos resultados mostrados na **Figura 13**, observa-se que, tanto nos animais controles como nos camundongos *lpr*, a injeção intra-estriatal de 6-hidroxidopamina induziu intensa perda de neurônios TH+. É importante mencionar que a morte celular também foi avaliada pela perda de células com morfologia de neurônios utilizando-se a coloração violeta de cresil (resultados não mostrados). Não se observou diferença significativa em relação à perda de neurônios TH+ entre camundongos controles e *lpr*, indicando que a ativação de receptores Fas/CD95/APO-I não está envolvida na morte neuronal induzida por 6-hidroxidopamina. Apenas dois camundongos no grupo *lpr* apresentaram resistência parcial à toxina 6-hidroxidopamina.

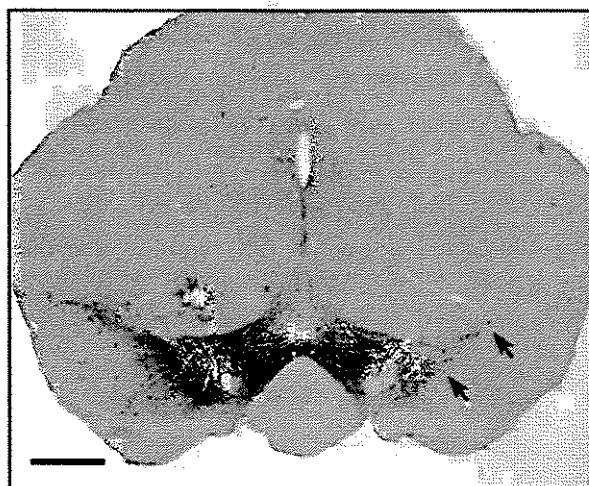


Figura 12 - Fotomicrografia do mesencéfalo de um camundongo controle 3 semanas após a infusão intra-estriatal de 6-hidroxidopamina. Nota-se intensa perda de neurônios TH+ na substância negra *pars compacta* ipsilateral à infusão da toxina (ver setas). Barra = 500 μ m.

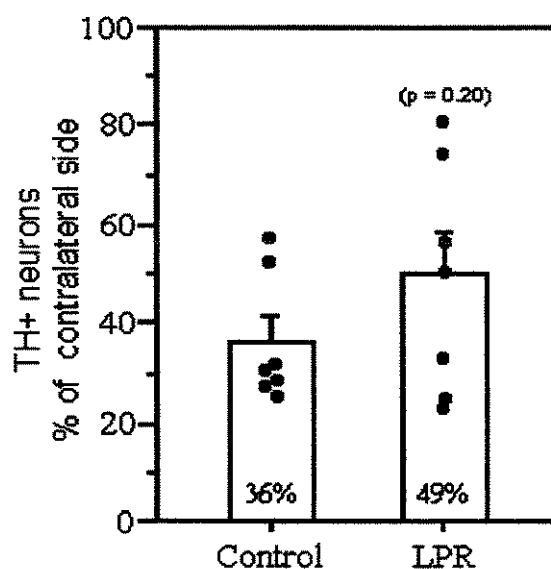


Figura 13 - Degeneração de neurônios TH+ da substância negra *pars compacta* induzida pela injeção intra-estriatal de 6-hidroxidopamina: comparação entre camundongos controles e *lpr*. 6-hidroxidopamina (6 μ g) foi injetada no corpo estriado de camundongos e após 3 semanas os animais foram perfundidos. Cortes de cérebro foram processados para tirosina hidroxilase (TH) para identificação de neurônios dopaminérgicos na substância negra. Nota-se que, tanto em camundongos controles como em *lpr*, a 6-hidroxidopamina induziu intensa morte de neurônios dopaminérgicos.

A próxima etapa desta tese visou analisar a expressão da forma fosforilada da proteína MAPK p38 em cérebros de ratos previamente lesados por 6-hidroxidopamina. O tempo de lesão (6 dias) foi determinado para que se tivesse já alguma degeneração dopaminérgica, mas que fosse anterior à total morte celular (resultados não mostrados). Os cortes de cérebro foram submetidos à preparação imunohistoquímica para marcação da expressão de fosfo-MAPK p38, com anticorpo policlonal, por meio de dois protocolos diferentes para garantir a veracidade dos dados obtidos. Foram observadas células positivas para MAPK p38 fosforiladas na substância negra bilateralmente, sem aumento significativo ipsilateral à lesão por 6-hidroxidopamina, embora deste lado fosse possível identificar células com características próprias de morte celular, como picnose celular (ver **Figura 14**). Também foi evidenciada marcação para fosfo-MAPK p38 na área tegumentar ventral, lemnisco medial, corpo estriado e nos núcleos da rafe, peduncular e geniculado. O mesmo resultado foi obtido em cortes de cérebros perfundidos sem qualquer lesão (resultado não mostrado). Portanto, parece não haver relação entre morte celular induzida pela injeção intra-estriatal de 6-hidroxidopamina e expressão de fosfo-MAPK p38. Também foi realizado um controle negativo de imunohistoquímica, sem o anticorpo primário, que mostrou não haver marcação inespecífica pelo anticorpo secundário (resultado não mostrado). Resultados semelhantes foram obtidos com o uso de um anticorpo monoclonal para fosfo-MAPK p38 em cortes de mesencéfalo, observando-se marcação positiva para fosfo-MAPK p38 em células da substância negra (**Figura 15**). No entanto, a imunohistoquímica com anticorpo monoclonal ficou parcialmente prejudicada pelo comprometimento do tecido devido à necessidade de aquecimento (80°C) no procedimento.

Por fim, foi realizada dupla marcação imunofluorescente para fosfo-MAPK p38 e TH na substância negra, núcleos da rafe e corpo estriado de cérebro de ratos adultos sem lesão (**Figura 16**). Foi evidenciada positividade para ambos, TH e fosfo-MAPK p38, na maior parte das células da substância negra (**Painel C**). No entanto, nos núcleos da rafe, área rica em neurônios serotoninérgicos, inúmeras células são positivas para fosfo-MAPK p38, porém somente axônios e poucas células são positivas para TH (**Painel F**). No corpo estriado, há inervação positiva para TH e muitas células positivas para fosfo-MAPK p38 (**Painel I**).

No corpo estriado, as células mantiveram marcação positiva para fosfo-MAPK p38 mesmo após um longo período (30 dias) de degeneração da inervação dopaminérgica provocada pela injeção intra-estriatal de 6-hidroxidopamina (Figura 17). Este resultado indica que a expressão de fosfo-MAPK p38 em células do sistema nervoso central parece não estar associada à neurotransmissão dopaminérgica.

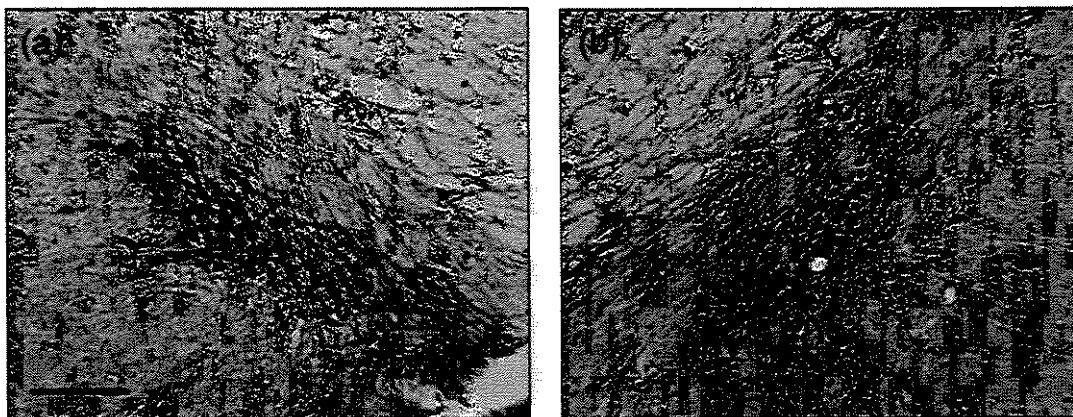


Figura 14 - Secções de substância negra 6 dias após injeção intra-estriatal de 6-hidroxidopamina (26 µg) processadas para de imunohistoquímica para fosfo-MAPK p38. (a) Corte contralateral à lesão. (b) Corte ipsilateral à lesão.

Observa-se marcação de células picnóticas ipsilateral à lesão (b), porém sem diferença significativa quanto ao número e intensidade das células marcadas para fosfo-MAPK p38.

Barra = 300 µm

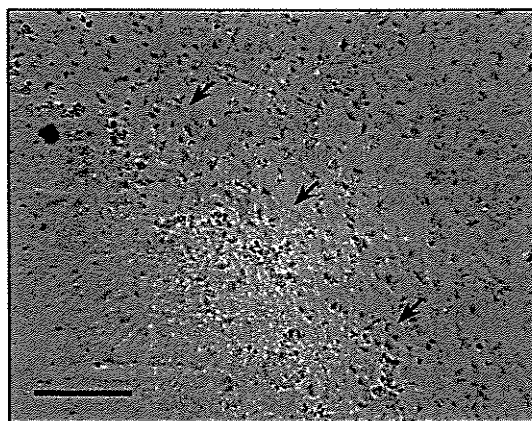


Figura 15 - Secção de mesencéfalo processada por meio de imunohistoquímica para fosfo-MAPK p38, com o uso de um anticorpo primário monoclonal. Observa-se marcação de células para fosfo-MAPK p38 na região da substância negra (ver setas). A imunohistoquímica foi realizada em corte de cérebro de rato controle, isto é, não submetido a lesão por 6-hidroxidopamina. Barra = 250 μ m

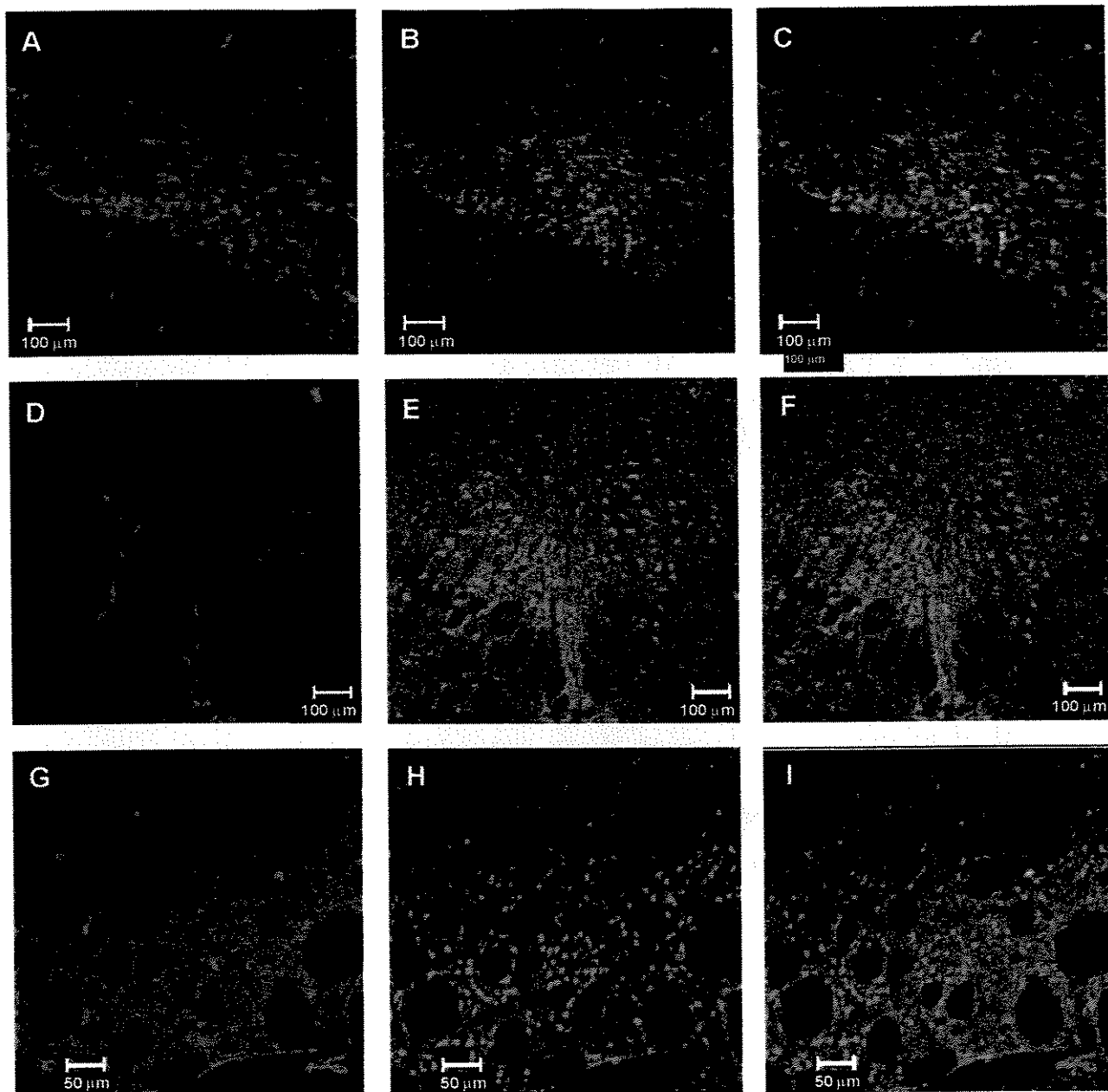


Figura 16 - Marcação imunofluorescente para fosfo-MAPK p38 e TH na substância negra (A, B, C), núcleos da rafe (D, E, F) e corpo estriado (G, H, I) de cérebro de ratos adultos. Secções de cérebro de rato foram processadas para TH (A, D, G) e fosfo-MAPK p38 (B, E, H). Painéis C, F e I mostram a sobreposição das imagens mostradas nos Painéis A-B, D-E e G-H, respectivamente. A maior parte das células na substância negra é positiva para TH e fosfo-MAPK p38 (Painel C). Nos núcleos da rafe, inúmeras células são positivas para fosfo-MAPK p38, porém há poucas células e axônios positivos para TH (Painel F). No corpo estriado, há inervação positiva para TH e muitas células positivas para fosfo-MAPK p38 (Painel I).

