UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

ÁGATHA OLIVEIRA GIACOMELLI

Papel dos receptores purinérgicos em modelo animal de Doença de Parkinson

Versão original da Tese defendida

São Paulo

Data do depósito na SPG:

01/08/2018

ÁGATHA OLIVEIRA GIACOMELLI

Papel dos receptores purinérgicos em modelo animal de Doença de Parkinson

Tese apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para Obtenção do Título de Doutor em Ciências (Bioquímica)

Orientador: Prof. Dr. Alexander Henning Ulrich

São Paulo

2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletronico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

O48p

Oliveira-Giacomelli, Ágatha
Papel dos receptores purinérgicos em modelo animal de Doença de Parkinson / Ágatha Oliveira-Giacomelli. - São Paulo, 2018.
108 p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Bioquímica.
Orientador: Ulrich, Alexander Henning

1. Doença de Parkinson. 2. Receptores Purinérgicos. 3. Brilliant Blue G. 4. Receptor P2X7. 5. Receptor P2Y6. I. T. II. Ulrich, Alexander Henning , orientador.

À minha madrinha, Maria Cecília (em memória)

Ao meu marido Filipe , meus pais Ariâny e Pércio, minha irmã, Tainah.

Agradecimentos

Ao final de 4 anos de superação profissional e, com maior intensidade, de superação pessoal, mais uma vez a vida me mostrou que sozinha não alcançaria meus objetivos e sonhos.

Inicio meus agradecimentos com minha madrinha Maria Cecília, por me acolher em São Paulo para que eu iniciasse meus estudos e me cuidar como filha. Em 2016 batalhamos juntas contra o câncer e infelizmente perdemos. Dedico esse trabalho a ela, que continue ajudando a me guiar lá de cima.

Agradeço muito ao meu marido Filipe pelo apoio durante a graduação, mestrado e doutorado. Durante minhas incontáveis falhas experimentais, as incertezas de quais caminhos seguir e as minhas constantes crises emocionais, sua força tornou-se a minha força, sua alegria me encheu de esperança e motivação, sua compreensão e companheirismo me deram foco para construir nosso futuro.

O amor incondicional de meus pais Ariâny e Pércio é o responsável pela minha ambição e criação dos meus sonhos. Agradeço por nunca duvidarem da minha capacidade de chegar longe, cada uma das conquistas profissionais que obtive foi inspirada na pessoa que eles sabiam que eu poderia ser. Agradeço também à minha irmãzinha, Tainah. Obrigada Tata por estar sempre presente! Ter você me alivia, me dá forças e me motiva a ser sempre melhor.

Agradeço muito meus amigos que estão longe. Se fazem presentes mesmo que os quilômetros sejam extensos, e fizeram minha vida ser mais leve e divertida durante o doutorado. Obrigada pelas palavras, pelos encontros calorosos cheios de vida e amor.

Minha pesquisa de doutorado contou muito com a participação de colegas que se tornaram amigos essenciais e parceiros de jornada, que muito agradeço. Ana Paula que dividiu comigo todos os anseios de cada etapa e vibramos juntas cada conquista, Juliana minha pós doc linda que muitas vezes me ajudou a respirar fundo e a confiar no meu trabalho, e Elisa pela amizade boa que aliviou o peso do doutorado: obrigada, cachinhos! Héllio e Carolzinha pela amizade e horas de trabalho juntos no biotério (muito mais leves, divertidas e produtivas com vocês!), Teresa, Carol e Yahaira, pelos desabafos e discussões científicas. Laura, Talita, Claudiana (agora prof.!), Zilda e Denise, colegas queridas que muito respeito e admiro, e demais colegas do laboratório.

Meu agradecimento profundo ao meu orientador, prof. Henning, por ser solícito e compreensivo, por acreditar e confiar em meu trabalho, pelas oportunidades e palavras de motivação e enaltecimento. A todos os professores e funcionários, por tornarem possível a realização desse trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de doutorado e demais agências de fomento.

Finalmente, agradeço a Deus pelas oportunidades e aos animais experimentais, minha eterna gratidão.

