UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - USP
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

REBECA ARAUJO CANTELMO

**Efeito de inibidores da metilação de DNA sobre a
neurotoxicidade induzida por iodeto de 1-metil-4-
fenilpiridínio (MPP+) em modelo de células neuronais**

Ribeirão Preto
2017

RESUMO

CANTELMO, R. A. **Efeito de inibidores da metilação de DNA sobre a neurotoxicidade induzida por iodeto de 1-metil-4-fenilpiridínio (MPP+) em modelo de células neuronais.** 2017. 114 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

A Doença de Parkinson é a segunda doença neurodegenerativa mais comum na atualidade. Cerca de 10% dos casos da doença estão relacionados com fatores genéticos e os outros 90% são devido a fatores ambientais e epigenéticos. Evidências indicam alterações na metilação de genes relacionados ao desenvolvimento da doença de Parkinson. No entanto, não se sabe o efeito de inibidores da metilação de DNA sobre a neurotoxicidade induzida por MPP+, uma neurotoxina que mimetiza processos neurodegenerativos associados ao Parkinson in vitro. Portanto, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito dos inibidores da metilação de DNA (RG108, n-ftaloil-L-triptofano e 5azadC, 5-aza-2'-deoxycytidina) e do doador universal de grupamentos metil (SAM, S-adenosilmetionina) sobre neurotoxicidade induzida por MPP+ em cultura de células imortalizadas (PC12), por meio da análise da viabilidade celular avaliada no teste do MTT (3 - [4,5 dimetiltiazol-2-il] -2,5-difenil-tetrazólio); e da análise de neuritogênese, na presença e na ausência de MPP+. Os resultados demonstraram que: 1. o tratamento com DNMTi (inibidor da DNA metiltransferase) ou com SAM induziram efeito per se sobre a viabilidade celular, apenas quando incubados em altas concentrações e em períodos prolongados (24h); 2. não modificaram a morte celular induzida pelo MPP+, em baixas concentrações, mas agravaram a neurotoxicidade quando incubados em altas concentrações ou por períodos prolongados (24h); 3. essas drogas induziram neuritogênese per se e potencializaram a neuritogênese induzida pelo NGF (fator de crescimento neural); 4. protegeram parcialmente contra a diminuição da neuritogênese induzida pelo MPP+. O conjunto de dados sugere que tanto os DNMTi quanto o SAM podem ser citotóxicos, dependem de suas concentrações e do tempo de exposição à droga. No entanto, essas drogas são capazes de aumentar a neuritogênese (diferenciação celular) e proteger contra a neurotoxicidade celular induzida pelo NGF, em células diferenciadas.

Palavras-chave: Doença de Parkinson, epigenética, inibidores da metilação de DNA, metilação de DNA.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epigenética

O genoma contém toda a informação genética dos seres vivos e é ele que determina as características de cada espécie. No caso dos humanos, o genoma é composto por 23 pares de cromossomos presentes no núcleo de cada célula de um organismo. Os cromossomos são formados pela dupla hélice do DNA, a qual contém quatro tipos de pares de bases: adenina, guanina, timina e citosina. É a sequência destas bases no DNA que representa toda a informação genética da qual somos determinados (HAISMA; DE HON, 2006). Quando há necessidade de expressar um gene específico, a sequência de pares de bases referentes a este gene é transcrita pela RNA polimerase e transcrita em uma fita simples, chamada RNA mensageiro (RNAm). Este RNAm então define a sequência de aminoácidos que dará origem ao produto proteico do gene expresso. É desta forma que todo nosso organismo é planejado e regulado para o seu bom funcionamento (CLANCY; BROWN, 2008).

Cada célula do nosso organismo possui uma cópia do genoma, porém cada grupo celular expressa padrões de RNAm (transcriptoma) diferentes, o que permite que tenham funções diferentes e sejam altamente reguladas pelo ambiente em que se encontram. Isso indica que a expressão gênica pode sofrer diversas influências, tanto devido a modificações que ocorrem diretamente no genoma (na sequência de bases do DNA), quanto a modificações que não alteram a sequência primária do DNA. Em relação a esta última situação, a regulação da transcrição gênica ocorre por meio de mecanismos epigenéticos, os quais contribuem para a formação do epigenoma (KAIDERY; TARANNUM; THOMAS, 2013).

O termo “epigenética” foi utilizado pela primeira vez em 1939 por Conrad H. Waddington, *“The causal interactions between genes and their products, which bring the phenotype into being”*. Porém, atualmente, epigenética pode ser definida como mudanças hereditárias reversíveis na expressão gênica que não ocorrem devido a alterações na sequência primária do DNA (ESTELLER, 2008; SINGH; SHARMA; CAPALASH, 2013).

Diversos mecanismos são classificados como epigenéticos, por exemplo: metilação de DNA, modificação pós-translacional das histonas (acetilação, metilação, fosforilação e ubiquitinação, entre outros) e mecanismos baseados no RNA, como microRNA, RNA circular e RNA não codificante (KAIDERY; TARANNUM; THOMAS, 2013). Estes mecanismos possuem um papel fundamental na interpretação dos genes, no desenvolvimento embrionário, na diferenciação celular e na manutenção da identidade celular, além de regular as respostas celulares em relação a estímulos, contribuindo para a formação, consolidação e armazenamento da memória (MARTÍN-SUBERO, 2011). As mudanças epigenéticas são estáveis e duradouras, mas também reversíveis e promovem certa plasticidade para as células reagirem ao meio ambiente, tornando-se essenciais nos processos de desenvolvimento e diferenciação celular do sistema nervoso central, bem como nos processos de injúria e reparo tecidual (KAIDERY; TARANNUM; THOMAS, 2013; SZYF; MCGOWAN; MEANEY, 2008).

1.2 Metilação de DNA como mecanismo epigenético

Um dos mecanismos epigenéticos mais comuns em mamíferos é a metilação de DNA (Figura 01) (BARRACHINA; FERRER, 2009). Ela contribui para diversos processos biológicos essenciais como *imprinting* genômico, proteção, inativação e manutenção da estabilidade do genoma (WANG; WANG, 2013). A metilação de DNA acontece quando um grupamento metil é adicionado predominantemente na posição 5' do anel pirimidínico de citocinas, formando a 5-metilcitosina (5-mC). Este processo ocorre graças à catálise realizada por uma família de enzimas conhecidas como DNA metiltransferases (DNMT). Elas promovem a adição de um grupamento metil proveniente do grupo S-adenosil-metionina (SAM) no anel da citosina. As sequências hipermetiladas desencadeiam mecanismos adicionais que resultam na condensação da cromatina, inibindo a transcrição da região do gene promotor e diminuindo a sua expressão. O DNA metilado é hereditário nas células somáticas e este processo se mantém ativo durante toda a vida, porém seus níveis são alterados conforme envelhecemos (BARRACHINA; FERRER, 2009; BONASIO; TU; REINBERG, 2010; JURKOWSKA; JURKOWSKI; JELTSCH, 2011; KAIDERY;

TARANNUM; THOMAS, 2013; SZYF; MCGOWAN; MEANEY, 2008; WANG et al., 2013).

Figura 01 – Visão geral de mecanismos epigenéticos com destaque para a metilação de DNA. A parte superior demonstra a metilação de DNA em resíduos de citosina, catalisada pela DNMT. O DNA é então envolvido em torno de octâmeros de histonas, em unidades chamadas nucleossomos, formando a cromatina. As histonas podem ser trocadas com variantes ou quimicamente modificadas nas suas caudas salientes. A estrutura da cromatina é mediada pelo empacotamento de nucleossomos com eucromatina (aberta), possuindo menos nucleossomos posicionados do que a heterocromatina (fechada). Essas modificações da cromatina estabelecem se o gene e os componentes reguladores (promotor, intensificador) são acessíveis e transcritos ou inativados. SAM = S-adenosilmetionina; SAH = S-adenosilhomocisteína; DNMT = DNA metiltransferase. **Fonte:** adaptado de AGUILAR; CRAIGHEAD, 2013; ZAKHARI, 2013.

Inicialmente, as DNMTs foram classificadas em DNMT1, DNMT2 e DNMT3. A DNMT1 inclui as isoformas DNMT1s, DNMT1o e DNMT1p; enquanto a DNMT3 inclui as isoformas DNMT3a, DNMT3b e DNMT3l. A DNMT2, apesar da similaridade com a família de DNMT, já não é mais considerada parte deste grupo, pois ela não promove o processo de metilação em DNA, mas em RNA transportador. Desta forma, ela foi renomeada como metiltransferase aspártica 1 de RNA transportador ou simplesmente TRDMT1 (GROS et al., 2012).