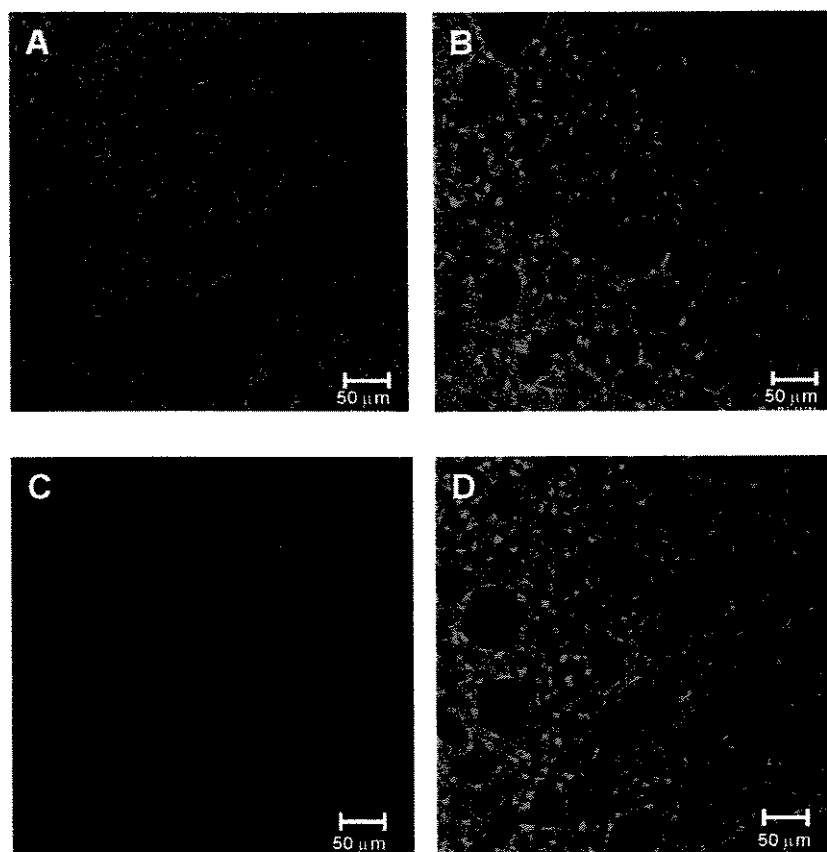


Figura 17 - Dupla marcação imunofluorescente para fosfo-MAPK p38 e TH no corpo estriado de ratos 30 dias após a lesão por 6-hidroxi-dopamina. Secções de cérebro de rato foram processadas para TH (A, C) ou fosfo-MAPK p38 (B, D). Painéis A e B mostram a marcação no corpo estriado contralateral à infusão de 6-hidroxi-dopamina. Painéis C e D mostram a marcação no corpo estriado ipsilateral à infusão de 6-hidroxi-dopamina. Observa-se que, mesmo após a perda da inervação dopaminérgica estriatal provocada pela 6-hidroxi-dopamina (Painel C), as células mantêm a positividade para fosfo-MAPK p38 (Painel D).

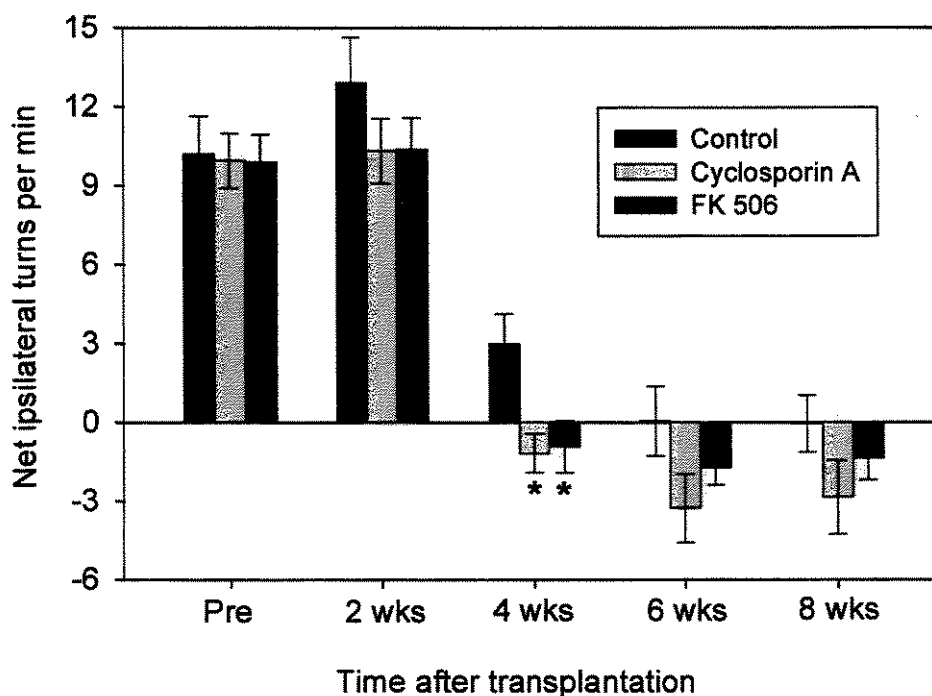
4.4 - EFEITO NEUOTRÓFICO DE LIGANTES DE IMUNOFILINAS EM NEURÔNIOS DOPAMINÉRGICOS EMBRIONÁRIOS TRANSPLANTADOS

Este estudo foi conduzido em colaboração com os pesquisadores Professor Patrik Brundin e Dr. Young-Hwan Ahn (Lund University, Lund, Suécia).

Efetuamos experimentos relacionados à neurodegeneração e ao reparo na doença de Parkinson, para investigarmos, *in vivo*, o efeito neurotrófico dos ligantes de imunofilinas FK506 e ciclosporina A em neurônios dopaminérgicos embrionários transplantados no corpo estriado de ratos adultos com hemiparkinsonismo.

Ligantes de imunofilinas podem exercer um importante efeito neurotrófico em modelos experimentais *in vivo* e *in vitro* (SNYDER, LAI e BURNETT, 1998). Para FK506 e ciclosporina A, este efeito parece estar relacionado principalmente à ligação destes compostos a imunofilinas intracelulares, num mecanismo independente de inibição de calcinerina (SNYDER, LAI e BURNETT, 1998). Observou-se importante efeito neurotrófico de ligantes de imunofilinas em células da linhagem PC12 (STEINER *et al.*, 1997), neurônios sensoriais (STEINER *et al.*, 1997) e mais recentemente em neurônios dopaminérgicos em cultura primária (COSTANTINI *et al.*, 1998; COSTANTINI e ISACSON, 2000). Em nosso trabalho foram estudados 3 subgrupos de nove ratas lesionadas com 6-hidroxidopamina. Um grupo controle, um grupo de ratas tratadas com FK506 (i.m.; 1.2 mg/kg/d) e um grupo de ratas tratadas com ciclosporina A (i.p.; 12 mg/kg/d). O tratamento com as drogas foi iniciado 3 dias antes do transplante e continuou por 6 semanas. Os ratos de cada subgrupo previamente lesionados com 6-hidroxidopamina foram transplantados com suspensões de células de mesencéfalo ventral de embriões (14º de gestação, E14) (NAKAO *et al.*, 1994). Cada rato recebeu o equivalente a 25% de um mesencéfalo ventral. A suspensão de células foi implantada em um único local no corpo estriado direito dos ratos. Após o transplante, os ratos foram submetidos ao teste de anfetamina, em que se avaliou a coordenação motora durante 2, 4, 6 e 8 semanas. Na **Figura 18**, observamos que o tratamento com FK506 e ciclosporina A melhorou a recuperação dos ratos durante o teste de anfetamina.

Após 8 semanas, as ratas foram perfundidas com paraformaldeído e foram feitas secções coronais de 40 µm em seus cérebros. As secções foram processadas para imunohistoquímica para tirosina hidroxilase (TH+) (ROSENBLAD, MARTINEZ-SERRANO e BJÖRKLUND 1998; CASTILHO, HANSSON e BRUNDIN, 2000) (**Figura 19**), e foram avaliados o número de neurônios positivos para TH e a densidade de inervação positiva para TH. Observamos que houve um aumento no número de neurônios dopaminérgicos transplantados em ratos que receberam doses diárias de ciclosporina A (12 mg/kg/d, i.p.) ou FK506 (1,2 mg/kg/d, i.m.) (**Figura 20**). O tratamento com ciclosporina A aumentou aproximadamente 100% o número de células TH+; já o tratamento com FK506 proporcionou um aumento de 180% no número de células TH+. Quanto à inervação dopaminérgica, observou-se que somente o tratamento com FK506 foi capaz de aumentar a densidade de fibras positivas para TH no corpo estriado que recebeu o transplante (**Figura 21**). Nossos resultados indicam que FK506 e ciclosporina A possuem a capacidade de aumentar o número de neurônios dopaminérgicos após a implantação de tecidos mesencefálicos embrionários.



* $p < 0.02$, One way ANOVA, multiple comparisons versus Control (Bonferroni t-test)

Figura 18 - Tratamento crônico com FK506 ou ciclosporina A melhora a recuperação de ratos transplantados no teste de anfetamina. Foi observado que o tratamento com FK506 ou ciclosporina A melhora a recuperação dos ratos no teste de anfetamina a 4, 6 e 8 semanas (wks). Os ratos receberam injeções unilaterais de 6-hidroxidopamina 8 semanas antes da implantação do transplante, resultando em hemiparkinsonismo. Os ratos receberam injeções diárias de FK506 (1,2 mg/kg/d, i.m.) ou ciclosporina A (12 mg/kg/d, i.p.), iniciadas 3 dias antes do transplante e continuadas por 6 semanas após o transplante. Média $\pm$ S.E.M.

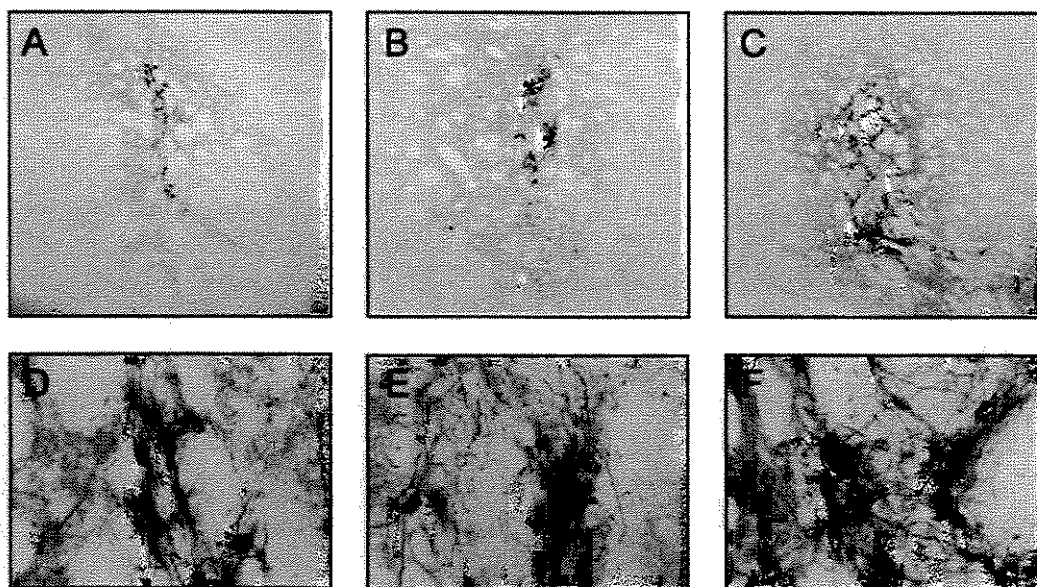


Figura 19 - Secções de corpo estriado obtidas 8 semanas após o implante de células dopaminérgicas embrionárias em ratos adultos previamente lesionados com 6-hidroxidopamina. Os ratos foram tratados com veículo (Painéis A e D), ciclosporina A (Painéis B e E) ou FK506 (Painéis C e F) como descrito no texto. As secções foram processadas para imunohistoquímica de TH. Observa-se um aumento no número de células TH+ nas secções de ratos tratados com ciclosporina A e FK506, quando comparadas ao controle. Fotomicrografias A-C: aumento de 4x. Fotomicrografias D-F: aumento de 40x.

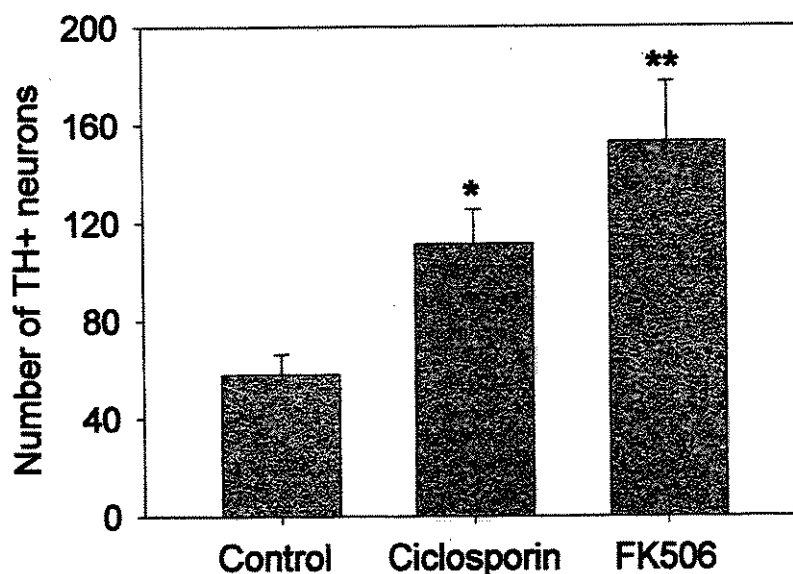


Figura 20 - Tratamento crônico com FK506 ou ciclosporina A aumenta o número de neurônios TH+ nos transplantes de células. Os ratos receberam injeções diárias de FK506 (1,2 mg/kg/d, i.m) ou ciclosporina A (12 mg/kg/d, i.p.), iniciadas 3 dias antes do transplante e continuadas durante 6 semanas após o transplante. Média $\pm$ S.E.M. A quantificação foi feita por contagem de células positivas para TH em microscópio, utilizando-se um programa de computador (CAST-Grid system, Olympus Denmark A/S, Albertslund, Dinamarca).

* $p < 0.05$, one way ANOVA, comparações múltiplas vs controle (Bonferroni t-test)

** $p < 0.01$, one way ANOVA, comparações múltiplas vs controle (Bonferroni t-test)

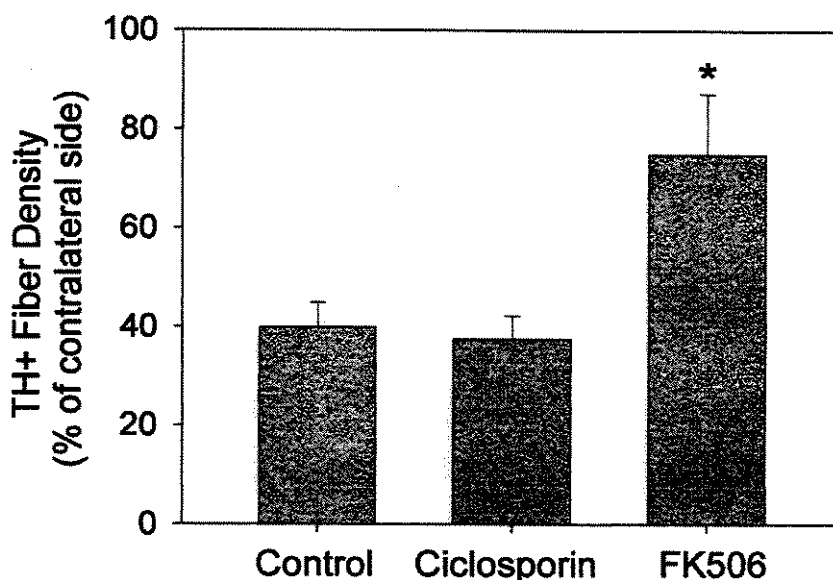


Figura 21 - Tratamento crônico com FK506, mas não com ciclosporina A, aumenta a densidade de fibras TH+ no corpo estriado que recebeu transplante de neurônios dopaminérgicos embrionários. Os ratos receberam injeções diárias de FK506 (1,2 mg/kg/d, i.m) ou ciclosporina A (12 mg/kg/d, i.p.), iniciadas 3 dias antes do transplante e continuadas durante 6 semanas após o transplante. Média $\pm$ S.E.M. A quantificação da densidade de fibras TH+ foi feita utilizando-se um programa de computador (Scion Image for Windows versão 4.0.2, Scion Corporation, Maryland, EUA).