“You cannot hope to build a better world without improving the individuals. To that end, each of us must work for our own improvement and, at the same time, share a general responsibility for all humanity, our particular duty being to aid those to whom we think can be most useful”

Marie Curie

RESUMO

Oliveira-Giacomelli, Á. **Papel dos receptores purinérgicos em modelo animal de Doença de Parkinson.** 2018. 108p. Tese – Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A Doença de Parkinson é uma doença altamente incapacitante e de grande prevalência. Pouco se sabe sobre sua etiologia e os tratamentos atuais consistem na diminuição dos sintomas, uma vez que ainda não foi encontrada uma maneira de reverter o déficit de neurônios dopaminérgicos observados nos pacientes acometidos. Sabe-se que os receptores purinérgicos são encontrados por todo o sistema nervoso central, não só no indivíduo adulto como também em diferentes estágios do desenvolvimento embrionário e estão envolvidos com proliferação e diferenciação celular. Este trabalho estudou a participação dos receptores purinérgicos em modelo animal de doença de Parkinson por lesão dos neurônios dopaminérgicos da via nigroestriatal com 6-OH dopamina (6-OHDA). Realizamos a análise do perfil de expressão gênica dos diferentes receptores após a lesão e subsequente modulação. Observamos expressão gênica alterada dos receptores P2X7 e P2Y6 até 5 semanas após a lesão. O uso do antagonista do receptor P2X7 Brilliant Blue G (BBG) induziu a regeneração da via nigroestriatal e o uso do antagonista do receptor P2Y6 MRS2578 preveniu a morte dos neurônios. Como esses efeitos foram acompanhados pela inativação de células microgliais, supõe-se que o controle do microambiente neuroinflamatório causado pela injeção de 6-OHDA seja a principal causa do efeito antiparkinsoniano observado pelo tratamento com BBG e MRS2578. Além disso, o transplante celular com células precursoras neurais

não foi capaz de reverter o comportamento hemiparkinsoniano dos animais lesionados. Apesar do uso concomitante com BBG reduzir o comportamento, parece que esse efeito deve-se ao BBG per se, uma vez que o tratamento somente com o antagonista de P2X7 foi mais eficaz. De maneira geral, a modulação da atividade dos receptores purinérgicos se mostrou uma ferramenta promissora na pesquisa de cura e compreensão das bases moleculares da Doença de Parkinson.

Palavras-chave: Doença de Parkinson, Receptores Purinérgicos, Receptor P2X7, Receptor P2Y6, Neurodegeneração.

ABSTRACT

Oliveira-Giacomelli, Á. **Role of purinergic receptors in an animal model of Parkinson's Disease.** 2018. 108p. PhD Thesis – Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Parkinson's disease is a highly disabling and prevalent disease. Little is known about its etiology and the current treatments consist in the reduction of the symptoms, since there is no known method to reverse the dopaminergic neurons deficit observed in patients. Purinergic receptors are found throughout the central nervous system, not only in the adult individual but also at different stages of embryonic development, and are involved in proliferation and differentiation. This work investigated the role of purinergic receptors in the animal model of Parkinson's disease induced by 6-OH dopamine (6-OHDA) injection and consequent death of dopaminergic neurons of the nigrostriatal pathway. Patterns of purinergic receptors gene expression after the lesion and subsequent modulation were analyzed. We observed altered gene expression of P2X7 and P2Y6 receptors within 5 weeks of injury. The use of the P2X7 receptor antagonist Brilliant Blue G (BBG) induced the regeneration of the nigrostriatal pathway and treatment with P2Y6 receptor antagonist MRS2578 prevented the death of the neurons. Since these effects were accompanied by the inactivation of microglial cells, it is assumed that the control of neuroinflammatory milieu caused by the 6-OHDA injection is the main cause of the antiparkinsonian effect observed by the treatment with BBG and MRS2578. In addition, transplantation with neural precursor cells was not able to reverse the hemiparkinsonian behavior of injured animals. Although concomitant use with BBG improved cell engraftment, it appears that this effect is due to BBG *per se*, since treatment with only this P2X7

receptor antagonist was more effective. In general, modulation of purinergic receptor activity showed to be a promising tool in the research of cure and understanding of the molecular bases of Parkinson's Disease.