A DNMT1 é a DNMT mais abundante nas células somáticas em proliferação, a primeira a ser purificada e classificada (GROS et al., 2012). Ela é conhecida como metiltransferase de manutenção, pois restabelece a metilação de DNA após a replicação, a qual ocorre preferencialmente em sítios hemimetilados do que não metilados na nova fita sintetizada (FOULKES et al., 2012; SINGH; SHARMA; CAPALASH, 2013). A DNMT1 é necessária tanto para o processo de desenvolvimento quanto em células somáticas, garantindo assim a proliferação e a sobrevivência celular, além de manter o *imprinting* genômico, participar da inativação do cromossomo X e auxiliar a DNMT3 na metilação *de novo* (SINGH; SHARMA; CAPALASH, 2013). A função biológica da isoforma DNMT1b ainda é desconhecida; a isoforma DNMT1o participa da manutenção dos padrões de metilação de DNA de *imprinted loci* em oócitos e embriões pré-implantados; a isoforma DNMT1p parece ter ligação com regulação da metilação de DNA durante a miogênese e gametogênese em músculos esqueléticos e miotubos diferenciados (GROS et al., 2012; SINGH; SHARMA; CAPALASH, 2013).

A DNMT3 está em quantidades menores nas células somáticas e não possui afinidade por sítios hemimetilados quando em comparação com a DNMT1. Ela é responsável pela metilação *de novo*, principalmente nos processos de desenvolvimento (nas primeiras etapas da embriogênese), diferenciação celular e gametogênese (FOULKES et al., 2012; SINGH; SHARMA; CAPALASH, 2013). A função da isoforma DNMT3a é manter o *imprinting* genômico durante a formação das células germinativas, provocar a metilação da região pericentromérica do DNA e também de sítios que não contém ilhas CpG (FOULKES et al., 2012; GROS et al., 2012; SINGH; SHARMA; CAPALASH, 2013). A isoforma DNMT3b é mais essencial nas primeiras fases de desenvolvimento de células somáticas e tende a causar metilação nas regiões mais centroméricas do DNA (FOULKES et al., 2012; GROS et

al., 2012; SINGH; SHARMA; CAPALASH, 2013). A isoformas DNMT1 é cataliticamente inativa, mas pode se ligar às demais isoformas da DNMT3 para aumentar suas atividades catalíticas (FOULKES et al., 2012; GROS et al., 2012; SINGH; SHARMA; CAPALASH, 2013).

Modificações no controle epigenético têm sido descritas em diversas doenças, incluindo a metilação de DNA, a qual normalmente se encontra alterada com o envelhecimento e pode contribuir para o progresso de processos neurodegenerativos (BLANCH et al., 2016; HORVATH, 2013). Entre estas doenças, podemos citar a doença de Alzheimer (AD), a doença de Parkinson (DP), entre outras.

Estudos envolvendo a AD em culturas celulares, modelos animais e inclusive amostras de cérebros *post-mortem* de pacientes diagnosticados com AD indicaram mudanças nos padrões de metilação de DNA. Em alguns casos de pacientes idosos com AD, foi sugerido a suplementação de vitamina B e SAM com a finalidade de repor os níveis de metilação abaixo do normal e retardar a atrofia cerebral, o declínio cognitivo, o estresse oxidativo, entre outros benefícios (COPPEDÈ, 2014). Blanch et al. (2016) observou níveis de metilação diminuídos no DNA mitocondrial do córtex entorrinal (região afetada nas fases iniciais da doença) em pacientes com AD. Contudo, os níveis globais tendem a variar de acordo com o desenvolvimento da neurodegeneração (BLANCH et al., 2016). Também há variação na metilação de DNA quando se analisa cada gene específico que contribui para a doença (LARDENOIJE et al., 2015).

Quanto à DP, alguns pesquisadores observaram que genes importantes para a sua patologia, como o gene que codifica a proteína α -sinucleína, estavam com os níveis de metilação diminuídos em diversas regiões cerebrais (análise *post-mortem* de pacientes com DP), inclusive na *substancia nigra* (COPPEDÈ, 2014; JOWAED et al., 2010; MATSUMOTO et al., 2010). Blanch et al. (2016) também verificou uma diminuição da metilação em amostras de *substancia nigra* proveniente de pacientes com DP em comparação com controles saudáveis (BLANCH et al., 2016). Outro estudo realizado com células sanguíneas de pacientes com DP demonstrou aceleração da idade epigenética através do aumento da metilação, a qual pode ser utilizada como biomarcadores para a doença (HORVATH; RITZ,

2015). Assim como para a DA, diversos genes conhecidos por estarem relacionados à DP possuem seus níveis de metilação alterados (LARDENOIJE et al., 2015).

Em relação às demais doenças neurodegenerativas, Suchy et al. (2009) notou que modelos animais para esclerose lateral amiotrófica (ELA) tinham o início dos sintomas da doença retardado quando havia suplementação de SAM na dieta (SUCHY et al., 2010). Níveis alterados da metilação de DNA também foram encontrados em estudos envolvendo a doença de Huntington (LARDENOIJE et al., 2015).

Deste modo, torna-se interessante a elucidação de como os mecanismos epigenéticos, entre eles a metilação de DNA, estão envolvidos com a patogênese de doenças neurodegenerativas. Estudos que possibilitem avançar nesse conhecimento são essenciais para o estabelecimento de biomarcadores para um diagnóstico prematuro e abordagens terapêuticas mais efetivas (FENG; JANKOVIC; WU, 2015; LARDENOIJE et al., 2015; XU; LI; JIN, 2012).

1.3 Regulação farmacológica da metilação de DNA

A metilação de DNA pode ser modulada farmacologicamente por meio do uso de fármacos que inibem a atividade das DNMTs, como 5-aza-2'-deoxycytidina (5azadC) e n-ftaloil-l-triptofano (RG108), além de outros (Figura 02).

O DNMTi mais utilizado é o 5-azacitidina (5aza) (STRESEMANN et al., 2006). Ele é um análogo da citidina e quando é incorporado ao DNA causa a inibição da DNMT por um mecanismo suicida (STRESEMANN et al., 2006). A DNMT reconhece o 5aza como um substrato natural e dá início ao processo de metilação normalmente. Há o desencadeamento de uma reação intermediária covalente, a enzima fica impedida de se restaurar e é degradada (GROS et al., 2012; SINGH; SHARMA; CAPALASH, 2013; STRESEMANN et al., 2006). Ele é um composto não específico para a inibição das DNMTs e é considerado significativamente citotóxico (STRESEMANN et al., 2006). Contudo, o 5aza também pode ser incorporado ao RNA e interferir na tradução de proteínas. O 5azadC é um fármaco semelhante ao 5aza que age mais especificadamente no DNA e inibe as DNMT mais

eficientemente, devido a sua maior estabilidade (SINGH; SHARMA; CAPALASH, 2013). Ambas as substâncias são aprovadas pelo FDA (*Food and Drug Administration*) e utilizadas para o tratamento de alguns tipos de câncer como síndrome mielóide displásica, leucemia aguda mielóide e leucemia crônica mielomonocítica (SINGH; SHARMA; CAPALASH, 2013).

O primeiro DNMTi desenvolvido racionalmente foi o RG108. Ele é um inibidor não-nucleosídico e com vantagem de ser menos citotóxico. Seu mecanismo de ação baseia-se no bloqueio do sítio catalítico da DNMT, interferindo assim, no reconhecimento da enzima pelo seu alvo (ASGATAY et al., 2014; STRESEMANN et al., 2006). Stresemann et al. (2006) mostrou que o RG108 induziu diminuição da metilação concentração-dependente em células TK6 (linhagem linfoblástica humana) sem promover sinais de alta toxicidade em comparação com demais DNMTi (STRESEMANN et al., 2006). Outro estudo realizado por Brueckner et al (2005) demonstrou que o RG108 é capaz de se ligar não covalentemente à DNMT sem causar alteração nos níveis da enzima, além de sugerir uma considerável especificidade na interação entre ambos (BRUECKNER et al., 2005).

Figura 02 – Mecanismos de ação dos inibidores da DNMT. A DNMT provoca a metilação de DNA ao se ligar a uma citosina, preferencialmente em ilhas CpG, e tornando possível a transferência do grupamento metil para o DNA. **A.** Metilação de DNA mediada pela DNMT em resíduo de citosina. **B.** Inibição da metilação pelo 5azadC que, por ser inibidor nucleosídico, é incorporado ao DNA como se fosse uma citosina e ao se ligar à DNMT produz um aducto covalente estável, não permitindo a recuperação da enzima. **C.** Inibição da metilação pelo RG108 que, por ser um inibidor não nucleosídico, interage com o sítio catalítico da enzima, bloqueando-a reversivelmente. DNMT = DNA metiltransferase; 5azadC = 5-aza-2'-deoxycytidina; RG108 = n-ftaloil-L-triptofano; Pro, Phe, Leu, Gly, Glu, Asn, Trp, Arg, Lys, Gln = aminoácidos presentes no sítio catalítico da enzima que interagem com o RG108. Fonte: adaptado de ASGATAY et al., 2014; MARTINET et al., 2012.