* $p < 0.01$, one way ANOVA, comparações múltiplas vs controle (Bonferroni t-test)

5 - DISCUSSÃO

No presente trabalho nossos resultados mostraram que concentrações micromolares de Ca^{2+} , na presença de rotenona, estimulam fortemente a liberação de EROs por mitocôndrias isoladas de cérebro de rato. O efeito do Ca^{2+} foi observado como sendo dose dependente, enquanto o efeito da rotenona foi relacionado ao grau de inibição da respiração mitocondrial no estado 3 (durante fosforilação de ADP) (**Figuras 1, 3 e 5**). Observamos que mesmo uma concentração de rotenona que resulta em ~30% de inibição da respiração mitocondrial no estado 3 foi suficiente para resultar em aumento na liberação de EROs na presença de Ca^{2+} (**Figura 3**). Este resultado sugere que a inibição parcial do complexo I mitocondrial observada na doença de Parkinson (SCHAPIRA et al., 1989 e 1990a,b) pode ser suficiente para aumentar a liberação mitocondrial de EROs na presença de concentrações micromolares de Ca^{2+} . O efeito do Ca^{2+} e rotenona na liberação mitocondrial de EROs foi específico para mitocôndrias isoladas de cérebro, não sendo observado em mitocôndrias de fígado e músculo (**Figura 2**). Embora não tenhamos, até o momento, uma explicação para o efeito seletivo do Ca^{2+} e rotenona em mitocôndrias de cérebro, este efeito está correlacionado a perda celular observada especificamente no sistema nervoso de portadores de doença de Parkinson (BRAAK et al., 1995; JENNER e OLANOW, 1996). Entretanto, Ca^{2+} não estimulou o aumento da liberação de EROs na presença de MPP^+ (**Figura 1, Painel C**), indicando que o efeito estimulatório de Ca^{2+} é específico para rotenona. Os diferentes resultados obtidos com rotenona e MPP^+ provavelmente podem ser explicados por sítios de ligação distintos desses inibidores no complexo I mitocondrial (DEGLI ESPOSTI, 1998).

Constatamos ainda que Ca^{2+} não estimulou a liberação de EROs em mitocôndrias de cérebro tratadas com antimicina A ou mixotiazol, inibidores do complexo III da cadeia respiratória mitocondrial (**Figura 4**). Estes resultados sugerem que o efeito do Ca^{2+} na liberação de EROs, sob uma condição de inibição parcial da cadeia respiratória mitocondrial, possa ser específico para o sítio sensível à rotenona no complexo I. A habilidade do Ca^{2+} em estimular a produção mitocondrial de EROs pode ser atribuída a alterações promovidas por este cátion na estrutura da membrana mitocondrial, possivelmente devido sua interação com cardiolipinas na membrana mitocondrial interna (GRIJALBA, VERCESI e SCHREIER, 1999). Estas alterações são caracterizadas pelo aumento no empacotamento de lipídios e formação de domínios lipídicos que podem

contribuir para vazamento de elétrons no complexo I da cadeia respiratória (GRIJALBA, VERCESI e SCHREIER, 1999).

Sob nossas condições experimentais, o efeito do Ca^{2+} de aumentar a liberação mitocondrial de EROs em mitocôndrias de cérebro tratadas com rotenona parece não ser dependente do acúmulo de Ca^{2+} na matriz mitocondrial. O efeito do Ca^{2+} e rotenona foi observado mesmo na presença de altas concentrações de FCCP (**Figura 4**), situação em que a captação de Ca^{2+} pela mitocôndria é limitada devido à dissipação do gradiente elétrico transmembrana. Estes resultados indicam que o Ca^{2+} deve agir no lado externo da membrana mitocondrial interna, no espaço intermembranas, para estimular a liberação de EROs na presença de rotenona. Altas concentrações de Ca^{2+} podem também induzir a permeabilidade mitocondrial transitória, um fenômeno caracterizado por uma permeabilização progressiva da membrana mitocondrial interna que, gradativamente, se torna permeável a prótons, suporte osmótico e até mesmo a pequenas proteínas, resultando em inchamento mitocondrial (ZORATI e SZABÒ, 1995; CROMPTON, 1999; KOWALTOWSKI, CASTILHO e VERCESI, 2001), rompimento da membrana externa e liberação de fatores apoptogênicos para o citosol (GREEN e REED, 1998; KROEMER et al., 1998), com consequente aumento da liberação mitocondrial de Eros (ZOROV et al., 2000; MACIEL, VERCESI e CASTILHO, 2001). De acordo com os resultados desta tese, observamos que não há indicação da participação de permeabilidade mitocondrial transitória, pela ausência de efeito de ciclosporina A sobre o aumento da liberação de EROs induzida por Ca^{2+} e rotenona (**Figura 4**), além disso, nossos experimentos foram conduzidos na presença de ATP e Mg^{2+} , inibidores efetivos deste fenômeno em mitocôndrias isoladas de cérebro (NICHOLLS e SCOTT, 1980; MACIEL, VERCESI e CASTILHO, 2001). Recentemente, STARKOV e colaboradores (STARKOV, POLSTER e FISKUM, 2002) reportaram que Ca^{2+} pode aumentar em aproximadamente duas vezes a liberação de EROs na presença de rotenona por mitocôndrias isoladas de cérebro. Entretanto, diferentemente de nosso trabalho, os dados reportados por estes autores foram obtidos com o uso do substrato respiratório succinato, uma situação experimental onde a captação de Ca^{2+} mitocondrial e a sua retenção são mantidas mesmo na presença de altas concentrações de rotenona (STARKOV, POLSTER e FISKUM, 2002). Utilizando-se succinato como substrato, a

rotenona diminuiu em 70%-80% a liberação mitocondrial de EROs; assim a presença de Ca^{2+} parece apenas diminuir este efeito inibitório da rotenona. De fato, a detecção de H_2O_2 na presença de rotenona e Ca^{2+} foi mais baixa que na ausência de Ca^{2+} (STARKOV, POLSTER e FISKUM, 2002).

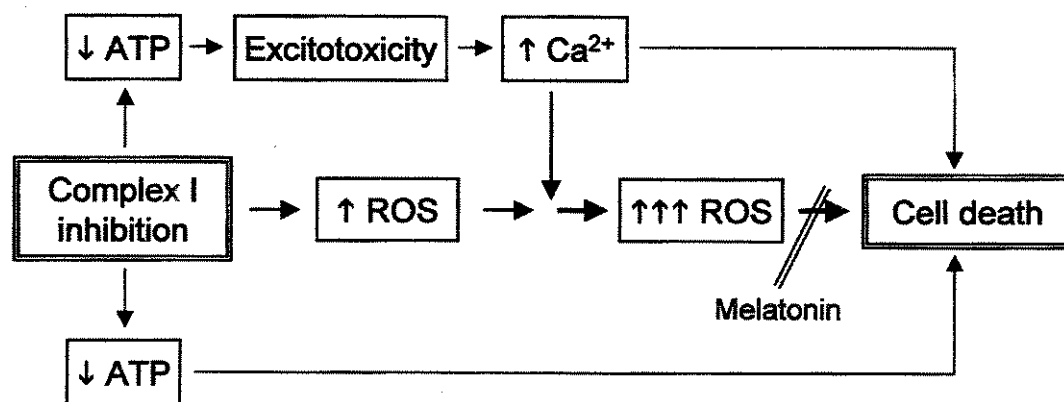
Para correlacionar o aumento na detecção de EROs com conseqüente dano oxidativo mitocondrial, avaliou-se a peroxidação lipídica mitocondrial. De fato, observou-se aumento da peroxidação lipídica de membranas, quando mitocôndrias foram tratadas com rotenona e Ca^{2+} (Figura 6), indicando que a própria mitocôndria pode constituir um importante alvo das EROs produzidas em excesso na presença de Ca^{2+} e do inibidor de complexo I rotenona.

Recentemente, BARRIENTOS e MORAES (1999) mostraram que a privação energética resultante de uma inibição crônica e parcial (~30%) da atividade do complexo I mitocondrial pode não ser suficiente para explicar a morte de células. Estes autores mostraram que, em linhagens celulares modificadas geneticamente ou tratadas com rotenona, a inibição parcial do complexo I promove morte celular de forma diretamente associada ao aumento da produção de EROs e independentemente da diminuição da função da cadeia respiratória (BARRIENTOS e MORAES, 1999). Isto está de acordo com vários trabalhos que mostram um aumento na produção mitocondrial de EROs após inibição do complexo I em organelas isoladas de cérebro (SEATON, COOPER e SCHAPIRA, 1997; BARRIENTOS e MORAES, 1999; VOTYAKOVA e REYNOLDS, 2001; LIU, FISKUM e SCHUBERT, 2002). Uma inibição parcial do complexo I mitocondrial pode também causar uma privação energética subliminar que pode aumentar a suscetibilidade de neurônios da substância negra para uma morte celular mediada por hiperestímulo de receptores de glutamato, i.e. excitotoxicidade, que resulta em aumento da concentração de Ca^{2+} intracelular (ALBIN e GREENAMYRE, 1992; CASTILHO et al., 1998; NICHOLLS e BUDD, 2000). Na excitotoxicidade, ocorre aumento da concentração de glutamato no meio extracelular, com estímulo de receptores ionotrópicos de glutamato localizados na membrana plasmática de neurônios, e conseqüente influxo de Na^+ e Ca^{2+} para o meio intracelular (ALBIN e GREENAMYRE, 1992; NICHOLLS e BUDD, 2000).

Níveis farmacológicos de melatonina, hormônio produzido pela glândula pineal e responsável pelos ritmos circadianos e processos neuro-endócrinos, podem prevenir a morte celular causada por EROs (para revisões ver VANECEK, 1998; REITER et al., 2003). A melatonina é um composto lipofílico que pode se difundir e cruzar facilmente a barreira hemato-encefálica. Embora os mecanismos bioquímicos relacionados às ações biológicas da melatonina não estejam, ainda, bem definidos, acredita-se que receptores de superfície de membrana (receptores MT1, MT2 e MT3), de alta afinidade, sejam responsáveis pela mediação dessas ações *in vivo* (VANECEK e KLEIN, 1992; DUBOCOVICH, 1995; VANECEK, 1998). Os receptores de melatonina são ligados a proteínas G, podendo influenciar os níveis intracelulares de Ca^{2+} , a atividade de adenilato ciclase e a produção de inositol trifosfato (VANECEK, 1998).

A fim de estudarmos uma possível proteção antioxidante, capaz de inibir a morte celular ocasionada pela excessiva liberação mitocondrial de EROs, induzida por rotenona e Ca^{2+} , testamos o efeito de concentrações micromolares de melatonina. Em experimentos controles, observamos que a melatonina não apresentou propriedade de complexar Ca^{2+} , ou de interferir na inibição respiratória induzida por rotenona, nas condições estabelecidas (Figura 9). Porém, a melatonina apresentou efeito antioxidante, em nossas condições experimentais, diminuindo a quantidade de EROs liberadas por mitocôndrias isoladas (Figura 8) e por células PC12 intactas (Figura 11), na presença de rotenona e Ca^{2+} . A menor liberação de EROs na presença de melatonina foi relacionada a uma inibição da morte celular nesta condição (Figura 10). Evidências experimentais mostram que a melatonina pode ser um importante antioxidante por sequestrar peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxil ($\text{HO}^\bullet$) e peróxido-nitrito ($\text{ONOO}^\bullet$), no entanto a reação de melatonina com superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) e óxido nítrico ($\text{NO}^\bullet$) ainda é duvidosa (TAN et al., 2000; GULCIN, BUYUKOKUROGLU e KUFREVIOGLU, 2003; REITER et al., 2003; ROZOV et al., 2003). Certamente, em nossas condições experimentais, os efeitos observados não se devem a interação da melatonina com receptores específicos na membrana plasmática (receptores MT1, MT2 e MT3), uma vez que estes receptores respondem a concentrações nanomolares de melatonina (VANECEK, 1998) e a melatonina apresentou efeito mesmo em mitocôndrias isoladas.

Em conclusão, os resultados das Figuras 1-11 mostram que concentrações micromolares de Ca^{2+} induzem estresse oxidativo em mitocôndrias isoladas de cérebro quando a atividade do complexo I é inibida por rotenona. Um baixo grau de excitotoxicidade, promovido em grande parte pela hiperestimulação de receptores *N*-metil-D-aspartato, o qual medeia o influxo de Na^+ e Ca^{2+} para o citosol, tem sido implicado na neuropatologia da doença de Parkinson (BEAL, 1998; BLANDINI, NAPPI e GREENAMYRE, 2001). Desta maneira, sugerimos que o estímulo do Ca^{2+} na liberação mitocondrial de EROs possa ser uma importante ligação entre a inibição parcial do complexo I mitocondrial e o dano oxidativo observado na doença de Parkinson (ver Esquema 7). A melatonina pode ser um importante composto a ser utilizado de forma terapêutica em situações de estresse oxidativo, que provoquem morte neuronal, como a observada na doença de Parkinson.



Esquema 7 - Modelo proposto para a morte de células neuronais promovida por inibição do complexo I mitocondrial. A inibição da atividade do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial resulta em privação energética ($\downarrow$ ATP) e aumento da produção de EROs (ROS). A privação energética poderá levar a uma situação de excitotoxicidade, com um aumento do influxo de Ca^{2+} intracelular. Quando o complexo I é (parcialmente) inibido, concentrações micromolares de Ca^{2+} estimulam a produção mitocondrial de EROs. O antioxidante melatonina pode proteger a morte celular induzida pela inibição do complexo I, devido à capacidade de seqüestrar EROs.

Dando continuidade ao estudo dos mecanismos moleculares envolvidos na morte celular da doença de Parkinson, avaliamos o envolvimento do receptor Fas/CD95/APO-I na degeneração de neurônios dopaminérgicos induzida por 6-hidroxidopamina em camundongos *lpr* (lymphoproliferation), que possuem uma mutação pontual no gene que codifica o receptor Fas/CD95/APO-I, tornando-o parcialmente inativo (TAKAHASHI et al., 1994). Estes camundongos são homozigotos para a mutação e, com o envelhecimento, frequentemente apresentam linfadenopatia e doença autoimune (TAKAHASHI et al., 1994). A injeção da toxina 6-hidroxidopamina no corpo estriado leva a uma lenta e retrógrada degeneração de neurônios dopaminérgicos da substância negra com projeções nesta região, sendo considerada como um modelo *in vivo* para a doença de Parkinson (SAUER e OERTEL, 1994; DUNNETT e BJÖRKLUND, 1999; DEUMENS, BLOKLAND e PRICKAERTS, 2002) (**Figura 12**). Nesta tese, o efeito de 6-hidroxidopamina foi comparado entre camundongos controle e *lpr*. Observamos que a injeção intra-estriatal de 6-hidroxidopamina induziu perda de neurônios TH+ tanto nos animais controles como em camundongos *lpr* (**Figura 13**). Estes resultados indicam que o receptor de morte celular Fas/CD95/APO-I não está envolvido na degeneração de neurônios dopaminérgicos neste modelo *in vivo* para a doença de Parkinson.

