

IMUNOHISTOQUÍMICA NA DOENÇA DE PARKINSON: QUANTIFICAÇÃO DE NEURÔNIOS E AVALIAÇÃO DE NEUROINFLAMAÇÃO EM MODELOS ANIMAIS

Antonio Eduardo Teodorio Galvão¹, Marianne Celestino Andrade², Victória Garcia Peres³, Lorena Emília Lopes⁴, Tatiane Batista dos Santos⁵.

antoniogalvao190203@gmail.com

¹Universidade Tiradentes(UNIT)/Enfermagem/Aracaju/SE.

^{2,3}Universidade Tiradentes (UNIT), Mestranda pelo Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde/Aracaju/SE.

⁴Instituto de Tecnologia e Pesquisa/Aracaju/SE.

⁵Universidade Tiradentes (UNIT)/ Doutoranda pelo Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde/Aracaju/SE.

2.00.00.00-6 - Ciências Biológicas; 20700008 – Fisiologia

RESUMO

Introdução: A imunohistoquímica (IHQ) é amplamente empregada na pesquisa experimental em Doença de Parkinson (DP), por possibilitar a detecção precisa da perda de neurônios dopaminérgicos e da ativação glial. Entre os principais marcadores utilizados destacam-se a tirosina hidroxilase (TH), representativa da integridade neuronal dopaminérgica, e a proteína glial fibrilar ácida (GFAP), indicadora de astroglioses e neuroinflamação. A análise desses biomarcadores permite compreender os mecanismos celulares envolvidos na neurodegeneração. **Objetivo:** Revisar os protocolos baseados em IHQ utilizados para avaliação da expressão de TH e GFAP, com ênfase na quantificação neuronal e análise densitométrica em modelos animais de DP. **Metodologia:** Trata-se de uma revisão narrativa da literatura, realizada nas bases *PubMed*, *Science Direct* e *SciELO*, incluindo artigos originais publicados entre 2018 e 2025, nos idiomas inglês, português e espanhol. Foram utilizadas as palavras-chave “*immunohistochemistry*”, “*Parkinson’s disease*”, “*tyrosine hydroxylase*” e “*glial fibrillary acidic protein*”, combinados pelo operador booleano *AND*. Excluíram-se dissertações, teses e estudos duplicados, sendo incluídos estudos que descreviam protocolos experimentais com análise imunohistoquímica da substância negra e/ou estriado, contendo quantificação objetiva dos marcadores analisados. **Resultados:** Diante dos resultados, dez artigos compuseram a presente revisão. A literatura demonstra que, após indução da lesão dopaminérgica por 6-hidroxidopamina (6-OHDA), neurotoxina amplamente aplicada por sua capacidade de degeneração de neurônios dopaminérgicos. Visto isso, a IHQ é realizada em cortes encefálicos com anticorpos específicos para TH e GFAP, revelados por 3,3'-diaminobenzidina (DAB), permitindo a visualização marrom das células marcadas. Para a quantificação neuronal, o software ImageJ é utilizado para contagem manual ou semiautomática de células TH+, adotando múltiplas seções por animal para evitar viés amostral e aumentando a precisão estatística dos achados. Em

paralelo, a densidade óptica relativa de TH e GFAP é analisada por escala de cinza (0–255), na qual valores mais escuros indicam maior expressão proteica. Em muitos estudos, essa análise é realizada em regiões específicas como estriado dorsolateral, ventrolateral e substância negra pars compacta. Os dados são normalizados pelo lado contralateral ou pelo córtex, que funciona como controle interno do próprio animal. Os resultados revisados convergem para a observação de redução significativa de neurônios TH+ e aumento expressivo da imunorreatividade para GFAP nos animais lesionados, corroborando a associação entre degeneração dopaminérgica, estresse oxidativo e ativação glial reativa como elementos-chave na fisiopatologia da DP. **Conclusão:** A IHQ associada à quantificação de neurônios TH+ e à análise densitométrica de GFAP se torna um método padrão para avaliar morte neuronal e neuroinflamação em modelos experimentais da DP. Por sua alta reprodutibilidade, essa abordagem é de relevante para validar mecanismos fisiopatológicos e testar a eficácia de terapias neuroprotetoras.

PALAVRAS-CHAVE: Biomarcadores, Neurodegeneração, Neuroinflamação.