O aumento da oferta de radicais metil para as DNMTs por meio da administração de SAM também tem sido avaliado como estratégia farmacológica para modulação da metilação de DNA. Ele é originado de um constituinte natural (metionina) presente na dieta, principalmente rica em carne vermelha, e atua como doador universal de radicais metil durante o processo de metilação de DNA e em mais de 100 outros processos enzimáticos que envolvem reações de metilação (BOTTIGLIERI, 2013; CHATURVEDI et al., 2016). As enzimas por meio das quais o SAM atua reagem com átomos de fósforo ou carbono inativados que podem ser encontrados em diversas moléculas como em metabólitos primários, secundários, proteínas, lipídeos, açúcares, neurotransmissores, RNA e DNA. Ao reagir e formar produtos metilados, o SAM é transformado em SAH (S-adenosilhomocisteína), o qual é metabolizado em homocisteína e pode ser reconstituído em metionina e SAM novamente, completando o ciclo da metilação (BAUERLE; SCHWALM; BOOKER, 2015; BOTTIGLIERI, 2013; LANDGRAF; MCCARTHY; BOOKER, 2016). É o equilíbrio entre SAM e SAH e, conseqüentemente, no ciclo da metilação que mantém o bom funcionamento celular em todo o organismo (Figura 03). Desta maneira, fica evidente o motivo pelo qual diversas doenças têm seu mecanismo patogênico oriundo de um desequilíbrio nesta área e, assim, o ciclo da metilação tem se tornado um alvo farmacológico explorado com finalidades terapêuticas (BOTTIGLIERI, 2013).

Figura 03 – Equilíbrio da metilação de DNA através do SAM e SAH. A metionina através da ação da MAT1A e de uma molécula de ATP é transformada em SAM. O SAM ao doar seu grupamento metil para a DNMT, catalisa a metilação de resíduos de citosina e produz SAH. O SAH é metabolizado em homocisteína, a qual restitui a metionina por meio da ação da BHMT. A homocisteína ainda pode causar estresse oxidativo através da diminuição de GSH. O equilíbrio da metilação está ligado ao ciclo do folato. MAT = metionina adenosiltransferase 1A; SAM = S-adenosilmetionina; SAH = S-adenosilhomocisteína; DNMT = DNA metiltransferase; GSH = glutathiona; BHMT = betaína homocisteína metiltransferase; DMG = dimetilglicina. **Fonte:** adaptado de ZAKHARI, 2013.

Modificações epigenéticas têm sido descritas em processos fisiopatológicos envolvidos no desenvolvimento de desordens neurológicas e psiquiátricas. Desta forma, a participação de mecanismos epigenéticos nos processos de reparo e neurodegeneração têm sido recentemente investigados com finalidade de alcançar maior esclarecimento quanto à etiologia das doenças, o que poderia contribuir para o avanço de novos métodos diagnósticos e novas formas de tratamento. Além disso, pelo fato dos mecanismos epigenéticos serem alterações reversíveis, a sua manipulação farmacológica pode se tornar uma abordagem interessante para o desenvolvimento de novas terapias (JIANG et al., 2008; MIGLIORE; COPPEDÈ, 2009; WANG et al., 2013).

1.4 Doença de Parkinson

A Doença de Parkinson é uma das doenças neurodegenerativas mais prevalentes na atualidade, com uma taxa de incidência bruta mundial de 4,5-19/100000 habitantes por ano (WHO, 2006), sendo estimados cerca de 8,7 milhões de casos em 2030 (MHYRE et al., 2012). As doenças neurodegenerativas são consideradas desordens multifatoriais e complexas, levando-se em consideração tanto a sua etiologia familiar quanto os casos esporádicos. Muitos estudos já demonstraram que existem diversos fatores genéticos que contribuem para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, especialmente quando combinados a fatores de risco ambientais (MIGLIORE; COPPEDÈ, 2009). Entre estes agentes ambientais, destacam-se neurotoxinas (MPTP, 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina; agrotóxicos) (LIU; GAO; HONG, 2003), alimentação (dieta pobre em frutas, verduras, legumes, grãos íntegros, nozes, peixe, aves domésticas e alta ingestão de gordura saturada) (GAO et al., 2007) e estilos de vida (exposição a metais, baixa ingestão de café e chá, alta ingestão de álcool, repetitivos episódios de perda de consciência traumática) (ABBOTT et al., 2005; DICK et al., 2007; GAO et al., 2007; HU et al., 2007). Esses fatores ambientais podem interferir na expressão gênica a curto e longo prazo, fazendo com que um indivíduo possa manifestar seus efeitos significativamente na velhice, mesmo após tendo sido exposto ainda na infância (MIGLIORE; COPPEDÈ, 2009).

Embora o envelhecimento seja um processo inevitável, o que determina se o indivíduo desenvolverá ou não uma neurodegeneração é a maneira como o organismo irá reagir perante o envelhecimento, frente aos fatores de vulnerabilidade genética e ambiental. Doenças podem surgir devido à falha das células em adaptar suas respostas aos aumentos de metabólitos próprios do envelhecimento, como substâncias oxidativas e estresse iônico, os quais podem acarretar um acúmulo de proteínas, membranas e DNA defeituosos. Esta série de acontecimentos que ocorrem normalmente em indivíduos senis, se torna mais proeminente em células do sistema nervoso e pode ser exacerbada em populações neuronais já vulneráveis a desordens neurodegenerativas (MATTSON; MAGNUS, 2006).

Depois da doença de Alzheimer, a doença de Parkinson é a desordem neurodegenerativa mais comum, sendo prevalente em indivíduos a partir dos 50 e 60 anos e aumentando sua incidência de acordo com o avanço de idade da população (VAN DEN EEDEN et al., 2003). Em alguns poucos casos, a doença pode se apresentar antes dos 40 anos, sendo classificada como início precoce. Se ocorrer entre 21 e 40 anos, é classificada como início jovem e abaixo de 20 anos como Parkisonismo juvenil (WHO, 2006).

A DP é uma doença multifatorial com um quadro patológico bem extenso, causada basicamente pela perda de neurônios dopaminérgicos da via nigroestriatal, geralmente associada à presença de aglomerados proteicos no citoplasma celular denominados “corpos de Lewy” e acúmulo da proteína α -sinucleína (DEXTER; JENNER, 2013). Esses neurônios possuem os corpos celulares na substância *nigra*, localizada no mesencéfalo, com as terminações se projetando para estriado dorsal. A perda de pigmentação nessa via caracteriza a perda de neurônios dopaminérgicos, uma vez que esses neurônios produzem o pigmento neuromelanina (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003). Com o desenvolvimento da doença, há a expansão de regiões cerebrais afetadas pela neurodegeneração e aparição dos corpos de Lewy. Assim, ficam comprometidas: *locus coeruleus* (neurônios noradrenérgicos), núcleo da rafe (neurônios serotoninérgicos), núcleo basal de Meynert e núcleo motor dorsal do vago (neurônios colinérgicos), córtex cerebral (córtex cingulado e entorrinal), bulbo olfatório, sistema nervoso autonômico, amígdala, hipocampo e formação reticular do tronco cerebral (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003; DEXTER; JENNER, 2013).

Apesar da fisiopatologia da DP ser desconhecida, diversos elementos estão relacionados. Uma das características neuropatológicas da DP é o acúmulo de “corpos de Lewy” presentes nos neurônios que degeneram (BÉNÉ et al., 2009; PETRUCCELLI; DICKSON, 2008). Estes corpos são compostos por diversas proteínas, sendo a principal delas a α -sinucleína e a ubiquitina (BÉNÉ et al., 2009). A origem da conformação anormal destas proteínas não é conhecida, mas já foi correlacionada com modificações translacionais e dano oxidativo (PETRUCCELLI; DICKSON, 2008). Outros mecanismos que contribuem para a morte celular são: estresse oxidativo, o qual é mais elevado nos neurônios dopaminérgicos e pode levar à peroxidação lipídica, desorganização do citoesqueleto e danos no DNA;

desregulação do sistema renina-angiotensina, o qual está ligado a doenças devido ao envelhecimento; e neuroinflamação, a qual libera citocinas, quimiocinas, neurotransmissores e causa estresse oxidativo levando à morte celular (RANGEL-BARAJAS; CORONEL; FLORÁN, 2015; TATTON et al., 2003).