Keywords: Parkinson's disease, Purinergic Receptors, P2X7 Receptor, P2Y6 Receptor, Neurodegeneration.

Lista de ilustrações

Figura 1.: Mecanismo de ação do composto 6-hidroxidopamina.....23

Figura 2.: Subfamílias de receptores purinérgicos P2.....27

Figura 3.: Protocolos seguidos na realização desse trabalho.....37

Figura 4.: Ilustração representativa das injeções intracranianas.....38

Figura 5. Comportamento rotacional de animais lesionados com 6-OHDA.....48

Figura 6. Análise imunohistoquímica da progressão da lesão com 6-OHDA no estriado e substância negra.....49

Figura 7. Padrão de expressão gênica de subtipos de receptores purinérgicos no estriado de ratos 1, 3 e 5 semanas após lesão com 6-OHDA.....52

Figura 8. Padrão de expressão gênica do receptor P2X7 no estriado de ratos 1, 3 e 5 semanas após cirurgia estereotáxica.....53

Figura 9. Curva dose-resposta da administração de BBG em animais lesionados.....55

Figura 10. Análise imunohistoquímica da marcação para TH no estriado de animais tratados com BBG.....58

Figura 11. Análise imunohistoquímica da marcação para TH na substância negra de animais tratados com BBG.....60

Figura 12. Análise imunohistoquímica da marcação para Iba-1 no estriado de animais tratados com BBG.....61

Figura 13. Análise imunohistoquímica da marcação para Iba-1 na substância negra de animais tratados com BBG.....63

Figura 14. Análise imunohistoquímica da marcação para NeuN em animais tratados com BBG.....64

Figura 15.: Ensaio de viabilidade celular por redução de MTT.....66

Figura 16. Teste rotacional induzido por apomorfina em animais tratados com MRS2578.....67

Figura 17. Análise imunohistoquímica da marcação para TH no estriado de animais tratados com MRS2578.....69

Figura 18. Análise imunohistoquímica da marcação para TH na substância negra de animais tratados com MRS2578.....70

Figura 19.: Análise imunohistoquímica da marcação para Iba-1 no estriado de animais tratados com MRS.....71

Figura 20.: Análise imunohistoquímica da marcação para Iba-1 na substância negra de animais tratados com MRS.....72

Figura 21.: Análise de expressão de marcadores celulares em células E14Tg2a diferenciada em neurônios dopaminérgicos por imunocitoquímica...73

Figura 22. Teste rotacional induzido por apomorfina em animais transplantados e tratados com BBG.....75

Figura 23.: Possíveis mecanismos neuroinflamatórios modulados por receptores P2X7 e P2Y6 na lesão com 6-OHDA.....88

Lista de Tabelas

Tabela 1.: Composição dos meios celulares utilizados.....42

Tabela 2.: Sequência de primers utilizados na técnica de qRT-PCR para ratos.....45

Tabela 3: Média e erro padrão da média (E.P.M) da expressão gênica de receptores purinérgicos do estriado de animais lesionados com 6-OHDA.....53

Tabela 4: Média e erro padrão da média (E.P.M) das análises imunohistoquímicas para TH de animais tratados com BBG.....60

Tabela 5.: Número de neurônios NeuN+ em animais tratados com BBG.....64

Tabela 6: Número de rotações por minuto de animais transplantados com ou sem tratamento com BBG.....75