Vários grupos têm estudado o efeito de fatores tróficos como BDNF (fator neurotrófico derivado de cérebro) e GDNF (fator neurotrófico derivado de células da glia), ou antioxidantes que tenham possível aplicação clínica na prevenção da degeneração de neurônios dopaminérgicos usando modelos animais obtidos pela injeção intra-estriatal de 6-hidroxidopamina (SAUER et al., 1995; MATSUURA, MAKINO e OGAWA, 1997; BEZARD et al., 1998; ROSENBLAD, MARTINEZ-SERRANO e BJÖRKLUND, 1998). Muitos dos fatores que mantêm a sobrevivência neuronal podem atuar através da regulação de uma família de treonina-tirosina cinases conhecidas como MAP cinases (MAPK), cuja ativação pode tanto promover quanto antagonizar a morte celular. Assim, propusemos estudar a expressão da MAPK p38 fosforilada (forma ativa) em neurônios dopaminérgicos da substância negra após microinjeção intra-estriatal de 6-hidroxidopamina em ratos adultos. A ativação de MAPK p38 já foi relacionada à indução de morte de neurônios após excessiva estimulação de receptores *N*-metil-D-aspartato (KAWASAKI et al., 1997; KIKUCHI et al., 2000), axotomia de nervo ótico (KIKUCHI et al., 2000), reação

inflamatória (de BOCK et al., 1998; KAUL e LIPTON, 1999) e transplante de neurônios dopaminérgicos embrionários (ZAWADA et al., 2001). Por outro lado, a fosfo-MAPK p38 também pode exercer papéis fisiológicos no sistema nervoso central, como na diferenciação neuronal, na manutenção da sobrevivência neuronal, no controle da migração neuronal e na regulação de algumas etapas da neurotransmissão (OKAMOTO et al., 2000; CAVALLI et al., 2001; ALLEN et al., 2002; TAKEDA e ICHIJO, 2002).

A análise da expressão de proteína MAPK p38 fosforilada foi feita 6 dias após a microinjeção de 6-hidroxidopamina, em um momento anterior à ocorrência da morte da maior parte dos neurônios dopaminérgicos (**Figura 14**) e posterior à destruição dos axônios destes neurônios no corpo estriado (SAUER e OERTEL, 1994). Não foi identificada diferença do número de células positivas ou da intensidade de marcação para fosfo-MAPK p38 na substância negra no lado lesionado em comparação ao lado que não recebeu 6-hidroxidopamina (**Figura 14**). Assim, a expressão desta proteína parece não ter relação com a morte celular neste modelo experimental para doença de Parkinson.

Notadamente, observou-se intensa marcação para fosfo-MAPK p38 na substância negra e em outras regiões cerebrais ricas em neurônios monoaminérgicos, como nos núcleos da rafe e substância cinzenta peri-aquedutal (**Figura 15**). A monoamina predominante nos núcleos da rafe e substância cinzenta peri-aquedutal é a serotonina, mas outros neurotransmissores monoaminérgicos adrenalina, noradrenalina e histamina também estão presentes. Não foi encontrado qualquer descrição na literatura sobre a expressão de fosfo-MAPK p38 em áreas monoaminérgicas cerebrais, no entanto, a caracterização de seu papel fisiológico vai além do objetivo do presente estudo. No corpo estriado, as células mantiveram marcação positiva para fosfo-MAPK p38 mesmo um longo período (30 dias) após degeneração da inervação dopaminérgica provocada pela injeção de 6-hidroxidopamina na substância negra (**Figura 17**). Este resultado indica que a expressão de fosfo-MAPK p38 parece não estar associada à neurotransmissão pós-sináptica dopaminérgica.

Conclui-se que a ativação de MAPK p38 não está envolvida no processo de degeneração de neurônios dopaminérgicos por 6-hidroxidopamina em ratos, um modelo experimental para a doença de Parkinson, mas sua expressão pode estar relacionada com a

neurotransmissão monoaminérgica. A observação que fosfo-MAPK p38 está amplamente expressa em células de algumas áreas cerebrais abre novas perspectivas no estudo das diversas funções relacionadas à fosfo-MAPK p38 no sistema nervoso central.

Transplante de neurônios dopaminérgicos embrionários, para o corpo estriado de indivíduos com doença de Parkinson, é considerado como uma estratégia bastante promissora para o tratamento desta doença (BRUNDIN et al., 2000; DAWSON e DAWSON, 2002). Porém, um dos desafios atuais é estabelecer meios de manter uma alta proporção das células transplantadas viáveis por longos períodos, uma vez que a sobrevivência aproximada dessas células tem sido de apenas 5% a 10% (BRUNDIN et al., 2000). Há 4 estágios definidos, quando a morte de neurônios dopaminérgicos pode ocorrer durante o transplante, são eles: (i) durante a remoção do tecido embrionário, quando este é submetido a hipóxia e hipoglicemia, uma vez que o embrião é separado bruscamente do suprimento sanguíneo materno, (ii) a segunda fase se caracteriza por axotomia mecânica e trauma de células, que ocorre devido à dissecação e dissociação do tecido embrionário, (iii) a terceira fase inclui as primeiras horas após o transplante e é resultado sobretudo da lesão mecânica causada pela inserção da cânula no cérebro do rato transplantado e (iv) a quarta fase se caracteriza pelo período de maturação e desenvolvimento das células transplantadas no cérebro adulto (BRUNDIN et al., 2000). Acredita-se que, em modelos experimentais, aproximadamente 90% da morte de células ocorra durante as 3 primeiras fases acima descritas.

É conhecido que ligantes de imunofilinas podem exercer um importante efeito neurotrófico em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo* (STEINER et al., 1997; LAI e BURNETT, 1998; COSTANTINI e ISACSON, 2000). Para FK506 e ciclosporina A, este efeito parece estar relacionado principalmente à ligação destes compostos a imunofilinas intracelulares, num mecanismo independente de inibição de calcineurina (SNYDER, LAI e BURNETT, 1998). FK506 e ciclosporina A inibem a atividade de rotamase de imunofilinas intracelulares (SNYDER, LAI e BURNETT, 1998). Observou-se importante efeito neurotrófico de ligantes de imunofilinas em células da linhagem PC12 (STEINER et al., 1997), em neurônios sensoriais (STEINER et al., 1997) e em neurônios

dopaminérgicos em cultura primária (COSTANTINI et al., 1998; COSTANTINI e ISACSON, 2000).

Nossos resultados indicaram que o tratamento crônico e sistêmico de ratos adultos com hemiparkinsonismo com FK506 e ciclosporina A possui a capacidade de aumentar o número de neurônios dopaminérgicos (TH+) após a implantação intra-estriatal de tecido mesencefálico embrionário. Enquanto o tratamento de ratos com ciclosporina A aumentou aproximadamente 100% o número de células TH+, o tratamento com FK506 proporcionou um aumento de 180% no número de células TH+ (**Figuras 19 e 20**). O aumento de células TH+ observado correlacionou-se com uma melhor recuperação dos ratos com hemiparkinsonismo em provas comportamentais (**Figura 18**), e no caso dos ratos tratados com FK506 observou-se ainda maior densidade de inervação TH+ no corpo estriado que recebeu o transplante (**Figura 21**).

Com base nestes resultados, propomos dois mecanismos pelos quais FK506 e ciclosporina A poderiam induzir um aumento no número de neurônios TH+ transplantados: (i) pela inibição da morte de neurônios TH+ após implantação de tecidos embrionários, e/ou (ii) por induzir neurogênese de neurônios dopaminérgicos nos tecidos embrionários transplantados, levando ao aumento no número final de neurônios TH+ nos transplantes. Em nossas condições experimentais, o efeito observado com o uso de FK506 e ciclosporina A certamente não está relacionado à inibição da rejeição imunológica do transplante, pois o transplante realizado, de tecido embrionário para animais adultos de mesma linhagem, pode ser considerado como singênico (CASTILHO, HANSSON e BRUNDIN, 2000; WENNERBERG et al., 2001). Evidências anteriores mostram uma melhor sobrevivência de neurônios dopaminérgicos transplantados, quando somente a suspensão de células embrionárias foi tratada com ciclosporina A ou FK506 (CASTILHO, HANSSON e BRUNDIN, 2000). Quanto à possibilidade de ligantes de imunofilinas induzirem neurogênese e/ou aumento da inervação dopaminérgica, BORLONGAN e colaboradores (1999) observaram que ratos adultos tratados cronicamente com doses imunossupressoras de ciclosporina A mostraram maior reatividade para neurônios TH+ na substância negra. A possível ocorrência de neurogênese de neurônios dopaminérgicos embrionários transplantados poderá ser futuramente avaliada por meio de um estudo com ratos

transplantados com células embrionárias e tratados com bromodeoxiuridina (BrdU), um marcador para proliferação celular (KORNACK e RAKIC, 2001). Conclui-se que o tratamento crônico com ligantes de imunofilinas, além de proporcionar imunossupressão necessária à sobrevida de transplantes (WENNBERG et al., 2001), pode resultar em melhor viabilidade e inervação de neurônios embrionários transplantados.

6 - CONCLUSÕES

- Concentrações micromolares de Ca^{2+} induzem estresse oxidativo em mitocôndrias isoladas de cérebro e em células PC12 intactas quando a atividade do complexo I é inibida por rotenona. A melatonina apresenta um importante efeito antioxidante nestas condições (**Figuras 1-11**).
- O receptor de morte celular Fas/CD95/APO-I não está envolvido na degeneração de neurônios dopaminérgicos induzida pela infusão intra-estrital da neurotoxina 6-hidroxidopamina em camundongos, um modelo experimental para a doença de Parkinson (**Figuras 12-13**).
- A ativação de MAPK p38 não está envolvida no processo de degeneração de neurônios dopaminérgicos induzida por 6-hidroxidopamina em ratos, mas sua expressão pode estar relacionada com a neurotransmissão monoaminérgica (**Figuras 14-17**).
- O tratamento crônico com ligantes de imunofilinas, além de proporcionar imunossupressão necessária à sobrevida de transplantes alogênicos, pode resultar em melhor viabilidade e inervação de neurônios embrionários transplantados (**Figuras 18-21**).

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABELIOVICH, A.; SCHMITZ, Y.; FARINAS, I.; CHOI-LUNDBERG, D.; HO, W.H.; CASTILLO, P.E.; SHINSKY, N.; VERDUGO, J.M.; ARMANINI, M.; RYAN, A.; HYNES, M.; PHILLIPS, H.; SULZER, D.; ROSENTHAL, A. Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system. **Neuron**, 25: 239-52, 2000.

ADAMS, J.D. Jr.; KLAIDMAN, L.K.; LEUNG, A.C. MPP⁺ and MPDP⁺-induced oxygen radical formation with mitochondrial enzymes. **Free Radic Biol Med**, 15: 181-6, 1993.

ADAMS, J.M.; CORY, S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. **Science**, 281: 1322-6, 1998.

ALBIN, R.L.; GREENAMYRE, J.T. Alternative excitotoxic hypotheses. **Neurology**, 42: 733-8, 1992.

ALLEN, M.P.; LINSEMAN, D.A.; UDO, H.; XU, M.; SCHAACK, J.B.; VARNUM, B.; KANDEL, E.R.; HEIDENREICH, K.A.; WIERMAN, M.E. Novel mechanism for gonadotropin-releasing hormone neuronal migration involving Gas6/Ark signaling to p38 mitogen-activated protein kinase. **Mol Cell Biol**, 22: 599-613, 2002.

ANGLADE, P.; VYAS, S.; JAVOY-AGID, F.; HERRERO, M.T.; MICHEL, P.P.; MARQUEZ, J.; MOUATT-PRIGENT, A.; RUBERG, M.; HIRSH, E.C.; AGID, Y. Apoptosis and autophagy in nigral neurons of patients with Parkinson's disease. **Histol Histopathol**, 12: 25-31, 1997.

ANTONSSON, B.; CONTI, F.; CIAVATTA, A.; MONTESSUIT, S.; LEWIS, S.; MARTINOU, I.; BERNASCOVI, L.; BERNARD, A.; MERMOD, J.J.; MAZZEI, G.; MAUNDRELL, K.; GAMBALE, F.; SADOUL, R.; MARTINOU, J.C. Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2. **Science**, 277: 370-2, 1997.

ARCH, R.H.; THOMPSON, C.B. Lymphocyte survival--the struggle against death. **Annu Rev Cell Dev Biol**, 15: 113-40, 1999.

BARRIENTOS, A.; MORAES, C.T. Titrating the effects of mitochondrial complex I impairment in the cell physiology. **J Biol Chem**, 274: 16188-97, 1999.

BEAL, M.F. Excitotoxicity and nitric oxide in Parkinson's disease pathogenesis. **Ann Neurol**, 44: S110-4, 1998.

- BEAL, M.F. Role of excitotoxicity in human neurological disease. **Curr Opin Neurobiol**, 2: 657-62, 1992.
- BEN-SHOLMO, Y. How far are we in understanding the cause of Parkinson's disease? **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, 61: 4-16, 1996.
- BERRIDGE, M.J. Inositol triphosphate and calcium signalling. **Nature**, 361: 315-25, 1993.
- 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**, 3: 1301-6, 2000.
- BEZARD, E.; STUTZMANN, J.M.; IMBERT, C.; BORAUD, T.; BOIREAU, A.; GROSS, C.E. Riluzole delayed appearance of parkinsonian motor abnormalities in a chronic MPTP monkey model. **Eur J Pharmacol**, 356: 101-4, 1998.
- BLANDINI, F.; NAPPI, G.; GREENAMYRE, J.T. Subthalamic infusion of an NMDA antagonist prevents basal ganglia metabolic changes and nigral degeneration in a rodent model of Parkinson's disease. **Ann Neurol**, 49: 525-9, 2001.
- BLIN, O.; DESNUELLE, C.; RASCOL, O.; BORG, M.; PEYRO SAINT PAUL, H.; AZULAY, J.P.; BILLE, F.; FIGARELLA, D.; COULOM, F.; PELLISSIER, J.F., et al. Mitochondrial respiratory failure in skeletal muscle from patients with Parkinson's disease and multiple system atrophy. **J Neurol Sci**, 125: 95-101, 1994.
- BLOEM, B.R.; IRWIN, I.; BURUMA, O.J.; HAAN, J.; ROOS, R.A.; TETRUD, J.W.; LANGSTON, J.W. The MPTP model: versatile contributions to the treatment of idiopathic Parkinson's disease. **J Neurol Sci**, 97: 273-93, 1990.
- BOGDANOV, M.B.; FERRANTE, R.J.; MUELLER, G.; RAMOS, L.E.; MARTINOU, J.C.; BEAL, M.F. Oxidative stress is attenuated in mice overexpressing Bcl-2. **Neurosci Lett**, 262: 33-6, 1999.
- BORLONGAN, C.V.; STAHL, C.E.; FUJISAKI, T.; SANBERG, P.R.; WATANABE, S. Cyclosporine A-induced hyperactivity in rats: is it mediated by immunosuppression, neurotrophism, or both? **Cell Transplant**, 8: 153-9, 1999.

- BOVERIS, A.; CHANCE, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. **Biochem J**, 134: 707-16, 1973.
- BRAAK, H.; BRAAK, E.; YILMAZER, D.; SCHULTZ, C.; DE VOS, R.A.; JANSEN, E.N. Nigral and extranigral pathology in Parkinson's disease. **J Neural Transm Suppl**, 46: 15-31, 1995.
- BREDESEN, D.E. Neural apoptosis. **Ann Neurol**, 38: 839-51, 1995.
- BRUNDIN, P.; KARLSSON, J.; EMGARD, M.; SCHIERLE, G.S.; HANSSON, O.; PETERSEN, A.; CASTILHO, R.F. Improving the survival of grafted dopaminergic neurons: a review over current approaches. **Cell Transplant**, 9: 179-95, 2000.
- BUEGE, J.A.; AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods Enzymol**, 52: 302-10, 1978.
- BURNS, R.S.; CHIUH, 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**, 80: 4546-50, 1983.
- BURSCH, W.; ELLINGER, A.; GERNER, C.; FROHWEIN, U.; SCHULTE-HERMANN, R. Programated cell death (PCD). Apoptosis, autophagic PCD, or others? **Ann N Y Acad Sci**, 926: 1-12, 2000.
- CARAFOLI, E. Intracellular calcium homeostasis. **Annu Rev Biochem**, 56: 395-433, 1987.
- CASTILHO, R.F.; HANSSON, O.; BRUNDIN, P. FK506 and cyclosporin A enhance the survival of cultured and grafted rat embryonic dopamine neurons. **Exp Neurol**, 164: 94-101, 2000.
- CASTILHO, R.F.; HANSSON, O.; BRUNDIN, P. Improving the survival of grafted embryonic dopamine neurons in rodent models of Parkinson's disease. **Prog Brain Res**, 127: 203-31, 2000.