A via nigroestriatal tem papel fundamental no controle do movimento devido à sua ligação com o córtex motor, o qual é regulado pelo estriado dorsal (MOLINOFF, 2011). Assim, a perda de neurônios dopaminérgicos nessa via produz os sintomas clássicos da DP, os quais são responsáveis pelo diagnóstico clínico da doença. Estes sintomas podem ser resumidos em: tremor de repouso, rigidez dos membros, lentidão dos movimentos, redução da amplitude dos movimentos, ausência de movimentos conscientes, diminuição da expressão facial normal, decréscimo do volume da voz, dificuldade de deglutição, postura curvada, complicação na escrita e no andar (ERRO; STAMELOU, 2017; RANG et al., 2003). Os portadores da DP ainda podem desenvolver com a progressão da doença, alguns sintomas cognitivos, deficiência de afeto, falta de iniciativa, desenvolver depressão e até mesmo demência (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003).

Infelizmente, até o momento, não existe nenhum tipo de diagnóstico biológico ou de imagens estabelecidos para a DP (JAKUBOWSKI; LABRIE, 2017; WHO, 2006). O único diagnóstico existente é por meio de critérios clínicos, porém a confirmação somente é feita quando os sintomas estão bem desenvolvidos e cerca de 70% dos neurônios dopaminérgicos do paciente já foram perdidos (JAKUBOWSKI; LABRIE, 2017).

James Parkinson foi o primeiro estudioso a descrever, em 1817, a doença que ele inicialmente denominou de “*shaking palsy*” (paralisia agitada) por meio da observação e acompanhamento de seis pacientes em uma publicação de título “*An essay on the Shaking Palsy*”. Parkinson demonstrou sua preocupação com as opções limitadas da época para uma terapia adequada, porém manteve suas esperanças no desenvolvimento do conhecimento futuro (PARKINSON, 1817; TEIVE; MUNHOZ; LEES, 2017).

Muitas linhas de tratamento foram abordadas desde então. Foi somente em 1867 que um neurologista chamado Jean-Martin Charcot descreveu um estudo sugerindo a mudança do nome da doença de “*shaking palsy*” para Doença de

Parkinson, além de propor uma nova abordagem terapêutica por meio de alcaloides solanáceos. Esta se tornou a terapia mais aceita e popular nos 75 anos que se seguiram, incluindo o design de compostos sintéticos com menos efeitos adversos e mesma efetividade em torno de 1950 (FAHN, 2015; TEIVE; MUNHOZ; LEES, 2017).

A associação entre a etiologia da DP e a dopamina foi estabelecida pelo farmacologista Arvid Carlsson a partir de estudos com reserpina e L-dopa em 1958. Então o farmacologista Oleh Hornykiewicz juntamente com o geriatra Walter Birkmayer, começaram a administrar intravenosamente L-dopa (levodopa) em pacientes que sofriam com a DP, a fim de repor os níveis endógenos de dopamina, a partir da década de 60. Contudo, esta terapia foi desencorajada quando efeitos adversos gastrointestinais muito proeminentes começaram a surgir. O tratamento com L-dopa foi apenas retomado a partir de 1967 por meio de uma posologia crescente mais equilibrada desenvolvida pelo neurofarmacologista George C. Cotzias (FAHN, 2015).

O tratamento com L-dopa continua sendo a principal abordagem terapêutica para o tratamento da DP, associada a outras classes de drogas, incluindo inibidores de enzimas que degradam a dopamina e agonistas dopaminérgicos, entre outros (ZADORI et al., 2013). Porém, esses tratamentos somente aliviam os sintomas da doença, sem que haja uma verdadeira neuroproteção (FENG et al., 2014; ZADORI et al., 2013). O tratamento crônico com L-dopa ainda pode causar efeitos motores adversos como a discinesia, além de psicopatologias e distúrbios de comportamento (ZADORI et al., 2013). Ademais, um estudo realizado em por Obeid et al. (2009) aponta que o tipo e a duração do tratamento de escolha podem afetar níveis de metilação de DNA, dependendo do tempo de doença e idade do paciente (OBEID et al., 2009). Infelizmente, ainda não existem tratamentos capazes de conter a evolução da doença.

Diante disso, estudos *in vivo* e *in vitro* que buscam compreender os mecanismos fisiopatológicos da doença, bem como avaliar o potencial neuroprotetor de novos fármacos podem contribuir para indicar novos alvos moleculares a serem explorados futuramente para o desenvolvimento de novas possibilidades de tratamento com melhor perfil terapêutico.

Estudos epidemiológicos revelam que cerca de 10% dos casos de DP estão relacionados à etiologia familiar. Foram caracterizadas algumas mutações no *locus* cromossomal 4q21 (*PARK1*) no caso da DP familiar como: substituições, duplicação e triplicação no gene *SNCA* responsável pela α -sinucleína; homozigose, troca de sentido do heterozigoto, deleção de *exons*, duplicação e triplicação do gene *parkina* responsável por formas recessivas do parkinsonismo familiar juvenil; possível substituição no gene *UCH-L1* (*Ubiquitin Carboxyl-Terminal Hydrolase L1*); troca de sentido e deleção de *exons* no gene *PINK1* (gene mitocondrial); troca de sentido homozigótica, heterozigose e deleção no gene *DJ-1* (um oncogene responsável pela forma recessiva de início precoce da DP); substituições no gene *LRRK2* (*Leucine-Rich Repeat Kinase 2*); homozigose e deleção heterozigótica no gene *ATP13A2* (responsável pela síndrome Kufor-Rakeb, uma forma rara recessiva hereditária de parkinsonismo juvenil); substituição heterozigótica no gene *HTRA2*; entre outros (ROSS; BRAITHWAITE; FARRER, 2008).

A outra grande maioria dos casos remanescentes de DP é esporádica e idiopática. Há evidências de que alterações em mecanismos epigenéticos, como a metilação de DNA, estejam associadas a alterações na expressão de genes relacionados ao desenvolvimento da DP. A melhor compreensão desses mecanismos pode revelar novos alvos a serem explorados farmacologicamente. Por se tratar do objetivo principal deste trabalho, os mecanismos epigenéticos envolvidos na DP estão mais bem discutidos a seguir.

1.5 Metilação de DNA e Doença de Parkinson

Estudos envolvendo a expressão do gene *SNCA* dependente da metilação do *intron 1* em pacientes com Parkinson esporádico, observou-se uma diminuição da metilação deste gene na *substancia nigra*, putâmen e córtex (JOWAED et al., 2010). Desta forma, houve um aumento da α -sinucleína, a qual está associada a processos neurodegenerativos (PAVLOU et al., 2017). O mesmo resultado foi encontrado por Matsumoto et al. (2010) em *substancia nigra* de pacientes com DP (MATSUMOTO et al., 2010). Por outro lado, um estudo realizado com a região promotora do gene *SNCA* por de Boni et al. (2011) em diversas

regiões de cérebro de pacientes portadores de doenças esporádicas ligadas ao corpos de Lewis (incluindo DP), revelou tanto hipometilação quanto hipermetilação nos diversos estágios da doença em comparação com controles dependendo da região analisada (DE BONI et al., 2011).

Um estudo realizado por Blanch et al (2016) demonstrou padrões de metilação alterados no DNA mitocondrial tanto para AD quanto para a DP e que estes níveis de metilação podem ser dinâmicos, ou seja, alterados durante o desenvolvimento da doença (BLANCH et al., 2016). Outros autores como Horvath e Ritz (2015) e Masliah et al (2013) avaliaram os níveis de metilação em pacientes com Parkinson e relacionaram com os níveis de metilação células do sangue. Ambos verificaram significativa associação entre estes níveis, sugerindo que a metilação de DNA pudesse ser um importante biomarcador para o diagnóstico precoce da doença (HERNANDEZ et al., 2011; HORVATH; RITZ, 2015; MASLIAH et al., 2013; MIGLIORE; COPPEDÈ, 2009).

Conforme observado na literatura, existem resultados bastante distintos associando a metilação de DNA com a DP. Portanto, há uma maior necessidade de investigação para esclarecimento da etiologia desta doença, bem como identificar novas estratégias terapêuticas (JAKUBOWSKI; LABRIE, 2017; PAVLOU et al., 2017).

1.6 Modelos *in vitro* para estudo de neurodegeneração associada à DP

Em pacientes que sofrem da DP, é possível notar a presença de atrofia de neuritos, a qual pode levar à diminuição da rede neuronal e à morte progressiva dos sistemas que compõem o sistema nervoso (TOHDA; KUBOYAMA; KOMATSU, 2005). Por muitos anos acreditou-se que os neurônios adultos não eram capazes de se regenerar, contudo já foi demonstrado que além de novos neurônios continuarem a serem produzidos em mamíferos adultos (predominantemente na zona subventricular anterior do ventrículo lateral e na zona subgranular do giro dentado), eles podem se recuperar de um dano com o devido estímulo (FILBIN, 2000; HAGG, 2009). Desta forma, a redução ou reversão do desenvolvimento da

neurodegeneração por meio da reconstrução da rede neuronal (regeneração de neuritos e reconstrução de sinapses) torna-se um passo essencial na recuperação da função cerebral (DO AMARAL, 2017; TOHDA; KUBOYAMA; KOMATSU, 2005).