ABSTRACT:

Introduction: Immunohistochemistry (IHC) is widely employed in experimental research on Parkinson's disease (PD) as it enables precise detection of dopaminergic neuronal loss and glial activation. Among the main markers used are tyrosine hydroxylase (TH), representative of dopaminergic neuronal integrity, and glial fibrillary acidic protein (GFAP), an indicator of astrogliosis and neuroinflammation. The analysis of these biomarkers allows a better understanding of the cellular mechanisms involved in neurodegeneration. **Objective:** To review IHC-based protocols used for evaluating TH and GFAP expression, with emphasis on neuronal quantification and densitometric analysis in animal models of PD. **Methodology:** This is a narrative literature review conducted in the PubMed, ScienceDirect, and SciELO databases, including original articles published between 2018 and 2025, in English, Portuguese, and Spanish. The keywords "immunohistochemistry," "Parkinson's disease," "tyrosine hydroxylase," and "glial fibrillary acidic protein" were combined using the Boolean operator AND. Dissertations, theses, and duplicate studies were excluded. Studies describing experimental protocols with immunohistochemical analysis of the substantia nigra and/or striatum containing objective quantification of the analyzed markers were included. **Results:** Ten articles were included in this review. The literature demonstrates that, following dopaminergic lesion induction with 6-hydroxydopamine (6-OHDA)—a neurotoxin widely used for its ability to cause dopaminergic neuronal degeneration—IHC is performed on brain sections using specific antibodies for TH and GFAP, revealed with 3,3'-diaminobenzidine (DAB), allowing brown visualization of labeled cells. For neuronal quantification, ImageJ software is employed for manual or semi-automatic counting of TH+ cells, using multiple sections per animal to avoid sampling bias and improve statistical accuracy. In parallel, the relative optical density of TH and GFAP is analyzed using a grayscale scale (0–255), where darker values indicate higher protein expression. In many studies, this analysis is performed in specific regions such as the dorsolateral and ventrolateral striatum and the substantia nigra pars compacta. Data are normalized to the contralateral side or cortex, which serves as the animal's internal control. The reviewed studies consistently report a significant reduction in TH+ neurons and an expressive increase in GFAP immunoreactivity in lesioned animals, supporting the association between dopaminergic degeneration, oxidative stress, and reactive glial activation as key elements in PD pathophysiology. **Conclusion:** IHC combined with TH+ neuronal quantification and GFAP densitometric analysis has become a standard method for evaluating neuronal death and neuroinflammation in experimental models of PD. Due to its high reproducibility, this approach is highly relevant for validating pathophysiological mechanisms and testing the efficacy of neuroprotective therapies.

KEYWORDS: Biomarkers, Neurodegeneration, Neuroinflammation.

REFERÊNCIAS/REFERENCES:

1. BELFIORI, Lautaro Francisco *et al.* Nigral transcriptomic profiles in Engrailed-1 hemizygous mouse models of Parkinson's disease reveal upregulation of oxidative phosphorylation-related genes associated with delayed dopaminergic

neurodegeneration. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 16, p. 1337365, 2024. Acesso em: 25 de outubro de 2025.

2. DE MORAES THOMASI, Beatriz Bastos *et al.* Enteric glial cell reactivity in colonic layers and mucosal modulation in a mouse model of Parkinson's disease induced by 6-hydroxydopamine. **Brain Research Bulletin**, v. 187, p. 111-121, 2022. Acesso em: 26 de outubro de 2025.
3. HONG, Su Min *et al.* Optimization of protocols for immunohistochemical assessment of enteric nervous system in formalin fixed human tissue. **bioRxiv**, 2024. Acesso em: 27 de outubro de 2025.
4. KOHALE, Mangesh G. *et al.* Immunohistochemistry in pathology: A review. **Journal of Cellular Biotechnology**, v. 9, n. 2, p. 131-138, 2023. Acesso em: 27 de outubro de 2025.
5. LUIJERINK, Lauren *et al.* GFAP expression in the BRAIN during human postnatal development. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, v. 50, n. 5, p. e13007, 2024. Acesso em: 23 de outubro de 2025.
6. MURPHY, Erin K. *et al.* Evaluating Parkinson's disease biomarkers in substantia nigra following sublethal γ -radiation exposure in a large animal model. **npj Parkinson's Disease**, v. 11, n. 1, p. 286, 2025. Acesso em: 27 de outubro de 2025.
7. ROOSTALU, Urmas *et al.* Quantitative whole-brain 3D imaging of tyrosine hydroxylase-labeled neuron architecture in the mouse MPTP model of Parkinson's disease. **Disease models & mechanisms**, v. 12, n. 11, p. dmm042200, 2019. Acesso em: 27 de outubro de 2025.
8. SANTORO, Matteo *et al.* Mapping of catecholaminergic denervation, neurodegeneration, and inflammation in 6-OHDA-treated Parkinson's disease mice. **npj Parkinson's Disease**, v. 11, n. 1, p. 28, 2025. Acesso em: 26 de outubro de 2025.
9. SU, Rui-Jun *et al.* Time-course behavioral features are correlated with Parkinson's disease-associated pathology in a 6-hydroxydopamine hemiparkinsonian rat model. **Molecular medicine reports**, v. 17, n. 2, p. 3356-3363, 2018. Acesso em: 27 de outubro de 2025.
10. VECCHIO, Laura M. *et al.* Enhanced tyrosine hydroxylase activity induces oxidative stress, causes accumulation of autotoxic catecholamine metabolites, and augments amphetamine effects in vivo. **Journal of neurochemistry**, v. 158, n. 4, p. 960-979, 2021. Acesso em: 27 de outubro de 2025.