CASTILHO, R.F.; HANSSON, O.; WARD, M.W.; BUDD, S.L.; NICHOLLS, D.G. Mitochondrial control of acute glutamate excitotoxicity in cultured cerebellar granule cells. **J Neurosci**, 18: 10277-86, 1998.

CASTILHO, R.F.; KOWALTOWSKI, A.J.; MEINICKE, A.R.; BECHARA, E.J.H.; VERCESI, A.E. Permeabilization of inner mitochondrial membrane by Ca^{2+} ions is stimulated by *t*-butyl hydroperoxide and mediated by reactive oxygen species generated by mitochondria. **Free Radic Biol Med**, 18: 479-86, 1995.

CASTILHO, R.F.; MEINICKE, A.R.; ALMEIDA, A.M.; HERMES-LIMA, M.; VERCESI, A.E. Oxidative damage of mitochondria induced by Fe(II)citrate is potentiated by Ca^{2+} and includes lipid peroxidation and alterations in membrane proteins. **Arch Biochem Biophys**, 308: 158-63, 1994.

CATALDO, A.M.; BARNETT, J.L.; BERMAN, S.A.; LI, J.; QUARLESS, S.; BURSZTAJN, S.; LIPPA, C.; NIXON, R.A. Gene expression and cellular content of cathepsin D in Alzheimer's disease brain: evidence for early upregulation of endosomal-lysosomal system. **Neuron**, 14: 671-80, 1995.

CAVALLI, V.; VILBOIS, F.; CORTI, M.; MARCOTE, M.J.; TAMURA, K.; KARIN, M.; ARKINSTALL, S.; GRUENBERG, J. The stress-induced MAP kinase p38 regulates endocytic trafficking via the GDI:Rab5 complex. **Mol Cell**, 7: 421-32, 2001.

CLAPHAM, D.E. Intracellular calcium. Replenishing the stores. **Nature**, 375: 634-5, 1995.

COSTANTINI, L.C.; CHATURVEDI, P.; ARMISTEAD, D.M.; MCCAFFREY, P.G.; DEACON, T.W.; ISACSON, O. A novel immunophilin ligand: distinct branching effects on dopaminergic neurons in culture and neurotrophic actions after oral administration in an animal model of Parkinson's disease. **Neurobiol Dis**, 5: 97-106, 1998.

COSTANTINI, L.C.; ISACSON, O. Immunophilin ligands and GDNF enhance neurite branching or elongation from developing dopamine neurons in culture. **Exp Neurol**, 164: 60-70, 2000.

CROMPTON, M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. **Biochem J**, 341: 233-49, 1999.

- CROMPTON, M.; VIRJI, S.; DOYLE, V.; JOHNSON, N.; WARD, J.M. The mitochondrial permeability transition pore. **Biochem Soc Symp**, 66: 167-79, 1999.
- DAUER, W.; PRZEDBORSKI, S. Parkinson's disease: mechanisms and models. **Neuron**, 39: 889-909, 2003.
- DAWSON, T.M.; DAWSON, V.L. Neuroprotective and neurorestorative strategies for Parkinson's disease. **Nat Neurosci**, Suppl:1058-61, 2002.
- DAY, B.J.; PATEL, M.; CALAVETTA, L.; CHANG, L.Y.; STAMLER, J.S. A mechanism of paraquat toxicity involving nitric oxide synthase. **Proc Natl Acad Sci USA**, 96: 12760-5, 1999.
- de BOCK, F.; DERIJARD, B.; DORNAND, J.; BOCKAERT, J.; RONDOUIN, G. The neuronal death induced by endotoxic shock but not that induced by excitatory amino acids requires TNF- α . **Eur J Neurosci**, 10: 3107-14, 1998.
- de JONG, D.; PRINS, F.A.; MASON, D.Y.; REED, J.C.; VAN OMMEN, G.B.; KLUIN, P.M. Subcellular localization of the bcl-2 protein in malignant and normal lymphoid cells. **Cancer Res**, 54: 256-60, 1994.
- DE MEIS, L.; VIANNA, A.L. Energy interconversion by the Ca^{2+} -dependent ATPase of the sarcoplasmic reticulum. **Annu Rev Biochem**, 28: 275-92, 1979.
- DEGLI ESPOSTI, M. Inhibitors of NADH-ubiquinone reductase: an overview. **Biochim Biophys Acta**, 1364: 222-35, 1998.
- DEUMENS, R.; BLOKLAND, A.; PRICKAERTS, J. Modeling Parkinson's disease in rats: an evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. **Exp Neurol**, 175: 303-17, 2002.
- DI MONTE, D.; SANDY, M.S.; EKSTROM, G.; SMITH, M.T. Comparative studies on the mechanisms of paraquat and 1-methyl-4-phenylpyridine (MPP^+) cytotoxicity. **Biochem Biophys Res Commun**, 137: 303-9, 1986.
- DU, C.; FANG, M.; LI, Y.; LI, L.; WANG, X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. **Cell**, 102: 33-42, 2000.

- DUNN, W.A. Jr. Autophagy and related mechanism of lysosome-mediated protein degradation. **Trends Cell Biol**, 4: 139-43, 1994.
- DUNNETT, S.B.; BJÖRKLUND, A. Prospects for new restorative and neuroprotective treatments in Parkinson's disease. **Nature**, 399 Suppl: A32-9, 1999.
- ESPOSTI, M.D.; HATZINISIRIOU, I.; MCLENNAN, H.; RALPH, S. Bcl-2 and mitochondrial oxygen radicals. New approaches with reactive oxygen species-sensitive probes. **J Biol Chem**, 274: 29831-37, 1999.
- FEANY, M.B.; BENDER, W.W. A Drosophila model of Parkinson's disease. **Nature**, 404: 394-8, 2000.
- FERRANTE, R.J.; SCHULZ, J.B.; KOWALL, N.W.; BEAL, M.F. Systemic administration of rotenone produces selective damage in the striatum and globus pallidus, but not in the substantia nigra. **Brain Res**, 753: 157-62, 1997.
- FORNO, L.S.; DELANNEY, L.E.; IRWIN, I.; LANGSTON, J.W. Similarities and differences between MPTP-induced parkinsonism and Parkinson's disease. Neuropathologic considerations. **Adv Neurol**, 60: 600-8, 1993.
- FRIEDLANDER, R.M. Apoptosis and caspases in neurodegenerative diseases. **N Engl J Med**, 348: 1365-75, 2003.
- GARCIA-RUIZ, C.; COLELL, A.; MARI, M.; MORALES, A.; FERNANDEZ-CHECA, J.C. Direct effect of ceramide on the mitochondrial electron transport chain leads to generation of reactive oxygen species. Role of mitochondrial glutathione. **J Biol Chem**, 272: 11369-77, 1997.
- GIASSON, B.I.; DUDA, J.E.; QUINN, S.M.; ZHANG, B.; TROJANOWSKI, J.Q.; LEE, V.M. Neuronal alpha-synucleinopathy with severe movement disorder in mice expressing A53T human alpha-synuclein. **Neuron**, 34: 521-33, 2002.
- GORNALL, A.G.; BARDAWILL, C.J.; DAVID, M.M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. **J Biol Chem**, 177: 751-66, 1949.
- GRAHAM, D.G.; TIFFANY, S.M.; BELL, W.R. Jr; GUTKNECHT, W.F. Autoxidation versus covalent binding of quinones as the mechanism of toxicity of dopamine, 6-hydroxydopamine, and related compounds toward C1300 neuroblastoma cells in vitro. **Mol Pharmacol**, 14: 644-53, 1978.

- GREEN, D.R.; REED, J.C. Mitochondria and apoptosis. **Science**, 281: 1309-12, 1998.
- GRIJALBA, M.T.; VERCESI, A.E.; SCHEREIER, S. Ca^{2+} -induced increased lipid packing and domain formation in submitochondrial particles. A possible early step in the mechanism of Ca^{2+} -stimulated generation of reactive oxygen species by the respiratory chain. **Biochemistry**, 38: 13279-87, 1999.
- GRIMES, D.A.; BULMAN, D.E. Parkinson's genetics-creating exciting new insights. **Parkinsonism Relat Disord**, 6: 459-64, 2002.
- GULCIN, I.; BUYUKOKUROGLU, M.E.; KUFREVIOGLU, O.I. Metal chelating and hydrogen peroxide scavenging effects of melatonin. **J Pineal Res**, 34: 278-81, 2003.
- GUNTER, K.K.; GUNTER, T.E. Transport of calcium by mitochondria. **J Bioenerg Biomembr**, 26: 471-85, 1994.
- GUNTER, T.E.; PFEIFFER, D.R. Mechanisms by which mitochondria transport calcium. **Am J Physiol**, 258: C755-86, 1990.
- GUTTERIDGE, J.M.; HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. **Ann N Y Acad Sci**, 899: 136-47, 2000.
- HARPER, S.J.; LoGRASSO, P. Signalling for survival and death in neurones: the role of stress-activated kinases, JNK and p38. **Cell Signal**, 5: 299-310, 2001.
- HEDRICH, K.; DJARMATI, A.; SCHAFER, N.; HERING, R.; WELLENBROCK, C.; WEISS, P.H.; HILKER, R.; VIEREGGE, P.; OZELIUS, L.J.; HEUTINK, P.; BONIFATI, V.; SCHWINGER, E.; LANG, A.E.; NOTH, J.; BRESSMAN, S.B.; PRAMSTALLER, P.P.; RIESS, O.; KLEIN, C. DJ-1 (*PARK7*) mutations are less frequent than Parkin (*PARK2*) mutations in early-onset Parkinson disease. **Neurology**, 62: 389-94, 2004.
- JELLINGER, K.A. Recent developments in the pathology of Parkinson's disease. **J Neural Transm**, Suppl. 62: 347-76, 2002.
- JENNER, P.; OLANOW, C.W. Oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease. **Neurology**, 47 Suppl 3: 161-70, 1996.
- KAPLAN, R.S.; PEDERSEN, P.L. Characterization of phosphate efflux pathways in rat liver mitochondria. **Biochem J**, 212: 279-88, 1983.

- KAUL, M.; LIPTON, S.A. Chemokines and activated macrophages in HIV gp120-induced neuronal apoptosis. **Proc Natl Acad Sci USA**, 96: 8212-6, 1999.
- KAWASAKI, H.; MOROOKA, T.; SHIMOHAMA, S.; KIMURA, J.; HIRANO, T.; GOTOH, Y.; NISHIDA, E. Activation and involvement of p38 mitogen-activated protein kinase in glutamate-induced apoptosis in rat cerebellar granule cells. **J Biol Chem**, 272: 18518-21, 1997.
- KEGEL, K.B.; KIM, M.; SAPP, E.; MCINTYRE, C.; CASTANO, J.G.; ARONIN, N.; DIFLIGIA, M. Huntington expression stimulates endosomal-lysosomal activity, endosome tubulation, and autophagy. **J Neurosci**, 20: 7268-78, 2000.
- KERR, J.F.; WYLLIE, A.H.; CURRIE, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br J Cancer**, 26: 239-57, 1972.
- KIKUCHI, M.; TENNETI, L.; LIPTON, S.A. Role of p38 mitogen-activated protein kinase in axotomy-induced apoptosis of rat retinal ganglion cells. **J Neurosci**, 20: 5037-44, 2000.
- KITADA, T.; ASAKAWA, S.; HATTORI, N.; MATSUMINE, H.; YAMAMURA, Y.; MINOSHIMA, S.; YOKOCHI, M.; MIZUNO, Y.; SHIMIZU, N. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. **Nature**, 392: 605-8, 1998.
- KITAGAWA, K.; MATSUMOTO, M.; TSUJIMOTO, Y.; OHTSUKI, T.; KUWABARA, K.; MATSUSHITA, K.; YANG, G.; TANABE, H.; MARTINOU, J.C.; HORI, M.; YANAGIHARA, T. Amelioration of hippocampal neuronal damage after global ischemia by neuronal overexpression of Bcl-2 in transgenic mice. **Stroke**, 30: 2616-21, 1998.
- KLIONSKY, D.J.; EMR, S.D. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. **Science**, 290: 1717-21, 2000.
- KORNACK, D.R.; RAKIC, P. Cell proliferation without neurogenesis in adult primate neocortex. **Science**, 294: 2127-30, 2001.
- KORSCHING, S. The neurotrophic factor concept: a reexamination. **J Neurosci**, 13: 2739-48, 1993.

KOWALTOWSKI, A.J.; CASTILHO, R.F.; GRIJALBA, M.T.; BECHARA, E.J.; VERCESI, A.E. Effect of inorganic phosphate concentration on the nature of inner mitochondrial membrane alterations mediated by Ca^{2+} ions. A proposed model for phosphate-stimulated lipid peroxidation. **J Biol Chem**, 271: 2929-34, 1996.

KOWALTOWSKI, A.J.; CASTILHO, R.F.; VERCESI, A.E. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. **FEBS Lett**, 495: 12-5, 2001.

KOWALTOWSKI, A.J.; COSSO, R.G.; CAMPOS, C.B.; FISKUM, G. Effect of Bcl-2 overexpression on mitochondrial structure and function. **J Biol Chem**, 277: 42802-7, 2002.

KOWALTOWSKI, A.J.; NETTO, L.E.S.; VERCESI, A.E. The thiol specific antioxidant enzyme prevents mitochondrial permeability transition: Evidence for the reactive oxygen species in this mechanism. **J Biol Chem**, 273: 12766-9, 1998.

KOWALTOWSKI, A.J.; VERCESI, A.E. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. **Free Radic Biol Med**, 26: 463-71, 1999.

KOWALTOWSKI, A.J.; VERCESI, A.E.; FISKUM, G. Bcl-2 prevents mitochondrial permeability transition and cytochrome c release via maintenance of reduced pyridine nucleotides. **Cell Death Differ**, 10: 903-10, 2000.

KROEMER, G.; DALLAPORTA, B.; RESCHE-RIGON, M. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. **Annu Rev Physiol**, 60: 619-42, 1998.

KRUGER, R.; KUHN, W.; MULLER, T.; WOITALLA, D.; GRAEBER, M.; KOSEL, S.;

KYRIAKIS, J.M., AVRUCH, J. Sounding the alarm: protein kinase cascades activated by stress and inflammation. **J Biol Chem**, 271: 24313-6, 1996.

KYRIAKIS, J.M.; BANERJEE, P.; NIKOLAKAKI, E.; DAI, T.; RUBIE, E.A.; AHMAD, M.F.; AVRUCH, J.; WOODGETT, J.R. The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. **Nature**, 369: 156-60, 1994.

LANG, A.E.; LOZANO, A.M. Parkinson's disease. **N Engl J Med**, 339: 1130-43, 1998.