Modelos de estudo para a DP têm sido desenvolvidos tanto *in vivo* quanto *in vitro* e ambos possuem tanto características favoráveis quanto desfavoráveis. Existem diversos modelos *in vitro* de linhagens celulares com características dopaminérgicas para o estudo de mecanismos fisiopatológicos associados à DP. Entre as linhagens utilizadas, destacam-se as células PC12, as N27 e culturas primárias de neurônios dopaminérgicos embrionários.

A linhagem de células PC12, utilizada neste trabalho, é originada de células imortalizadas provenientes de feocromocitoma de rato, bem estabelecidas, e que possuem diversas vantagens em relação aos modelos *in vivo*, como: proliferação ilimitada; população homogênea (o que possibilita o estudo de agentes ambientais relacionados à DP) e rapidez com que os experimentos podem ser realizados (é possível obter resultados já nas primeiras 24 horas após o seu início) (GREENE; TISHLER, 1976; MALAGELADA; GREENE, 2008). São amplamente utilizadas em diversos estudos, sendo bem caracterizadas em relação às suas propriedades e padrões de expressão gênica, além de apresentarem diversas propriedades em comum com os neurônios dopaminérgicos do Sistema Nervoso Central e responderem a fatores de crescimento e outros agentes neurotróficos (MALAGELADA; GREENE, 2008). A linhagem de células PC12 ainda conta com a expressão de DNMT1, DNMT3a e DNMT3b, tornando-a ideal para o estudo dos efeitos dos inibidores da metilação em situações de neurotoxicidade associada a DP (SUN et al., 2013).

No entanto, é importante mencionar que modelos *in vitro*, como a linhagem celular PC12, também possuem limitações que devem ser consideradas, a saber: relevância dos dados obtidos para simular uma doença complexa que depende do envelhecimento como a DP; achados que são relevantes para as PC12, mas não para a doença; ausência de interação das células com outras encontradas no organismo como as células da Glia, o que pode levar a resultados diferentes dos reais; propriedades metabólicas próprias das linhagens neoplásicas que divergem das células neuronais; estudo focado na morte celular ao invés da disfunção, o que

pode ser tão importante quanto na patogênese da doença; diferença de condições na reprodutibilidade dos resultados que variam de laboratório para laboratório (MALAGELADA; GREENE, 2008). Porém, possuem o benefício de serem ótimas ferramentas para avaliar cascatas de eventos moleculares que possam desencadear a neurodegeneração, além de proporcionar a identificação de alvos terapêuticos e determinar compostos potencialmente neuroprotetores (SURMEIER, 2008).

Apesar dessas limitações, as vantagens descritas acima tem viabilizado o uso das células PC12 para estudos *in vitro*, particularmente quando se pretende testar efeitos de drogas e investigar mecanismos de sinalização associados. Para mimetizar uma situação de neurodegeneração semelhante à DP, pode-se utilizar compostos como o MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina, precursor do MPP+), o 6-OHDA (6-hidroxidopamina) e alguns agrotóxicos como a rotenona, pois possuem estruturas semelhantes à dopamina e consequentemente são captadas pelo transportador de dopamina (SURMEIER, 2008). É possível avaliar *in vitro* a indução de apoptose em linhagens celulares neuroniais por meio de diversas alterações na sinalização de cascatas intracelulares induzidas pelo íon MPP+. Entre estas sinalizações, estão envolvidas vias de pró-sobrevivência e pró-apoptóticas, as quais se encontram com fosforilação diminuída e aumentada, respectivamente, em análises *post-mortem* de cérebros humanos acometidos pela DP (FRAGKOULI; DOXAKIS, 2014). Além disso, quando expostos acidentalmente ao MPTP, indivíduos apresentaram sintomas parecidos com a DP, o que foi relatado a partir da década de 70 com o uso recreativo de estruturas semelhantes ao MPTP e validado experimentalmente em animais (BOVÉ; PERIER, 2012; DAVIS et al., 1979).

O composto MPP+ é gerado nas células da Glia pela enzima monoamino oxidase-B (MAO-B) a partir do MPTP e entra nos neurônios dopaminérgicos através do transportador de dopamina (BLOEM et al., 1990; CHARLTON, 1992; DAUER; PRZEDBORSKI, 2003). O MPP+ pode provocar toxicidade celular por meio de diversos mecanismos: inibição do complexo I da cadeia transportadora de elétrons (aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio e diminuindo a produção de energia), acúmulo em vesículas de dopamina, interação com enzimas citosólicas e elevação exacerbada dos níveis de metilação servindo como doador de grupamento metil (Figura 04) (CHARLTON, 1992; DAUER; PRZEDBORSKI, 2003; YUAN et al., 2014).

Figura 04 – Metabolismo do MPTP e a ação do MPP+ no neurônio dopaminérgico. O MPTP atravessa a barreira hematoencefálica e ao se encontrar nas células da Glia é transformado em MPDP+ pela MAO-B. O MPDP+ passa por um processo de autooxidação e é captado pelo transportador de dopamina para neurônios dopaminérgicos. Uma vez dentro do neurônio ele pode atuar por inibição do complexo I da cadeia transportadora de elétrons (diminuindo a produção de ATP e aumentando a produção de ROS), por acúmulo em vesículas de DA, por interação com enzimas citosólicas, por elevação exacerbada dos níveis de metilação servindo como doador de grupamento metil. MPTP = 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina; MPDP + = íon 1-metil-4-fenil-2,3-dihidropiridínio; MAO-B = monoamino oxidase-B; MPP+ = íon 1-metil-4-fenilpiridínio; DAT = transportador de dopamina; ROS = espécie reativas de oxigênio (*reactive oxygen species*); ATP = adenosina trifostato (*adenosine triphosphate*), DA = dopamina. Fonte: adaptado de DAUER; PRZEDBORSKI, 2003; SCHILDKNECHT et al., 2017; WANG et al., 2013.

Portanto, a administração direta de MPP+ a células mantidas em cultura desencadeia mecanismos de neurotoxicidade que se assemelham ao processo neurodegenerativo que ocorre na DP. Diversos estudos apontam para a toxicidade do MPP+ em linhagens imortalizadas de células, entre elas a linhagem PC12. Collins et al. (1991) propõe que tanto o MPP+ quanto agentes semelhantes à sua estrutura são capazes de causar inibição mitocondrial, levando a efeitos neurotóxicos (COLLINS et al., 1992). Lee et al. (2005) sugeriu que um dos mecanismos de neurotoxicidade do MPP+ em células PC12 pode ser devido à formação indireta de

espécies reativas de oxigênio, conduzindo à morte celular (LEE et al., 2005). Cartelli et al. (2010) demonstrou que o MPP+ em linhagem PC12 foi capaz de causar prejuízos no sistema de microtúbulos, acarretando seu mau funcionamento e evitando a movimentação correta dos axônios e das mitocôndrias através dos neuritos, o que pode ser um mecanismo envolvido na DP (CARTELLI et al., 2010).

1.7 Justificativa

Apesar dos avanços no conhecimento sobre etiologia da DP, ainda não são bem conhecidos os mecanismos que levam à morte de neurônios dopaminérgicos e, assim, provocam o desenvolvimento da doença. Além disso, os tratamentos atualmente disponíveis não previnem a progressão da doença, de modo que essa permanece com prognóstico de doença incurável. Diante disso, há necessidade de estudos que investiguem mecanismos subjacentes ao desenvolvimento da doença, bem como estudos que identifiquem marcadores diagnósticos e tratamentos mais eficazes.

Evidências recentes apontaram que há associação entre mecanismos epigenéticos e os processos neurodegenerativos descritos na DP, incluindo a metilação de DNA. Portanto, torna-se interessante avaliar o efeito da manipulação farmacológica de mecanismos envolvendo a metilação de DNA sobre a neurodegeneração associada à DP (Figura 05). Desta forma, neste trabalho foi investigado o efeito do tratamento com DNMTi em células PC12, em modelo de neurodegeneração associada à DP, com a finalidade de verificar se essas drogas seriam capazes de induzir neuroproteção. Os parâmetros de análise foram os efeitos dos compostos sobre a viabilidade celular e a neuritogênese, processos essenciais para a neuroplasticidade adaptativa. Adicionalmente, foram avaliados os efeitos induzidos pelo tratamento com um doador de radicais metil (SAM), o qual provoca aumento na metilação de DNA (BOULLE et al., 2011; EGGER et al., 2004; ISHIMARU et al., 2010).

Figura 05 – Processo de envelhecimento e neuroplasticidade adaptativa. BDNF (*“brain-derived neurotrophic factor”*, fator neurotrófico derivado do cérebro) e NGF (fator de crescimento neural) são fatores neurotróficos importantes para o desenvolvimento neuronal; MPP+ (1-metil-4-fenilpiridínio); RG108 (n-ftaloil-l-triptofano) é um DNMTi não nucleosídico; 5azadC (5-aza-2'-deoxycytidina) é um DNMTi nucleosídico; SAM (S-adenosilmetionina) é um doador universal de grupamentos metil. **Fonte:** adaptado de <https://www.irp.nia.nih.gov/branches/lms/Figure3.jpg>.