Sumário

1. Introdução 18

1.1 Doença de Parkinson 18

1.1.1 Neuroinflamação na Doença de Parkinson 21

1.1.2 Modelos animais de doença de Parkinson 22

1.2 Sistema Purinérgico 25

1.2.2 Sistema Purinérgico no Sistema Nervoso embrionário e adulto 28

1.2.3 Receptores P2 na doença de Parkinson 29

2. Justificativa 33

3. Objetivos 34

2.1 Objetivo geral 34

2.2 Ojetivos específicos 34

4. Materiais e Métodos 36

3.1 Animais 37

3.1.1 Modelo animal de Doença de Parkinson 37

3.1.2 Teste rotacional induzido por apomorfina 38

3.1.3 Administração de Brilliant Blue G (BBG) 39

3.1.4 Administração de MRS2578 39

3.1.5 Transplante celular 40

3.2 Cultura celular 40

3.2.1 Cultivo e diferenciação de células SH-SY5Y 40

3.2.2 Ensaio de viabilidade celular por redução de tetrazólio 41

3.2.3 Cultivo e diferenciação de células E14Tg2a 41

3.3 Análises Bioquímicas 43

3.3.1 Ensaio de Imunohistoquímica 43

3.3.2 Ensaio de Imunofluorescência 44

3.3.3 *Polymerase chain reaction* quantitativo em tempo real.....45

3.4 Análise estatística 46

5. Resultados.....47

4.1 Curva tempo-resposta da lesão com 6-OHDA 47

4.1.1 Caracterização da lesão 47

4.1.2 Expressão dos receptores purinérgicos na progressão da lesão com 6-OHDA 49

4.2 Modulação farmacológica do receptor P2X7 54

4.2.1 Análise comportamental 55

4.2.2 Análise dos neurônios dopaminérgicos da via nigroestriatal 55

4.2.3 Análise do estado de ativação das células microgliais 60

4.2.4 Análise de outros tipos de neurônios 63

4.3 Modulação farmacológica do receptor P2Y6 65

4.3.1 Ensaio de viabilidade celular por redução de MTT 65

4.3.2 Análise comportamental 67

4.3.3 Análise dos neurônios dopaminérgicos da via nigroestriatal 68

4.3.4 Análise do estado de ativação das células microgliais 70

4.4 Terapia de transplante celular.....73

4.4.1 Caracterização da diferenciação dopaminérgica de células E14Tg2a.....73

4.4.2 Transplante Celular.....74

6. Discussão 76

7. Conclusões 87

8. Perspectivas.....90

9. Referências Bibliográficas 91

8. Lista de Anexos 107

8.1 Artigos completos publicados em periódicos 107

8.2 Capítulos de livros publicados.....108

8.3 Capítulos de livros aceitos para publicação 108

1. Introdução

1.1 Doença de Parkinson

A Doença de Parkinson é uma doença neurodegenerativa caracterizada pelo aparecimento de sintomas motores e sintomas não motores, como disfunção cognitiva, psicose, distúrbios do sono e transtornos de humor (Moustafa e Poletti, 2013). Os sintomas motores, caracterizados por tremor, bradicinesia, rigidez e paralisia postural, foram descritos pela primeira vez em 1690 por Ferenc Páriz no tratado médico *Pax corporis*. Em sua monografia "*An Essay on the shaking palsy*" de 1817, James Parkinson descreveu que tremor de repouso e marcha festinante eram sintomas chave no transtorno, que até então não havia sido caracterizado (Parkinson, 2002). Anos mais tarde, o francês Jean Charcot atribuiu o nome de "Mal de Parkinson" à doença e hipotetizou que os tremores observados não eram decorrentes de uma fraqueza muscular, como acreditava James Parkinson (Kempster et al., 2007). Entretanto, somente mais de 100 anos depois foi caracterizada a perda de neurônios na substância negra do encéfalo e estabelecida a relação desses neurônios com o neurotransmissor dopaminérgico nos indivíduos acometidos (Björklund e Dunnett, 2007).

A Doença de Parkinson é altamente incapacitante e acomete cerca de 1% da população com idade entre 65 e 69 anos, podendo alcançar até 3% dos indivíduos com mais de 80 anos de idade (de Lau e Breteler, 2006). O diagnóstico da doença é realizado pela análise sintomática dos pacientes, caracterizado pela presença de bradicinesia, três ou mais sintomas de suporte e pelo menos um dos seguintes sintomas: rigidez muscular, tremor de repouso ou instabilidade postural, além de não

se enquadrar nos critérios de exclusão (Thenganatt e Jankovic, 2014). Estudos *post-mortem* mostram que entre 80 a 90% dos diagnósticos de Parkinson são acurados, entretanto há dificuldade de identificação da doença nos estágios iniciais e quando a tentativa de diagnóstico é realizada sem acompanhamento prévio do paciente (De Lau e Breteler, 2006).