- LANG, A.E; LOZANO, A.M. Parkinson's disease. *N Engl J Med*, 339: 1044-53, 1998.
- LANGSTON, J.W.; BALLARD, P.; TETRUD, J.W.; IRWIN, I. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science*, 219: 979-80, 1983.
- LAPORTE, N.; ST-HILAIRE, M.; MARTINOLI, M.G.; BLANCHET, J.; GOULD, P.; ROUILLARD, C.; CICHETTI, F. Rotenone induces non-specific central nervous system and systemic toxicity. *FASEB J*, 6: 717-9, 2004.
- LAZIC, S.E.; BARKER, R.A. The future of cell-based transplantation therapies for neurodegenerative disorders. *J Hematother Stem Cell Res*, 12: 635-42, 2003.
- LeBEL, C.P.; ISCHIROPOULOS, H.; BONDY, S.C. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol*, 5: 227-31, 1992.
- LEE, M.K.; STIRLING, W.; XU, Y.; XU, X.; QUI, D.; MANDIR, A.S.; DAWSON, T.M.; COPELAND, N.G.; JENKINS, N.A.; PRICE, D.L. Human alpha-synuclein-harboring familial Parkinson's disease-linked Ala-53 --> Thr mutation causes neurodegenerative disease with alpha-synuclein aggregation in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99: 8968-73, 2002.
- LEIST, M.; JÄÄTELLÄ, M. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2: 589-98, 2001.
- LEIST, M.; NICOTERA, P. Apoptosis, excitotoxicity, and neuropathology. *Exp Cell Res*, 239: 183-201, 1998.
- LEROY, E.; BOYER, R.; AUBURGER, G.; LEUBE, B.; ULM, G.; MEZEY, E.; HARTA, G.; BROWNSTEIN, M.J.; JONNALAGADA, S.; CHERNOVA, T.; DEHEJIA, A.; LAVEDAN, C.; GASSER, T.; STEINBACH, P.J.; WILKINSON, K.D.; POLYMERPOULOS, M.H. The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. *Nature*, 395: 451-2, 1998.
- LINDVALL, O. Neural transplantation: a hope for patients with Parkinson's disease. *NeuroReport*, 8: iii-x, 1997.

- LIPTON, P. Ischemic cell death in brain neurons. **Physiol Rev**, 79: 1431-568, 1999.
- LIU, X.; KIM, C.N.; YANG, J.; JEMMERSON, R.; WANG, X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. **Cell**, 86: 147-57, 1996.
- LIU, Y.; FISKUM, G.; SCHUBERT, D. Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. **J Neurochem**, 80: 780-7, 2002.
- LOTHARIUS, J.; BRUNDIN, P. Pathogenesis of Parkinson's disease: dopamine, vesicles and alpha-synuclein. **Nat Rev Neurosci**, 3: 932-42, 2002.
- LOTHARIUS, J.; DUGAN, L.L.; O'MALLEY, K.L. Distinct mechanisms underlie neurotoxin-mediated cell death in cultured dopaminergic neurons. **J Neurosci**, 19: 1284-93, 1999.
- MACIEL, E.N.; VERCESI, A.E.; CASTILHO, R.F. Oxidative stress in Ca^{2+} -induced membrane permeability transition in brain mitochondria. **J Neurochem**, 79: 1237-45, 2001.
- 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**, 115: 333-42, 1992.
- MANNING-BOG, A.B.; McCORMACK, A.L.; LI, J.; UVERSKY, V.N.; FINK, A.L.; DI MONTE DA. The herbicide paraquat causes up-regulation and aggregation of alpha-synuclein in mice: paraquat and alpha-synuclein. **J Biol Chem**, 277: 1641-4, 2002.
- MAROTEAUX, L.; CAMPANELLI, J.T.; SCHELLER, R.H. Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal. **J Neurosci**, 8: 2804-15, 1988.
- MARTINOU, J.C.; DUBOIS-DAUPHIN, M.; STAPLE, J.K.; RODRIGUEZ, I.; FRANKOWSKI, H.; MISSOTTEN, M.; ALBERTINI, P.; TALABOT, D.; CATSICAS, S.; PIETRA, C.; et al. Overexpression of BCL-2 in transgenic mice protects neurons from naturally occurring cell death and experimental ischemia. **Neuron**, 4: 1017-3, 1994.

MATSUOKA, Y.; VILA, M.; LINCOLN, S.; MCCORMACK, A.; PICCIANO, M.; LAFRANCOIS, J.; YU, X.; DICKSON, D.; LANGSTON, W.J.; MCGOWAN, E.; FARRER, M.; HARDY, J.; DUFF, K.; PRZEDBORSKI, S.; DI MONTE, D.A. Lack of nigral pathology in transgenic mice expressing human alpha-synuclein driven by the tyrosine hydroxylase promoter. **Neurobiol Dis**, 8: 535-9, 2001.

MATSUURA, K.; MAKINO, H.; OGAWA, N. Cyclosporin A attenuates the decrease in tyrosine hydroxylase immunoreactivity in nigrostriatal dopaminergic neurons and in striatal dopamine content in rats with intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine. **Exp Neurol**, 146: 526-35, 1997.

MATTSON, M.P. Apoptosis in neurodegenerative disorders. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 1: 120-9, 2000.

MIELKE, K.; HERDEGEN, T. JNK and p38 stresskinases-degenerative effectors of signal-transduction-cascades in the nervous system. **Prog Neurobiol**, 61: 45-60, 2000.

MITCHELL, P. Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. **Biol Rev Camb Philos Soc**, 3: 445-502, 1966.

MURPHY, A.N.; BREDESEN, D.E.; CORTOPASSI, G.; WANG, E.; FISKUM, G. Bcl-2 potentiates the maximal calcium uptake capacity of neuronal cell mitochondria. **Proc Natl Acad Sci USA**, 93: 9893-8, 1996.

MURPHY, D.D.; RUETER, S.M.; TROJANOWSKI, J.Q.; LEE, V.M. Synucleins are developmentally expressed, and alpha-synuclein regulates the size of the presynaptic vesicular pool in primary hippocampal neurons. **J Neurosci**, 20: 3214-20, 2000.

NAKAO, N.; FRODL, E.M.; DUAN, W.M.; WIDNER, H.; BRUNDIN, P. Lazaroids improve the survival of grafted rat embryonic dopamine neurons. **Proc Natl Acad Sci USA**, 91: 12408-12, 1994.

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

NICHOLLS, D.G.; SCOTT, I.D. The regulation of brain mitochondrial calcium-ion transport. The role of ATP in the discrimination between kinetic and membrane-potential-dependent calcium-ion efflux mechanisms. **Biochem J** 186: 833-9, 1980.

NICOTERA, P.; LIPTON, S.A. Excitotoxins in neuronal apoptosis and necrosis. **J Cereb Blood Flow Metab**, 19: 583-91, 1999.

OHSUMI, Y. Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 2: 211-6, 2001.

OKAMOTO, S.; KRAINIC, D.; SHERMAN, K.; LIPTON, S.A. Antiapoptotic role of the p38 mitogen-activated protein kinase-myocyte enhancer factor 2 transcription factor pathway during neuronal differentiation. **Proc Natl Acad Sci USA**, 97: 7561-6, 2000.

OLANOW, C.W.; TATTON, W.G. Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. **Annu Rev Neurosci**, 22: 123-44, 1999.

ORRENIUS, S.; ZHIVOTOVSKY, B.; NICOTERA, P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 4: 552-65, 2003.

PARKINSON, J. An essay on the shaking palsy. 1817. **J Neuropsychiatry Clin Neurosci**, 14: 223-36, 2002.

PETTMANN, B.; HENDERSON, C.E. Neuronal cell death. **Neuron**, 20: 633-47, 1998.

POLYMERPOULOS, M.H.; LAVEDAN, C.; LEROY, E.; IDE, S.E.; DEHEJIA, A.; DUTRA, A.; PIKE, B.; ROOT, H.; RUBENSTEIN, J.; BOYER, R.; STENROOS, E.S.; CHANDRASEKHARAPPA, S.; ATHANASSIADOU, A.; PAPAPETROPOULOS, T.; JOHNSON, W.G.; LAZZARINI, A.M.; DUVOISIN, R.C.; DI IORIO, G.; GOLBE, L.I.; NUSSBAUM, R.L. Mutation in the alpha-synuclein identified in families with Parkinson's disease. **Science**, 276: 2045-47, 1997.

PRZEDBORSKI, S.; JACKSON-LEWIS, V. Experimental developments in movement disorders: update on proposed free radical mechanisms. **Curr Opin Neurol**, 11: 335-9, 1998.

PRZUNTEK, H.; EPPLEN, J.T.; SCHOLS, L.; RIESS, O. Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. **Nat Genet**, 18: 106-8, 1998.

- RAVAGNAN, L.; ROUMIER, T.; KROEMER, G. Mitochondria, the killer organelles and their weapons. **J Cell Physiol**, 192: 131-7, 2002.
- REITER, R.J.; TAN, D.X.; MAYO, J.C.; SAINZ, R.M.; LEON, J.; CZARNOCKI, Z. Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans. **Acta Biochim Pol**, 50: 1129-46, 2003.
- ROSENBLAD, C.; MARTINEZ-SERRANO, A.; BJÖRKLUND, A. Intrastriatal glial cell line-derived neurotrophic factor promotes sprouting of spared nigrostriatal dopaminergic afferents and induces recovery of function in a rat model of Parkinson's disease. **Neuroscience**, 82: 129-37, 1998.
- ROSENTHAL, R.E.; HAMUD, F.; FISKUM, G.; VARGHESE, P.J.; SHARPE, S. Cerebral ischemia and reperfusion: prevention of brain mitochondrial injury by lidoflazine. **J Cereb Blood Flow Metab**, 7: 752-8, 1987.
- ROZOV, S.V.; Filatova, E.V.; ORLOV, A.A.; VOLKOVA, A.V.; ZHLOBA, A.R.; BLASHKO, E.L.; POZDEYEV, N.V. N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine is a product of melatonin oxidation in rats. **J Pineal Res**, 35: 245-50, 2003.
- SANBERG, P.R.; BRUNDIN, P. Cell transplantation and neuroscience. **Cell Transplant**, 8: 3-6, 1999.
- SAUER, H.; OERTEL, W.H. Progressive degeneration of nigrostriatal dopamine neurons following intrastriatal terminal lesions with 6-hydroxydopamine: a combined retrograde tracing and immunocytochemical study in the rat. **Neuroscience**, 59: 401-15, 1994.
- 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**, 54: 823-7, 1990.
- 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**, 54: 823-7, 1990a.
- SCHAPIRA, A.H.; COOPER, J.M.; DEXTER, D.; JENNER, P.; CLARK, J.B.; MARSDEN, C.D. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. **Lancet**, 1: 1269, 1989.

SCHAPIRA, A.H.; MANN, V.M.; COOPER, J.M.; DEXTER, D.; DANIEL, S.E.; JENNER, P.; CLARK, J.B.; MARSDEN, C.D. Anatomic and disease specificity of NADH CoQ1 reductase (complex I) deficiency in Parkinson's disease. **J Neurochem**, 55: 2142-5, 1990b.

SCHENDEL, S.L.; XIE, Z.; MONTAL, M.O.; MATSUYAMA, S.; MONTAL, M.; REED, J.C. Channel formation by antiapoptotic protein Bcl-2. **Proc Natl Acad Sci USA**, 94: 5113-8, 1997.

SCHMIDT, R.H.; BJORKLUND, A.; STENEVI, U. Intracerebral grafting of dissociated CNS tissue suspensions: a new approach for neuronal transplantation to deep brain sites. **Brain Res**, 218: 347-56, 1981.

SEATON, T.A.; COOPER, J.M.; SCHAPIRA, A.H. Free radical scavengers protect dopaminergic cell lines from apoptosis induced by complex I inhibitors. **Brain Res**, 777: 110-8, 1997.

SKULACHEV, V.P. Role of uncoupled and non-coupled oxidations in maintenance of safely low levels of oxygen and its one-electron reductants. **Q Rev Biophys**, 29: 169-202, 1996.

SMALLI, S.S.; HSU, Y.T.; CARVALHO, A.C.; ROSENSTOCK, T.R.; SHARPE, J.C.; YOULE, R.J. Mitochondria, calcium and pro-apoptotic proteins as mediators in cell death signaling. **Braz J Med Biol Res**, 36: 183-90, 2003.

SNYDER, S.H.; LAI, M.M.; BURNETT, P.E. Immunophilins in the nervous system. **Neuron**, 21: 283-94, 1998.

SORRENTINO, V.; VOLPE, P. Ryanodine receptors: how many, where and why? **Trends Pharmacol Sci**, 14: 98-103, 1993.

STARKOV, A.A.; POLSTER, B.M.; FISKUM, G. Regulation of hydrogen peroxide production by brain mitochondria by calcium and Bax. **J Neurochem**, 83: 220-8, 2002.

STEFANIS, L.; LARSEN, K.E.; RIDEOUT, H.J.; SULZER, D.; GREENE, L.A. Expression of A53T mutant but not wild-type alpha-synuclein in PC12 cells induces alterations of the ubiquitin-dependent degradation system, loss of dopamine release, and autophagic cell death. **J Neurosci**, 21: 9549-60, 2001.

STEINER, J.P.; CONNOLLY, M.A.; VALENTINE, H.L.; HAMILTON, G.S.; DAWSON, T.M.; HESTER, L.; SNYDER, S.H. Neurotrophic actions of nonimmunosuppressive analogues of immunosuppressive drugs FK506, rapamycin and cyclosporin A. *Nat Med*, 3: 421-8, 1997.

TAKAHASHI, T.; TANAKA, M.; BRANNAN, C.I.; JENKINS, N.A.; COPELAND, N.G.; SUDA, T.; NAGATA, S. Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand. *Cell*, 76: 969-76, 1994.

TAKASHIMA, A.; KOIKE, T. Relationship between dopamine content and its secretion in PC12 cells as a function of cell growth. *Biochim Biophys Acta*, 847: 101-7, 1985.

TAKEDA, K.; ICHIJO, H. Neuronal p38 MAPK signalling: an emerging regulator of cell fate and function in the nervous system. *Genes Cells*, 7: 1099-111, 2002.

TAN, D.X.; MANCHESTER, L.C.; REITER, R.J.; PLUMMER, B.F.; LIMSON, J.; WEINTRAUB, S.T.; QI, W. Melatonin directly scavenges hydrogen peroxide: a potentially new metabolic pathway of melatonin biotransformation. *Free Radic Biol Med*, 29: 1177-85, 2000.

TANAKA, Y.; ENGELENDER, S.; IGARASHI, S.; RAO, R.K.; WANNER, T.; TANZI, R.E.; SAWA, A.L.; DAWSON, V.; DAWSON, T.M.; ROSS, C.A. Inducible expression of mutant alpha-synuclein decreases proteasome activity and increases sensitivity to mitochondria-dependent apoptosis. *Hum Mol Genet*, 10: 919-26, 2001.

THORNBERRY, N.A.; LAZEBNIK, Y. Caspases: enemies within. *Science*, 281: 1312-6, 1998.

TRANZER, J.P.; THOENEN, H. Electronmicroscopic localization of 5-hydroxydopamine (3,4,5-trihydroxy-phenyl-ethylamine), a new 'false' sympathetic transmitter. *Experientia*, 23: 743-5, 1967.

TSUJIMOTO, M.; YIP, Y.K.; VILCEK, J. Tumor necrosis factor: specific binding and internalization in sensitive and resistant cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 82: 7626-30, 1985.

TURRENS, J.F. Superoxide production by mitochondrial respiratory chain. **Biosci Rep**, 17: 3-8, 1997.

TURRENS, J.F.; BOVERIS, A. Generation of the superoxide anion by NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. **Biochem J**, 191: 421-7, 1980.