6 CONCLUSÕES

Em relação à viabilidade celular, as drogas de modo geral, foram capazes de diminuir a viabilidade celular quando em concentrações muito altas, ao se analisar o seu efeito intrínseco, ou na presença concomitante com o MPP+. No caso dos pré-tratamentos, especialmente o de 30 minutos, as drogas foram capazes de manter a viabilidade celular mesmo depois da adição do MPP+, sem, no entanto induzir efeito neuroprotetor.

Quanto à neuritogênese, foi possível observar o aumento da porcentagem de células com neuritos para todas as drogas avaliadas, principalmente nos tratamentos de 30 minutos, indicando efeito de aumento de diferenciação celular *per se*. Além disso, as drogas protegeram as células diferenciadas (com NGF) contra o efeito do MPP+. Curiosamente, os efeitos dos inibidores e do SAM foram no mesmo sentido, indicando que mecanismos complexos estariam relacionados aos efeitos observados, não envolvendo apenas regulação da metilação de DNA.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, R. D. et al. Excessive daytime sleepiness and subsequent development of Parkinson disease. **Neurology**, v. 65, n. 9, p. 1442–1446, 2005.

AGUILAR, C. A.; CRAIGHEAD, H. G. Micro- and nanoscale devices for the investigation of epigenetics and chromatin dynamics. **Nature Nanotechnology**, v. 8, p. 709–718, 2013.

ASGATAY, S. et al. Synthesis and Evaluation of Analogues of N-Phthaloyl-L-tryptophan (RG108) as Inhibitors of DNA Methyltransferase 1. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 57, p. 421–434, 2014.

BAI, S. et al. DNA Methyltransferase 3b Regulates Nerve Growth Factor-Induced Differentiation of PC12 Cells by Recruiting Histone Deacetylase 2. **Molecular and Cellular Biology**, v. 25, n. 2, p. 751–766, 2005.

BARRACHINA, M.; FERRER, I. DNA Methylation of Alzheimer Disease and Tauopathy-Related Genes in Postmortem Brain. **Neuropathol Exp Neurol**, v. 68, n. Number 8, p. 880 – 891, 2009.

BARTKOWSKA, K.; TURLEJSKI, K.; DJAVADIAN, R. L. Neurotrophins and their receptors in early development of the mammalian nervous system. **Acta Neurobiologiae Experimentalis**, v. 70, p. 454–467, 2010.

BAUERLE, M. R.; SCHWALM, E. L.; BOOKER, S. Mechanistic diversity of radical S-Adenosylmethionine (SAM)-dependent methylation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 7, p. 3995–4002, 2015.

BÉNÉ, R. et al. Parkinson's disease. **Acta Clinica Croatica**, v. 48, n. 3, p. 377–380, 2009.

BLANCH, M. et al. Altered Mitochondrial DNA Methylation Pattern in Alzheimer Disease-Related Pathology and in Parkinson Disease. **The American Journal of Pathology**, v. 186, n. 2, p. 385–397, 2016.

BLOEM, B. R. et al. The MPTP model: Versatile contributions to the treatment of idiopathic Parkinson's disease. **J Neurol Sci**, v. 97, p. 273–293, 1990.

BONASIO, R.; TU, S.; REINBERG, D. Molecular signals of epigenetic states. **Science**, v. 330, p. 612–616, 2010.

BOTTIGLIERI, T. Folate, Vitamin B12, and S-Adenosylmethionine. **Psychiatr Clin North Am.**, v. 36, p. 1–13, 2013.

BOTTIGLIERI, T.; HYLAND, K.; REYNOLDS, E. H. The Clinical Potential of Ademetionine (S-Adenosylmethionine) in Neurological Disorders. **Drugs**, v. 48, n. 2, p. 137–152, 1994.

BOULLE, F. et al. Epigenetic regulation of the BDNF gene: implications for psychiatric disorders. **Molecular Psychiatry**, p. 1–13, 2011.

BOVÉ, J.; PERIER, C. Neurotoxin-based models of Parkinson's disease. **Neuroscience**, v. 211, p. 51–76, 2012.

BRUECKNER, B. et al. Epigenetic reactivation of tumor suppressor genes by a novel small-molecule inhibitor of human DNA methyltransferases. **Cancer Res**, v. 65, n. 14, p. 6305–6311, 2005.

CARTELLI, D. et al. Microtubule dysfunction precedes transport impairment and mitochondria damage in MPP⁺-induced neurodegeneration. **Journal of Neurochemistry**, v. 115, p. 247–258, 2010.

CHARLTON, C. G. 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺) but not 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) Serves as Methyl Donor for Dopamine: A Possible Mechanism of Action. **Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology**, v. 5, p. 114–118, 1992.

CHARLTON, C. G.; CROWELL, B. J. Striatal dopamine depletion, tremors, and hypokinesia following the intracranial injection of S-adenosylmethionine: a possible role of hypermethylation in parkinsonism. **Mol Chem Neuropathol.**, v. 3, p. 269–284, 1995.

CHATURVEDI, P. et al. High methionine diet poses cardiac threat: a molecular insight. **Journal of Cellular Physiology**, v. 231, p. 1554–1561, 2016.

CHESTNUT, B. A. et al. Epigenetic regulation of motor neuron cell death through DNA methylation. **Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 46, p. 16619–16636, 2011.

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

CLANCY, S.; BROWN, W. Translation: DNA to mRNA to Protein. **Nature Education**, v. 1, n. 1, p. 101, 2008.

COLLINS, M. A. et al. Indole-N-methylated β -carbolinium ions as potential brain-bioactivated neurotoxins. **Brain Research**, v. 570, p. 154–160, 1992.

COPPEDÈ, F. The potential of epigenetic therapies in neurodegenerative diseases. **Frontiers in Genetics, Epigenomics and Epigenetics**, v. 5, p. 1–8, 2014.

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

DAVIS, G. C. et al. Chronic parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogues. **Psychiatry Research**, v. 1, p. 249–254, 1979.

DAY, J. J.; KENNEDY, A. J.; SWEATT, J. D. DNA methylation and its implications and accessibility for neuropsychiatric therapeutics. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 55, p. 591–611, 2015.

DE BONI, L. et al. Next-Generation Sequencing Reveals Regional Differences of the α -Synuclein Methylation State Independent of Lewy Body Disease. **Neuromolecular Medicine**, v. 13, n. 4, p. 310–320, 2011.

DETICH, N. et al. The methyl donor S-Adenosylmethionine inhibits active demethylation of DNA. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 23, p. 20812–20820, 2003.

DEXTER, D. T.; JENNER, P. Parkinson disease: from pathology to molecular disease mechanisms. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 62, p. 132–144, 2013.

DICK, F. D. et al. Environmental risk factors for Parkinson's disease and parkinsonism: the Geoparkinson study. **Occupational and Environmental Medicine**, v. 64, n. 10, p. 666–672, 2007.

DIKMEN, M. Comparison of the Effects of Curcumin and RG108 on NGF-Induced PC-12 Adh Cell Differentiation and Neurite Outgrowth. **Journal of Medicinal Food**, v. 20, n. 4, p. 1–9, 2017.

DO AMARAL, L. **Estudo das vias de sinalização envolvidas na neuritogênese induzida pela doxiciclina em células PC-12**. Ribeirão Preto: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2017.

DOS SANTOS, N. A. G. et al. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) protects PC12 cells from MPP⁺ toxicity by inducing the expression of neuron-typical proteins. **NeuroToxicology**, v. 45, p. 131–138, 2014.

DOS SANTOS, N. A. G. et al. The neuroprotection of cannabidiol against MPP⁺-induced toxicity in PC12 cells involves trkA receptors, upregulation of axonal and synaptic proteins, neuritogenesis, and might be relevant to Parkinson's disease. **Toxicology in Vitro**, v. 30, p. 231–240, 2015.

DUAN, W. et al. Dietary folate deficiency and elevated homocysteine levels endanger dopaminergic neurons in models of Parkinson's disease. **Journal of Neurochemistry**, v. 80, p. 101–110, 2002.

EGGER, G. et al. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic

therapy. **Nature**, v. 429, p. 457–463, 2004.

EMERICK, G. et al. In vitro study of the neuropathic potential of the organophosphorus compounds fenamiphos and profenofos: Comparison with mipafox and paraoxon. **Toxicology in Vitro**, v. 29, p. 1079–1087, 2015.

ERRO, R.; STAMELOU, M. The Motor Syndrome of Parkinson's Disease. **International Review of neurobiology**, v. 132, p. 25–32, 2017.