Apesar do grande impacto na população, pouco se sabe sobre a etiologia da doença. Acredita-se que estresse oxidativo, disfunção mitocondrial e proteínas danificadas, em combinação com pré-disposição genética, contribuam para o desenvolvimento da doença (De Lau e Breteler, 2006). A fisiopatologia da Doença de Parkinson é baseada na perda de neurônios dopaminérgicos e a presença de agregados proteicos positivos para α-sinucleína conhecidos como corpos de Lewys, principalmente na substância negra *pars compacta* (Hornykiewicz, 1966). Além disso, pacientes com a Doença de Parkinson apresentam comprometimento de neurônios monoaminérgicos do neocórtex, tronco encefálico, hipotálamo, bulbo olfatório, gânglios simpáticos e neurônios parassimpáticos do intestino (Schulz e Falkenburger, 2004). Sabe-se que a neurodegeneração da substância negra resulta em uma perda da inervação do estriado (núcleo caudado e putâmen) acompanhada pela diminuição da biodisponibilidade de dopamina (Hughes et al., 1992). Adicionalmente, recentemente foi descoberta a relação de diversos genes com o desenvolvimento da doença, incluindo os genes α-sinucleína (*SNCA*), parkina/*PRKN*, *DJ-1/Park7*, cinase-1 induzida por PTEN (*PINK1*), e cinase rica em repetição de leucina 2 (*LRRK2*) (Hoang, 2014).

O tratamento da Doença de Parkinson é feito através da administração de compostos que aumentam a neurotransmissão dopaminérgica, como o potente composto L-3,4-diidroxifenilalanina (L-dopa). A L-dopa é um precursor de

catecolaminas que, diferente da dopamina, é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica. No encéfalo, a L-dopa sofre ação da enzima dopa descarboxilase gerando dopamina, aumentando a biodisponibilidade dessa monoamina e culminando na remissão dos sintomas parkinsonianos (Hornykiewicz, 2002). Entretanto, longo tempo de uso desse composto desencadeia inúmeros efeitos adversos como náusea, hipotensão, alucinações e sonolência, bem como discinesias, que chegam a afetar 50% dos pacientes em tratamento por mais de 5 anos (Lang, 2009; Olanow et al., 2009). Assim, torna-se necessário o estudo de terapias alternativas para o tratamento da doença.

Com a elucidação do processo de neurogênese e a constatação da presença de células-tronco multipotentes na zona subventricular e na zona subgranular do hipocampo capazes de se diferenciar em neurônios e células da glia (Hayashi et al., 2018), foi levantada a hipótese de que o tratamento com células-tronco e o controle de sua diferenciação e migração poderia ser uma potencial terapia para a reversão do déficit de neurônios dopaminérgicos observado nos pacientes com Doença de Parkinson. Além disso, recentemente foi demonstrada a presença de neurogênese no estriado de cérebros adultos humanos (Ernst et al., 2014).

Pela sua capacidade de se diferenciar em qualquer tipo celular, foram conduzidos diversos estudos com transplante de células-tronco embrionárias, resultando na diferenciação indiscriminada dessas células em uma variedade de células neurais (Bjorklund et al., 2002), incluindo formação de tumores, demonstrando a necessidade de sua modulação após o transplantante. O avanço da pesquisa permitiu o desenvolvimento de técnicas para indução de diferenciação das células-tronco embrionárias para obtenção de uma população de células ricas em neurônios dopaminérgicos que, quando transplantada, induz a remissão dos

sintomas em modelo animal de Doença de Parkinson (Hedlund et al., 2007). Entretanto, a sobrevivência e correta integração dessas células no tratamento da doença ainda é um desafio, uma vez que a via nigroestriatal dopaminérgica parece ser um dos fatores reguladores da neurogênese adulta e a lesão com 6-OHDA diminuir a proliferação de células progenitoras neurais da zona subventricular (Baker et al., 2004).