TYMIANSKI, M.; CHARLTON, M.P.; CARLEN, P.L.; TATOR, C.H. Source specificity of early calcium neurotoxicity in cultured embryonic spinal neurons. **J Neurosci**, 13: 2085-104, 1993.

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

VANECEK, J. Cellular mechanisms of melatonin action. **Physiol Rev**, 3: 687-721, 1998.

VANECEK, J.; KLEIN, D.C. Melatonin inhibits gonadotropin-releasing hormone-induced elevation of intracellular Ca^{2+} in neonatal rat pituitary cells. **Endocrinology**, 130: 701-7, 1992.

VAUX, D.L.; CORY, S.; ADAMS, J.M. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. **Nature**, 335: 440-2, 1988.

VERCESI, A.E.; KOWALTOWSKI, A.J.; GRIJALBA, M.T.; MEININKE, A.R.; CASTILHO, R.F. The role of reactive oxygen species in mitochondrial permeability transition. **Biosci Rep**, 17: 43-52, 1997.

VOTYAKOVA, T.V.; REYNOLDS, I.J. DeltaPsi(m)-Dependent and -independent production of reactive oxygen species by rat brain mitochondria. **J Neurochem**, 79: 266-77, 2001.

WEBB, J.L.; RAVIKUMAR, B.; ATKINS, J.; SKEPPER, J.N.; RUBINSZTEIN, D.C. Alpha-Synuclein is degraded by both autophagy and the proteasome. **J Biol Chem**, 278: 25009-13, 2003.

WENNBERG, L.; CZECH, K.A.; LARSSON, L.C.; MIRZA, B.; BENNET, W.; SONG,

Z.; WIDNER, H. Effects of immunosuppressive treatment on host responses against intracerebral porcine neural tissue xenografts in rats. **Transplantation**, 71: 1797-806, 2001.

WOLF, B.B.; GREEN, D.R. Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases. **J Biol Chem**, 274: 20049-52, 1999.

WYLLIE, A.H.; KERR, J.F.; CURRIE, A.R. Cell death: the significance of apoptosis. **Int Rev Cytol**, 68: 251-306, 1980.

ZAWADA, W.M.; MEINTZER, M.K.; RAO, P.; MAROTTI, J.; WANG, X.; ESPLIN, J.E.; CLARKSON, E.D.; FREED, C.R.; HEIDENREICH, K.A. Inhibitors of p38 MAP kinase increase the survival of transplanted dopamine neurons. **Brain Res**, 891: 185-96, 2001.

ZHANG, Y.; DAWSON, V.L.; DAWSON, T.M. Oxidative stress and genetics in the pathogenesis of Parkinson's disease. **Neurobiol Dis**, 7: 240-50, 2000.

ZHOU, M.; PANCHUK-VOLOSHINA, N. A one-step fluorometric method for the continuous measurement of monoamine oxidase activity. **Anal Biochem**, 253: 169-74, 1997.

ZIMMERMANN, K.C.; BONZON, C.; GREEN, D.R. The machinery of programmed cell death. **Pharmacol Ther**, 92: 57-70, 2001.

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

ZOROV, D.B.; FILBURN, C.R.; KLOTZ, L.O.; ZWEIER, J.L.; SOLLOTT, S.J. Reactive oxygen species (ROS)-induced ROS release: a new phenomenon accompanying induction of the mitochondrial permeability transition in cardiac myocytes. **J Exp Med**, 192: 1001-14, 2000.

8 - ANEXO

ANEXO 1

Trabalho Publicado: "Ca²⁺-induced oxidative stress in brain mitochondria treated with the respiratory chain inhibitor rotenone", autoria de Solange C. Sousa, Evelise N. Maciel, Anibal E. Vercesi e Roger F. Castilho. ***FEBS Letters*** 543: 179-183, 2003.

Ca²⁺-induced oxidative stress in brain mitochondria treated with the respiratory chain inhibitor rotenone

Solange C. Sousa, Evelise N. Maciel, Anibal E. Vercesi, Roger F. Castilho*

Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP 13083-970, Brazil

Received 28 February 2003; revised 4 April 2003; accepted 14 April 2003

First published online 29 April 2003

Edited by Vladimir Skulachev

Abstract In this study we show that micromolar Ca²⁺ concentrations (>10 μM) strongly stimulate the release of reactive oxygen species (ROS) in rotenone-treated isolated rat forebrain mitochondria. Ca²⁺-stimulated mitochondrial ROS release was associated with membrane lipid peroxidation and was directly correlated with the degree of complex I inhibition by rotenone. On the other hand, Ca²⁺ did not increase mitochondrial ROS release in the presence of the complex I inhibitor 1-methyl-4-phenylpyridinium. Cyclosporin A had no effect on Ca²⁺-stimulated mitochondrial ROS release in the presence of rotenone, indicating that mitochondrial permeability transition is not involved in this process. We hypothesized that Ca²⁺-induced mitochondrial oxidative stress associated with partial inhibition of complex I may be an important factor in neuronal cell death observed in the neurodegenerative disorder Parkinson's disease. © 2003 Published by Elsevier Science B.V. on behalf of the Federation of European Biochemical Societies.

Key words: Brain mitochondrion; Calcium; Free radical; Parkinson's disease; Rotenone

1. Introduction

Post mortem studies have shown evidence that oxidative stress and mitochondrial dysfunction are involved in the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease (PD). Indications of oxidative stress include depletion of reduced glutathione, iron accumulation and the presence of lipid, protein and DNA oxidation products [1–3]. Mitochondrial dysfunction is mainly suggested by a partial inhibition (20–40%) of respiratory chain complex I activity [4,5], present also in peripheral tissues [6,7].

Recently Betarbet and collaborators [8] showed that chronic treatment of rats with the mitochondrial complex I inhibitor rotenone results in selective nigrostriatal dopaminergic degeneration, including formation of Lewy bodies and cell loss. However, the concentration of rotenone found in the rat brains was insufficient to substantially inhibit mitochondrial

respiration [8], indicating that a bioenergetic defect with ATP depletion could not explain the reported neurodegeneration. Under these conditions, an increased mitochondrial production of reactive oxygen species (ROS) secondary to partial inhibition of complex I could contribute to rotenone-induced nigrostriatal dopaminergic degeneration [9,10]. This experimental model for PD resembles the classical selective degeneration of dopaminergic neurons obtained by systematic treatment of primates and rodents with *N*-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) (for a review see [11]). MPTP toxicity for dopaminergic neurons occurs when it is converted to the active neurotoxin, 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP⁺), an inhibitor of mitochondrial respiratory chain complex I [11,12].

Glutamate receptor-mediated neuronal cell death – i.e. excitotoxicity – has been hypothesized to be involved in the pathogenesis of PD [13,14]. In excitotoxicity, Ca²⁺ influx to the cytosol is correlated with cellular toxicity [15,16]. In this paper, we study the effect of Ca²⁺ on rotenone-treated isolated rat forebrain mitochondria. The results indicate that micromolar Ca²⁺ concentrations induce mitochondrial oxidative stress in the presence of rotenone. The possible implications of this observation for the progressive neurodegeneration observed in PD are discussed.

2. Materials and methods

2.1. Mitochondrial isolation

Mitochondria were isolated by conventional differential centrifugation from forebrains of adult female Wistar strain rats as described by Rosenthal et al. [17]. Digitonin was used to disrupt synaptosomal membranes and release any mitochondria trapped within. The final pellet was resuspended in medium containing 225 mM mannitol, 75 mM sucrose, 5 mM K⁺-HEPES pH 7.2 and 1 mg/ml bovine serum albumin, at an approximate protein concentration of 30–40 mg/ml. Rat liver and gastrocnemius muscle mitochondria were isolated by the same procedure described above for forebrain mitochondria, including the addition of digitonin to the second pellet.

2.2. Standard incubation procedure

The experiments were carried out at 28°C, with continuous magnetic stirring, in a standard reaction medium containing 100 mM sucrose, 65 mM KCl, 10 mM K⁺-HEPES buffer (pH 7.2), 50 μM EGTA, 1 mM P_i, 2 mM Mg²⁺, 5 mM malate, 10 mM pyruvate, 200 μM ATP and 1 μg/ml oligomycin. Other additions are indicated in the figure legends. The results shown are representative of a series of at least four experiments, using different mitochondrial preparations. The results were reproduced within 10% of variation.

2.3. Oxygen uptake measurements

Oxygen consumption was measured using a Clark-type electrode (Yellow Springs Instruments, OH, USA) in 1.3 ml of standard reac-

*Corresponding author. Fax: (55)-19-3788 9434.

E-mail address: roger@fcm.unicamp.br (R.F. Castilho).

Abbreviations: DCF, dichlorofluorescein; FCCP, carbonyl cyanide-*p*-trifluoromethoxyphenyl hydrazone; H₂-DCFDA, dichlorodihydrofluorescein diacetate; MPP⁺, 1-methyl-4-phenylpyridinium; MPT, mitochondrial permeability transition; PD, Parkinson's disease; ROS, reactive oxygen species; TBARS, thiobarbituric acid reactive substances

tion medium, in a sealed glass cuvette equipped with a magnetic stirrer.

2.4. Estimation of mitochondrial ROS release

Mitochondrial release of ROS (H_2O_2) was determined spectrofluorometrically, using the membrane-permeable fluorescent dye dichlorodihydrofluorescein diacetate (H_2 -DCFDA; 1 μ M) [18,19]. Fluorescence was determined at 488 nm for excitation and 525 nm for emission. Calibration was performed by adding known concentrations of dichlorofluorescein (DCF), the product of H_2 -DCF oxidation. Alternatively ROS were measured using either 200 nM MitoTracker® Red CM-H₂XROS, at 579 nm for excitation and 599 nm for emission; 1 μ M scopoletin plus 1 μ M horseradish peroxidase, at 365 nm for excitation and 450 nm for emission; or 50 μ M Amplex Red plus 0.025 μ M horseradish peroxidase [20], at 563 nm for excitation and 587 nm for emission. The rate of mitochondrial H_2O_2 release detected under control conditions when using the horseradish peroxidase substrates scopoletin and Amplex Red was 42 ± 6 and 245 ± 26 pmol H_2O_2 /min/mg, respectively.

2.5. Determination of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)

TBARS production in mitochondria was measured as described by Maciel et al. [19].

2.6. Materials

Most chemicals, including ATP, antimycin A, cyclosporin A, digitonin, HEPES, malic acid, MPP⁺, myxothiazol, pyruvic acid, rotenone (R-8875, minimum 95%), scopoletin and thiobarbituric acid were obtained from Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA). Amplex Red, H_2 -DCFDA and MitoTracker Red CM-H₂XROS were purchased from Molecular Probes (Eugene, OR, USA). Rotenone was prepared at a stock concentration of 1 mM in 100% ethanol.

3. Results

Mitochondrial ROS release was measured using the mem-

brane-permeable probe H_2 -DCFDA, which is oxidized mainly by H_2O_2 and peroxynitrite [18,21] generating highly fluorescent DCF. The results in Fig. 1A show that the addition of Ca^{2+} to isolated rat brain mitochondria treated with rotenone strongly stimulates ROS detection (line d). A fast increase in the rate of DCF production was observed 3–5 min after Ca^{2+} addition. Rotenone alone did not increase the rate of DCF production (line b) while only Ca^{2+} addition in the absence of rotenone slightly stimulates ROS detection (line c). Similar results were obtained using the mitochondrial respiratory substrates glutamate/malate instead of pyruvate/malate (results not shown). The increased release of ROS promoted by rotenone and Ca^{2+} was completely blocked by Ca^{2+} removal by EGTA (Fig. 1B, line b) or by the H_2O_2 -removing system ebselen plus glutathione (line c). In Fig. 1C, we tested the effect of Ca^{2+} on brain mitochondria treated with the complex I inhibitor MPP⁺, a classical dopaminergic neurotoxin [11]. Interestingly, MPP⁺ alone increased the rate of DCF production (line b) without any further stimulatory effect of Ca^{2+} addition (line c). The results of Fig. 1D show the effect of different concentrations of Ca^{2+} (rotenone at 100 nM) and different concentrations of rotenone (free Ca^{2+} at 50 μ M) on H_2 -DCF oxidation.

Since a partial inhibition (20–40%) of mitochondrial complex I activity has been detected in PD patients [4,5,7], we tested if a partial inhibition of mitochondrial respiration by rotenone would increase the rate of ROS release in the presence of Ca^{2+} . The results of Fig. 2A show that, under our experimental conditions, 5 nM rotenone results in 30–40% inhibition of uncoupled mitochondrial respiration supported by NADH-linked substrates. Using this rotenone concentra-

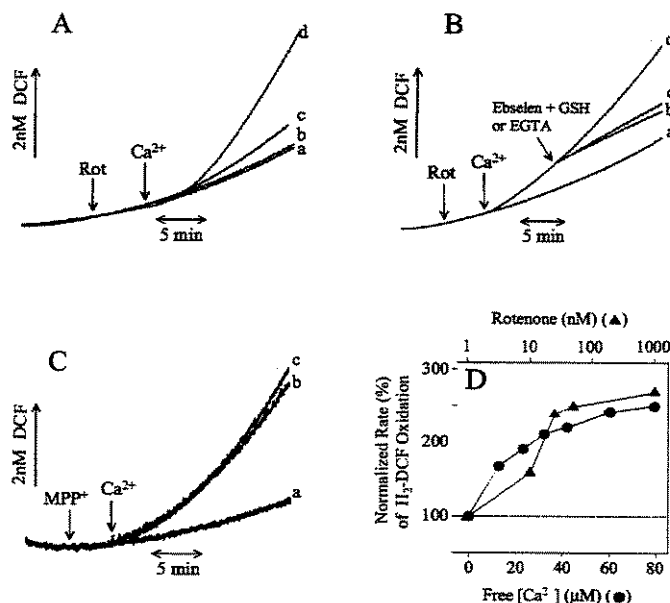


Fig. 1. Ca^{2+} -induced increase in ROS release in isolated brain mitochondria treated with rotenone: effect of rotenone and Ca^{2+} concentrations. Isolated forebrain mitochondria (0.5 mg/ml) were added to standard reaction medium containing 1 μ M H_2 -DCFDA. In A, 50 nM rotenone (lines b and d) and 120 μ M Ca^{2+} (lines c and d) were added to the experiments where indicated by the arrows. In B, 50 nM rotenone (lines b, c and d), 120 μ M Ca^{2+} (lines b, c and d), 10 μ M ebselen plus 200 μ M glutathione (line b) and 500 μ M EGTA (line c) were added to the experiments where indicated by the arrows. In C, 1 mM MPP⁺ (lines b and c) and 120 μ M Ca^{2+} (line c) were added where indicated by the arrows. Panel D shows the effect of different concentrations of rotenone (free Ca^{2+} at 50 μ M) (▲) and different concentrations of Ca^{2+} (rotenone at 100 nM) (●) on H_2 -DCF oxidation. Lines a represent control experiments without the addition of rotenone, MPP⁺ and Ca^{2+} .