ESTELLER, M. Epigenetics in Cancer. **The New England Journal of Medicine**, v. 358, p. 1148–1159, 2008.

FAHN, S. The medical treatment of Parkinson disease from James Parkinson to George Cotzias. **Movement Disorders**, v. 30, n. 1, p. 4–18, 2015.

FENG, Y. et al. Neuroprotection by Orexin-A via HIF-1 α induction in a cellular model of Parkinson's disease. **Neuroscience Letters**, v. 579, p. 35–40, 2014.

FENG, Y.; JANKOVIC, J.; WU, Y.-C. Epigenetic mechanisms in Parkinson's disease. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 349, p. 3–9, 2015.

FERNANDES, L. et al. In vitro study of the neuropathic potential of the organophosphorus compounds trichlorfon and acephate. **Toxicology in Vitro**, v. 29, p. 522–528, 2015.

FILBIN, M. T. Axon regeneration: Vaccinating against spinal cord injury. **Current Biology**, v. 10, p. 100–103, 2000.

FOULKES, J. M. et al. Epigenetic drug discovery: targeting DNA methyltransferases. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 17, n. 1, p. 2–17, 2012.

FRAGKOULI, A.; DOXAKIS, E. miR-7 and miR-153 protect neurons against MPP⁺ induced cell death via upregulation of mTOR pathway. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 8, p. 1–14, 2014.

GAO, X. et al. Prospective study of dietary pattern and risk of Parkinson disease. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 86, n. 5, p. 1486–1494, 2007.

GERETS, H. H. J. et al. Selection of cytotoxicity markers for the screening of new chemical entities in a pharmaceutical context: A preliminary study using a multiplexing approach. **Toxicology in Vitro**, v. 23, p. 319–332, 2009.

GERETS, H. H. J.; DHALLUIN, S.; ATIENZAR, F. Multiplexing cell viability assays. In: STODDART, M. J. (Ed.). **Mammalian Cell Viability: Methods and Protocols**. [s.l.] Humana Press, 2011. p. 91–101.

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

GROS, C. et al. DNA methylation inhibitors in cancer: recent and future approaches. **Biochimie**, v. 94, p. 2280–2296, 2012.

HAGG, T. From Neurotransmitters to Neurotrophic Factors to Neurogenesis. **Neuroscientist**, v. 15, n. 1, p. 20–17, 2009.

HAISMA, H. J.; DE HON, O. Gene doping. **International Journal of Sports Medicine**, v. 27, p. 257–266, 2006.

HANSEN, M. B.; NIELSEN, S. E.; BERK, K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. **J Immunol Methods**, v. 2, p. 203–210, 1989.

HERNANDEZ, D. G. et al. Distinct DNA methylation changes highly correlated with chronological age in the human brain. **Human Molec Genet**, v. 20, p. 1164–1172, 2011.

HOLTMAAT, A. J. G. D. et al. Manipulation of gene expression in the mammalian nervous system: application in the study of neurite outgrowth and neuroregeneration-related proteins. **Brain Research Reviews**, v. 26, p. 43–71, 1998.

HORVATH, S. DNA methylation age of human tissues and cell types. **Genome Biology**, v. 14, n. 10, p. 1–19, 2013.

HORVATH, S.; RITZ, B. R. Increased epigenetic age and granulocyte counts in the blood of Parkinson's disease patients. **Aging**, v. 7, n. 12, p. 1130–1142, 2015.

HOSSAIN, M. M. et al. 5-Azacytidine induces toxicity in PC12 cells by apoptosis. **Exp Toxicol Pathol.**, v. 49, p. 201–206, 1997a.

HOSSAIN, M. M. et al. 5-Azacytidine (5Az) induces apoptosis in PC12 cells: a model for 5Az-induced apoptosis in developing neuronal cells. **Histol Histopathol.** 1997 Apr;12(2):439-45., v. 2, p. 439–445, 1997b.

HOWARD, G. et al. Activation and transposition of endogenous retroviral elements in hypomethylation induced tumors in mice. **Oncogene**, v. 27, n. 3, p. 404–408, 2008.

HU, G. et al. Coffee and tea consumption and the risk of Parkinson's disease. **Movement Disorders**, v. 22, n. 15, p. 2242–2248, 2007.

ISHIMARU, N. et al. Differential epigenetic regulation of BDNF and NT-3 genes by

trichostatin A and 5-aza-20-deoxycytidine in Neuro-2a cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 394, p. 173–177, 2010.

JAKUBOWSKI, J. L.; LABRIE, V. Epigenetic Biomarkers for Parkinson's Disease: From Diagnostics to Therapeutics. **Journal of Parkinson's Disease**, v. 7, p. 1–12, 2017.

JIANG, Y. et al. Epigenetics in the nervous system. **J Neurosci**, v. 28, p. 11753–11759, 2008.

JOWAED, A. et al. Methylation Regulates Alpha-Synuclein Expression and Is Decreased in Parkinson's Disease Patients' Brains. **Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 18, p. 6355–6359, 2010.

JURKOWSKA, R. Z.; JURKOWSKI, T. P.; JELTSCH, A. Structure and function of mammalian DNA methyltransferases. **Chembiochem**, v. 12, p. 206–222, 2011.

KAIDERY, N. A.; TARANNUM, S.; THOMAS, B. Epigenetic Landscape of Parkinson's Disease: Emerging Role in Disease Mechanisms and Therapeutic Modalities. **Neurotherapeutics**, v. 10, p. 698–708, 2013.

KAYA-TILKI, E.; DIKMEN, M.; ÖZTÜRK, Y. Effects of DNMT and HDAC Inhibitors (RG108 and Trichostatin A) on NGF induced Neurite Outgrowth and Cellular Migration. **International Journal of Pharmacology**, v. 12, n. 4, p. 351–360, 2016.

KONG, M. et al. 5 -Aza-dC sensitizes paraquat toxic effects on PC12 cell. **Neuroscience Letters**, v. 524, p. 35–39, 2012.

LANDGRAF, B. J.; MCCARTHY, E. L.; BOOKER, S. J. Radical S-Adenosylmethionine Enzymes in Human Health and Disease. **Annual Review of Biochemistry**, v. 85, p. 485–514, 2016.

LARDENOIJE, R. et al. The epigenetics of aging and neurodegeneration. **Progress in Neurobiology**, v. 131, p. 21–64, 2015.

LEE, E.-S. et al. Excessive S-adenosyl-L-methionine-dependent methylation increases levels of methanol, formaldehyde and formic acid in rat brain striatal homogenates: Possible role in S-adenosyl-L-methionine-induced Parkinson's disease-like disorders. **Life Sciences**, v. 83, p. 821–827, 2008.

LEE, E.-S. Y. et al. The Role of Phospholipid Methylation in 1-Methyl-4-Phenyl-Pyridinium Ion (MPP+)-Induced Neurotoxicity in PC12 Cells. **NeuroToxicology**, v. 26, p. 945–957, 2005.

LIU, B.; GAO, H.-M.; HONG, J.-S. Parkinson's disease and exposure to infectious agents and pesticides and the occurrence of brain injuries: role of neuroinflammation. **Environmental Health Perspectives**, v. 111, n. 8, p. 1065–1073, 2003.

LIU, X. X.; WILSON, K.; CHARLTON, C. G. Effects of L-dopa treatment on methylation in mouse brain: implications for the side effects of L-dopa. **Life Sciences**, v. 66, n. 23, p. 2277–2288, 2000.

MALAGELADA, C.; GREENE, L. A. PC12 cells as a model for Parkinson's disease research. In: NASS, R.; PRZEDBORSKI, S. (Eds.). . **Parkinson's Disease: molecular and therapeutic insights from model systems**. [s.l.] Elsevier, 2008. p. 375–387.

MARTÍN-SUBERO, J. I. How epigenomics brings phenotype into being. **Pediatr Endocrinol Rev**, v. 9, p. 506–510, 2011.

MARTINET, N. et al. Small molecules DNA methyltransferases inhibitors. **Medicinal Chemical Communications**, v. 3, p. 263, 2012.

MARTINS, N. M. et al. A tripeptide isolated from *Bothrops atrox* venom has neuroprotective and neurotrophic effects on a cellular model of Parkinson's disease. **Chemico-Biological Interactions**, v. 235, p. 10–16, 2015.

MARUOKA, H. et al. Low-molecular-weight compounds having neurotrophic activity in cultured PC12 cells and neurons. **The Journal of Biochemistry**, v. 150, n. 5, p. 473–475, 2011.

MASLIAH, E. et al. Distinctive patterns of DNA methylation associated with Parkinson disease: Identification of concordant epigenetic changes in brain and peripheral blood leukocytes. **Epigenetics**, v. 8, p. 1030–1038, 2013.

MATSUMOTO, L. et al. CpG Demethylation Enhances Alpha-Synuclein Expression and Affects the Pathogenesis of Parkinson's Disease. **PLoS One**, v. 5, n. 11, p. 1–9, 2010.

MATTSON, M. P.; MAGNUS, T. Aging and neuronal vulnerability. **Nat Rev Neurosci**, v. 7, p. 278–294, 2006.

MHYRE, T. R. et al. Parkinson's Disease. **Subcellular Biochemistry**, v. 65, p. 389–455, 2012.

MIGLIORE, L.; COPPEDÈ, F. Genetics, environmental factors and the emerging role of epigenetics in neurodegenerative diseases. **Mutat Res**, v. 667, p. 82–97, 2009.

MOLINOFF, P. B. Neurotransmission and the Central Nervous System. In: BRUNTON, L. L. (Ed.). . **Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 12th Editi ed. [s.l.] McGraw Hill medical, 2011. p. 363–395.

MÜLLER, T.; FOWLER, B.; KUHN, W. Levodopa Intake Increases Plasma Levels of S-Adenosylmethionine in Treated Patients With Parkinson Disease. **Clinical Neuropharmacology**, v. 28, n. 6, p. 274–276, 2005.

NUMAKAWA, T. Possible protective action of neurotrophic factors and natural compounds against common neurodegenerative diseases. **Neural Regen Res**, v. 9, n. 16, p. 1506–1508, 2014.

OBEID, R. et al. Methylation Status and Neurodegenerative Markers in Parkinson Disease. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 10, p. 1852–1860, 2009.

PARKINSON, J. **An essay on the Shaking Palsy** London Whittingham and Rowland, , 1817.

PAVLOU, M. A. et al. The yin and yang of a-synuclein-associated epigenetics in Parkinson's disease. **Brain**, v. 140, n. 4, p. 878–886, 2017.

PETRUCCELLI, L.; DICKSON, D. W. Neuropathology of Parkinson's disease. In: NASS, R.; PRZEDBORSKI, S. (Eds.). . **Parkinson's Disease: molecular and therapeutic insights from model systems**. [s.l.] Elsevier, 2008. p. 35–48.

RANG, H. P. et al. Distúrbios neurodegenerativos. In: **Farmacologia**. 5ª edição ed. Londres: Elsevier, 2003. p. 559–573.

RANGEL-BARAJAS, C.; CORONEL, I.; FLORÁN, B. Dopamine receptors and neurodegeneration. **Anging and Disease**, v. 6, n. 5, p. 349–368, 2015.

ROJE, S. S-Adenosyl-L-methionine: Beyond the universal methyl group donor. **Phytochemistry**, v. 67, p. 1686–1698, 2006.

ROSS, O. A.; BRAITHWAITE, A. T.; FARRER, M. J. Genetics of Parkinson's disease. In: NASS, R.; PRZEDBORSKI, S. (Eds.). . **Parkinson's Disease: molecular and therapeutic insights from model systems**. [s.l.] Elsevier, 2008. p. 9–33.

SANTOS, N. A. G. et al. The neuroprotection of cannabidiol against MPP+-induced toxicity in PC12 cells involves trkA receptors, upregulation of axonal and synaptic proteins, neuritogenesis, and might be relevant to Parkinson's disease. **Toxicology in Vitro** , v. 30, p. 231–240, 2015.

SCHILDKNECHT, S. et al. Tipping points and endogenous determinants of nigrostriatal degeneration by MPTP. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 38, n. 6, p. 541–555, 2017.

SÉE, V. et al. Calcium/calmodulin dependent protein kinase type IV (CaMKIV) inhibits apoptosis induced by potassium deprivation in cerebellar granule neurons. **Federation of American Societies for Experimental Biology Journal**, v. 15, n. 1, p. 134–144, 2001.

SINGH, V.; SHARMA, P.; CAPALASH, N. DNA Methyltransferase-1 inhibitors as epigenetic therapy for cancer. **Current Cancer Drug Targets**, v. 13, p. 379–399,

2013.

SONG, N. et al. Involvement of CaMKIV in neurogenic effect with chronic fluoxetine treatment. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 16, p. 803–812, 2013.

STRESEMANN, C. et al. Functional Diversity of DNA Methyltransferase Inhibitors in Human Cancer Cell Lines. **Cancer Res**, v. 66, p. 2794–2800, 2006.

STRITTMATTER, S. M.; VARTANIAN, T.; FISHMAN, M. C. GAP-43 as a plasticity protein in neuronal form and repair. **Journal of Neurobiology**, v. 23, n. 5, p. 507–520, 1992.

SUCHY, J. et al. Dietary supplementation with S-adenosyl methionine delays the onset of motor neuron pathology in a murine model of amyotrophic lateral sclerosis. **Neuromolecular Medicine**, v. 12, n. 1, p. 86–97, 2010.

SUFRIN, J. R.; FINCKBEINER, S.; OLIVER, C. M. Marine-Derived Metabolites of S-Adenosylmethionine as Templates for New Anti-Infectives. **Marine Drugs**, v. 7, p. 401–434, 2009.

SUN, Y. et al. Diethyl phthalate enhances expression of SIRT1 and DNMT3 α during apoptosis in PC12 cells. **Journal of Applied Toxicology**, v. 33, n. 12, p. 1484–1492, 2013.

SURMEIER, J. Overview: cell-based models of Parkinson's disease. In: NASS, R.; PRZEDBORSKI, S. (Eds.). **Parkinson's Disease: molecular and therapeutic insights from model systems**. [s.l.] Elsevier, 2008. p. 371–374.

SZYF, M.; MCGOWAN, P.; MEANEY, M. The Social Environment and the Epigenome. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 49, p. 46–60, 2008.

TATTON, W. G. et al. Apoptosis in Parkinson's disease: Signals for neuronal degradation. **Ann Neurol**, v. 53, p. 61–72, 2003.

TEIVE, H. A. G.; MUNHOZ, R. P.; LEES, A. J. Parkinson's disease - 200 years: the outstanding contribution of "Old Hubert". **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 75, n. 3, p. 192–194, 2017.

TISCHFIELD, M. A.; ENGLE, E. C. Distinct α and β -tubulin isotypes are required for the positioning, differentiation, and survival of neurons: new support for the "multi-tubulin" hypothesis. **Bioscience Reports**, v. 30, n. 5, p. 319–330, 2010.

TOHDA, C.; KUBOYAMA, T.; KOMATSU, K. Search for Natural Products Related to Regeneration of the Neuronal Network. **Neurosignals**, v. 14, p. 34–45, 2005.

VAN DEN EEDEN, S. K. et al. Incidence of Parkinson's Disease: Variation by Age, Gender, and Race/Ethnicity. **American Journal of Epidemiology**, v. 157, n. 11, p. 1015–1022, 2003.

WANG, S. C.; FREY, P. A. S-adenosylmethionine as an oxidant: the radical SAM superfamily. **TRENDS in Biochemical Sciences**, v. 32, n. 3, p. 101–110, 2007.

WANG, X.; WANG, H. Epigenotoxicity of environmental pollutants evaluated by a combination of DNA methylation inhibition and capillary electrophoresis–laser-induced fluorescence immunoassay. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, p. 2435–2442, 2013.

WANG, Y. et al. A DNA Methyltransferase Inhibitor, 5-Aza-2'-Deoxycytidine, Exacerbates Neurotoxicity and Upregulates Parkinson's Disease-Related Genes in Dopaminergic Neurons. **CNS Neuroscience & Therapeutics**, v. 19, p. 183–190, 2013.

WHO. Parkinson's disease. In: **Neurological Disorders: public health challenges**. Geneva: World Health Organization, 2006. p. 140–150.

WU, C.-L. et al. Interplay between Cell Migration and Neurite Outgrowth Determines SH2B1b-Enhanced Neurite Regeneration of Differentiated PC12 Cells. **PLoS One**, v. 7, n. 4, 2012.

XU, Z.; LI, H.; JIN, P. Epigenetics-Based Therapeutics for Neurodegenerative Disorders. **Current Translational Geriatrics and Gerontology Reports**, v. 1, n. 4, p. 229–236, 2012.

YUAN, D. et al. Chikusetsu Saponin V Attenuates MPP+-Induced Neurotoxicity in SH-SY5Y Cells via Regulation of Sirt1/Mn-SOD and GRP78/Caspase-12 Pathways. **Int J Mol Sci**, v. 15, p. 13209–13222, 2014.

ZADORI, D. et al. Some molecular mechanisms of dopaminergic and glutamatergic dysfunctioning in Parkinson's disease. **J. Neural Transm.**, v. 120, p. 673–681, 2013.

ZAKHARI, S. Alcohol metabolism and epigenetics changes. **Alcohol Research: Current Reviews**, v. 35, n. 1, p. 6–16, 2013.

ZHAO, W. Q. et al. S-adenosyl-methionine-induced apoptosis in PC12 cells. **J Neurosci Res**, v. 69, n. 4, p. 519–529, 2002.