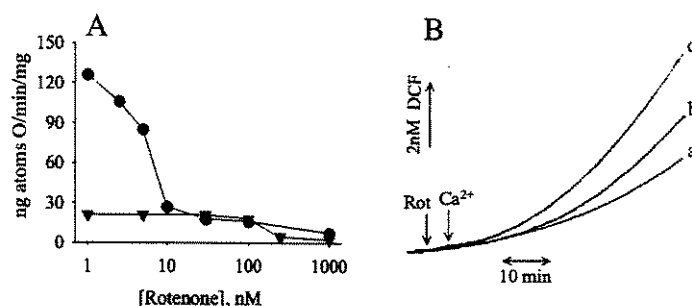


Fig. 2. A partial respiratory chain inhibition by rotenone results in mitochondrial oxidative stress in the presence of Ca^{2+} . In A, forebrain mitochondria (0.5 mg/ml) were incubated in standard reaction medium, without ATP and oligomycin, in the absence ($\blacktriangledown$) or presence of 1 mM ADP ($\bullet$). In B, forebrain mitochondria (0.5 mg/ml) were incubated in standard reaction medium, 5 nM rotenone (line c) and 120 μM Ca^{2+} (lines b and c) were added where indicated by the arrows. Line a represents a control experiment without the addition of rotenone and Ca^{2+} .

tion, in the presence of Ca^{2+} , we observed a nearly 200% increase in the rate of the detection of mitochondrially generated ROS (Fig. 2B).

The effect of cyclosporin A, an inhibitor of mitochondrial permeability transition (MPT; for a review see [22]), was tested on mitochondrial ROS release (Fig. 3). Cyclosporin A had no inhibitory effect on rotenone plus Ca^{2+} -induced increased release of ROS (line c), indicating that MPT is not involved in this process. In addition, the results of Fig. 3 show that the protonophore carbonyl cyanide-*p*-trifluoromethoxyphenyl hydrazone (FCCP; line d) does not inhibit Ca^{2+} plus rotenone-induced increased release of mitochondrial ROS, and the mitochondrial respiratory chain inhibitors antimycin A (line e) and myxothiazol (line f) do not substitute rotenone in stimulating mitochondrial ROS release in the presence of Ca^{2+} . Interestingly Ca^{2+} slightly inhibited antimycin A-stimulated mitochondrial ROS release (result not shown).

In Fig. 4, mitochondrial ROS release was measured using the membrane-permeable fluorescent dye Mito-Tracker Red CM-H₂XROS (Fig. 4A), or the fluorescent peroxidase substrates scopoletin (Fig. 4B) and Amplex Red (Fig. 4C), in order to guarantee that the results obtained with H₂-DCFDA were accurate. The presence of rotenone plus Ca^{2+} strongly stimulated ROS detection using any of these methods, while rotenone in the absence of Ca^{2+} resulted in a smaller stimulatory effect on ROS detection that was more pronounced when using Amplex Red. Ca^{2+} alone did not increase the rate of ROS detection. The results obtained with Mito-Tracker Red and Amplex Red (Fig. 4A,C) are in accordance with recent reports showing a stimulatory effect of rotenone on mitochondrial ROS release [10,23].

Mitochondrial lipid peroxidation was quantified in order to study a possible correlation between Ca^{2+} plus rotenone-induced increased release of ROS and membrane damage (Fig. 5). Incubation of brain mitochondria in the presence of Ca^{2+} plus rotenone increased the basal content of TBARS three- to four-fold, while either Ca^{2+} or rotenone had no significant effect on the basal content of TBARS.

4. Discussion

In the present work, we report that micromolar Ca^{2+} concentrations in the presence of rotenone strongly increase the detection of ROS production in isolated rat forebrain mitochondria. This Ca^{2+} effect was dose dependent, while the ef-

fect of rotenone was correlated with the degree of inhibition of uncoupled (respiratory state 3) mitochondrial respiration (Figs. 1 and 2). Mitochondrial oxidative damage was evidenced by increased membrane lipid peroxidation in the presence of Ca^{2+} plus rotenone (Fig. 5). The effect of Ca^{2+} and rotenone on mitochondrial ROS release was only observed for isolated forebrain mitochondria, and not for organelles isolated from two other tissues, liver and muscle (results not shown). Although we have no plausible explanation for the selective effect of Ca^{2+} plus rotenone to brain mitochondria, this effect correlates with the selective pathology of PD to the nervous system [1,24].

Interestingly, Ca^{2+} did not stimulate MPP⁺-induced increase in mitochondrial ROS release (Fig. 1), and Ca^{2+} did not stimulate ROS release in brain mitochondria treated with antimycin A or myxothiazol, inhibitors of respiratory chain complex III (Fig. 3). These results suggest that the effect of Ca^{2+} on increasing ROS release under a condition of partial inhibition of the mitochondrial respiratory chain may be specific for the rotenone-sensitive site of complex I. The ability of Ca^{2+} to stimulate mitochondrial ROS generation may be at-

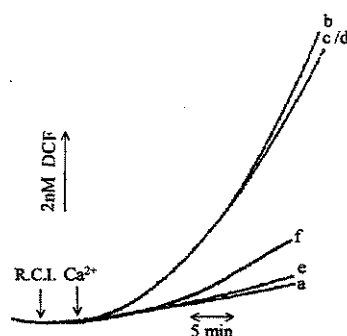


Fig. 3. Effect of cyclosporin A, FCCP and respiratory chain inhibitors on mitochondrial ROS release in the presence of Ca^{2+} . Forebrain mitochondria (0.5 mg/ml) were added to standard reaction medium containing 1 μM cyclosporin A (line c), 1 μM FCCP (line d), or no other additions (lines a, b, e and f). Mitochondrial respiratory chain inhibitors (R.C.I.), 50 nM rotenone (lines b–d), 0.5 μM antimycin A (line e) or 0.5 μM myxothiazol (line f) were added where indicated by the arrow. Ca^{2+} was added to the experiments represented by lines b–f where indicated by the arrow. Line a represents a control experiment without the addition of respiratory chain inhibitors and Ca^{2+} .

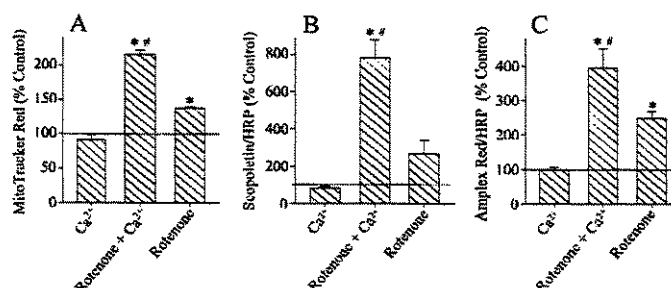


Fig. 4. Rotenone plus Ca^{2+} -induced increase in detection of ROS in isolated brain mitochondria: measurement of ROS using different methods. Forebrain mitochondria (0.5 mg/ml) were incubated in standard reaction medium containing 200 nM MitoTracker Red CM-H₂XROS (A), 1 μM scopoletin plus 1 μM horseradish peroxidase (B) or 50 μM Amplex Red plus 0.025 μM horseradish peroxidase (C). Rotenone (50 nM) and/or 120 μM Ca^{2+} were added to the experiments as indicated in the figure. Values represent averages of three to four experiments ($\pm$ S.E.M.), using different mitochondrial preparations. * $P < 0.01$, post hoc Bonferroni/Dunn's test compared with control. ** $P < 0.01$, post hoc Bonferroni/Dunn's test compared with rotenone.

tributed to alterations promoted by this cation on the mitochondrial membrane structure, possibly through binding to cardiolipins of the inner mitochondrial membrane [25]. These alterations are characterized by an increased lipid packing and lipid domain formation that may contribute toward electron leakage at the respiratory chain complex I [25].

Under our experimental conditions, Ca^{2+} -induced oxidative stress in rotenone-treated brain mitochondria does not seem to depend on mitochondrial Ca^{2+} accumulation. The Ca^{2+} effect was observed even in the presence of high rotenone concentrations and FCCP (Fig. 3), situations in which mitochondrial Ca^{2+} uptake is limited due to dissipation of the transmembrane electrical potential ($\Delta\psi$). These results indicate that Ca^{2+} could be acting at an external site of the inner mitochondrial membrane facing the intermembrane space to stimulate ROS release in the presence of rotenone. High Ca^{2+} concentrations could also induce MPT, a phenomenon characterized by a non-specific inner membrane permeabilization (for reviews see [22,26]) that results in increased detection of mitochondrial ROS production [19]. In our experiments, we had no indications of the participation of permeability tran-

sition (Fig. 3), probably because the experiments were conducted in the presence of ATP and Mg^{2+} , effective inhibitors of this phenomenon in isolated brain mitochondria [27]. Recently, Starkov and collaborators [28] reported that Ca^{2+} approximately doubles brain mitochondrial ROS release in the presence of rotenone. However, different from the present study, the results reported by Starkov and collaborators [28] were obtained using succinate as respiratory substrate, a situation in which mitochondrial Ca^{2+} uptake and retention are maintained even in the presence of high concentrations of rotenone. Moreover, using succinate as substrate rotenone decreases by 70–80% mitochondrial ROS release and the presence of Ca^{2+} seems only to decrease this inhibitory effect of rotenone. In fact, the rate of H_2O_2 detection in the presence of rotenone and Ca^{2+} was lower than in their absence [28].

Recently, Barrientos and Moraes [9] showed that a partial inhibition of mitochondrial complex I activity is not enough to explain neuronal cell death primarily by energy deprivation. Moreover, partial inhibition of complex I, obtained either by genetic modification of cell lines or rotenone treatment, promotes cell death in a manner quantitatively associated with increased free radical production, and not with a decrease in respiratory chain function [9]. This is in accordance with several reports showing an increased production of mitochondrial ROS after brain mitochondrial complex I inhibition [9,10,23,29]. A partial inhibition of respiratory chain complex I may also cause a subliminal energy deprivation that could increase the susceptibility of nigral neurons to glutamate receptor-mediated cell death, i.e. excitotoxicity [15,16].

In conclusion, our results show that micromolar Ca^{2+} concentrations induce oxidative stress in isolated brain mitochondria when complex I is partially inhibited by rotenone. A low grade excitotoxicity, promoted predominantly by hyperstimulation of *N*-methyl-D-aspartate receptors, which mediated Na^+ and Ca^{2+} influx to the cytosol, has been proposed to play an important role in the neuropathology of PD [13,14]. Under these conditions, Ca^{2+} -stimulated mitochondrial ROS release may participate as an important link between the partial mitochondrial complex I inhibition and oxidative damage observed in PD.

Acknowledgements: We thank Dr. Alicia J. Kowaltowski for critical reading of the manuscript and Mrs. Elisângela J. Silva for the prep-

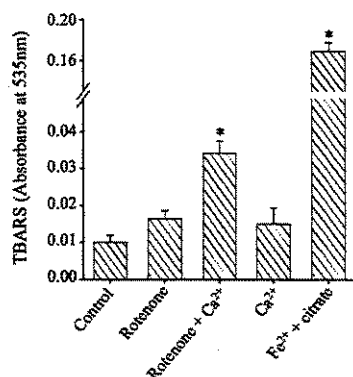


Fig. 5. Rotenone plus Ca^{2+} -induced TBARS formation. Forebrain mitochondria (0.5 mg/ml) were incubated in standard reaction medium for 30 min in the presence of 50 nM rotenone and/or 120 μM Ca^{2+} as indicated in the figure. Fe^{2+} (20 μM) plus 2 mM citrate were used to induce lipid peroxidation independent of mitochondrially generated ROS [19]. Values represent averages of five experiments ($\pm$ S.E.M.), using different mitochondrial preparations. * $P < 0.01$, post hoc Bonferroni/Dunn's test compared with control.

aration of rat forebrain mitochondria. This study was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Fundo de Apoio ao Ensino e Pesquisa (FAEP-UNICAMP) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). S.C.S. and E.N.M. are supported by FAPESP fellowships.

References

- [1] Jenner, P. and Olanow, C.W. (1996) *Neurology* 47, S161–S170.
- [2] Yoritaka, A., Hattori, N., Uchida, K., Tanaka, M., Stadtman, E.R. and Mizuno, Y. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 2696–2701.
- [3] Alam, Z.I., Daniel, S.E., Lees, A.J., Marsden, D.C., Jenner, P. and Halliwell, B. (1997) *J. Neurochem.* 69, 1326–1329.
- [4] Schapira, A.H., Cooper, J.M., Dexter, D., Clark, J.B., Jenner, P. and Marsden, C.D. (1990) *J. Neurochem.* 54, 823–827.
- [5] Schapira, A.H., Mann, V.M., Cooper, J.M., Dexter, D., Daniel, S.E., Jenner, P., Clark, J.B. and Marsden, C.D. (1990) *J. Neurochem.* 55, 2142–2145.
- [6] Parker Jr., W.D., Boyson, S.J. and Parks, J.K. (1989) *Ann. Neurol.* 26, 719–723.
- [7] Mann, V.M., Cooper, J.M., Krige, D., Daniel, S.E., Schapira, A.H. and Marsden, C.D. (1992) *Brain* 115, 333–342.
- [8] Betarbet, R., Sherer, T.B., MacKenzie, G., Garcia-Osuna, M., Panov, A.V. and Greenamyre, J.T. (2000) *Nat. Neurosci.* 3, 1301–1306.
- [9] Barrientos, A. and Moraes, C.T. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 16188–16197.
- [10] Votyakova, T.V. and Reynolds, L.J. (2001) *J. Neurochem.* 79, 266–277.
- [11] Zhang, Y., Dawson, V.L. and Dawson, T.M. (2000) *Neurobiol. Dis.* 7, 240–250.
- [12] Nicklas, W.J., Vyas, I. and Heikkila, R.E. (1985) *Life Sci.* 36, 2503–2508.
- [13] Blandini, F., Nappi, G. and Greenamyre, J.T. (2001) *Ann. Neurol.* 49, 525–529.
- [14] Beal, M.F. (1998) *Ann. Neurol.* 44 (Suppl. 1), S110–S114.
- [15] Albin, R.L. and Greenamyre, J.T. (1992) *Neurology* 42, 733–738.
- [16] Castilho, R.F., Hansson, O., Ward, M.W., Budd, S.L. and Nicholls, D.G. (1998) *J. Neurosci.* 18, 10277–10286.
- [17] Rosenthal, R.E., Hamud, F., Fiskum, G., Varghese, P.J. and Sharpe, S. (1987) *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 7, 752–758.
- [18] LeBel, C.P., Ischiropoulos, H. and Bondy, S.C. (1992) *Chem. Res. Toxicol.* 5, 227–231.
- [19] Maciel, E.N., Vercesi, A.E. and Castilho, R.F. (2001) *J. Neurochem.* 79, 1237–1245.
- [20] Zhou, M., Diwu, Z., Panchuk-Voloshina, N. and Haugland, R.P. (1997) *Anal. Biochem.* 253, 162–168.
- [21] Jakubowski, W. and Bartosz, G. (2000) *Cell Biol. Int.* 24, 757–760.
- [22] Crompton, M. (1999) *Biochem. J.* 341, 233–249.
- [23] Liu, Y., Fiskum, G. and Schubert, D. (2002) *J. Neurochem.* 80, 780–787.
- [24] Braak, H., Braak, E., Yilmazer, D., Schultz, C., de Vos, R.A. and Jansen, E.N. (1995) *J. Neural Transm.* 46 (Suppl.), 15–31.
- [25] Grijalba, M.T., Vercesi, A.E. and Schreier, S. (1999) *Biochemistry* 38, 13279–13287.
- [26] Kowaltowski, A.J., Castilho, R.F. and Vercesi, A.E. (2001) *FEBS Lett.* 495, 12–15.
- [27] Nicholls, D.G. and Scott, I.D. (1980) *Biochem. J.* 186, 833–839.
- [28] Starkov, A.A., Polster, B.M. and Fiskum, G. (2002) *J. Neurochem.* 83, 220–228.
- [29] Seaton, T.A., Cooper, J.M. and Schapira, A.H. (1997) *Brain Res.* 777, 110–118.