1.1.1 Neuroinflamação na Doença de Parkinson

A inflamação é a resposta do sistema imune ao desbalanço homeostático celular de condições fisiológicas e patológicas, e pode exercer efeitos benéficos ou prejudiciais (Ransohoff et al., 2015). Em doenças neurodegenerativas, a morte celular tende a se expandir como consequência de processos neuroinflamatórios desencadeados pela liberação de biomoléculas - como o ATP - chamadas padrões moleculares associados a danos (DAMPs, do inglês *Danger Associated Molecular Pattern*), que agem como sinais de perigo e recrutam células da microglia – as representantes do sistema imune no encéfalo. Em resposta aos DAMPs, as células microgliais em repouso que amplamente populam o sistema nervoso central rapidamente se tornam reativas, apresentando uma mudança morfológica mais ramificada e amebóide, e migram para focos de neurodegeneração, como observado em cérebros *post-mortem* de pacientes com Doença de Parkinson (Pasqualetti et al., 2015).

A resposta aos insultos lesivos ocorre através da interação dos DAMPs liberados pelas células em processo apoptótico com: a. célula microgliais, por receptores do tipo Toll; b. astrócitos, também com receptores do tipo Toll; c. com neurônios, por proteínas membranares como CX3CL1, CD200, 22, 47 e 95 (Brown

e Neher, 2010). Os DAMPs induzem a liberação de fatores pró-inflamatórios pela microglia, como por exemplo o fator necrótico tumoral-α e interleucinas 1-β, 6 e 12, e em menor intensidade por astrócitos (Rama Rao and Kielian, 2015; Tang and Le, 2016). Esses compostos, por sua vez, modulam cascatas de sinalização intracelular pró-apoptóticas e pró-inflamatórias que propagam a resposta inflamatória e exacerbam a morte neuronal em humanos e modelos animais de Doença de Parkinson (Davalos et al., 2005; Wilms et al., 2003).

Além de exercer um papel proeminente na patofisiologia da doença, estudos recentes com animais mostram processos neuroinflamatórios também em modelos de uso contínuo de L-Dopa com presença de discinesia, evidenciando a importancia do estudo da imunomodulação no tratamento da Doença de Parkinson (Pisanu et al., 2018). Atualmente, há na literatura muitos trabalhos que propoem a modulação da neuroinflamação como tratamento para a Doença de Parkinson, corroborando a importância de verificar estreita relação entre neurodegeneração e neuroinflamação no *screening* de novas drogas para o tratamento da doença (Lee et al., 2017).

1.1.2 Modelos animais de doença de Parkinson

Uma das ferramentas mais utilizadas no estudo de patologias é o uso de modelos animais que mimetizam o comportamento e as alterações bioquímicas de diferentes enfermidades, possibilitando o estudo de novas alternativas de tratamento cada vez mais eficazes e seguras. O uso de ferramentas farmacológicas e manipulação genética possibilita a obtenção de modelos animais de Doença de Parkinson.

Um dos modelos animais de maior valor preditivo e de constructo para o estudo da Doença de Parkinson é através da lesão da via nigro-estriatal pela infusão

de 6-hidroxidopamina (6-OHDA), que induz hemiparkinsonismo devido à depleção de neurônios dopaminérgicos na região dos núcleos da base (Deumens et al., 2002). A 6-OHDA é uma neurotoxina de estrutura análoga à dopamina que, quando injetada no encéfalo de ratos e camundongos, é capaz de utilizar os transportadores de dopamina para alcançar o espaço intracelular. Por não ultrapassar a barreira hemato-encefálica, a administração deve ser realizada através de estereotaxia, realizada unilateralmente para que o hemisfério contralateral possa ser utilizado como controle (Dauer e Przedborski, 2003). Além disso, a lesão unilateral permite a observação de comportamento rotacional após a administração de apomorfina, um agonista de receptores dopaminérgicos, utilizado para verificar a existência da lesão da via nigroestriatal *in vivo* (Dankova et al., 1978).

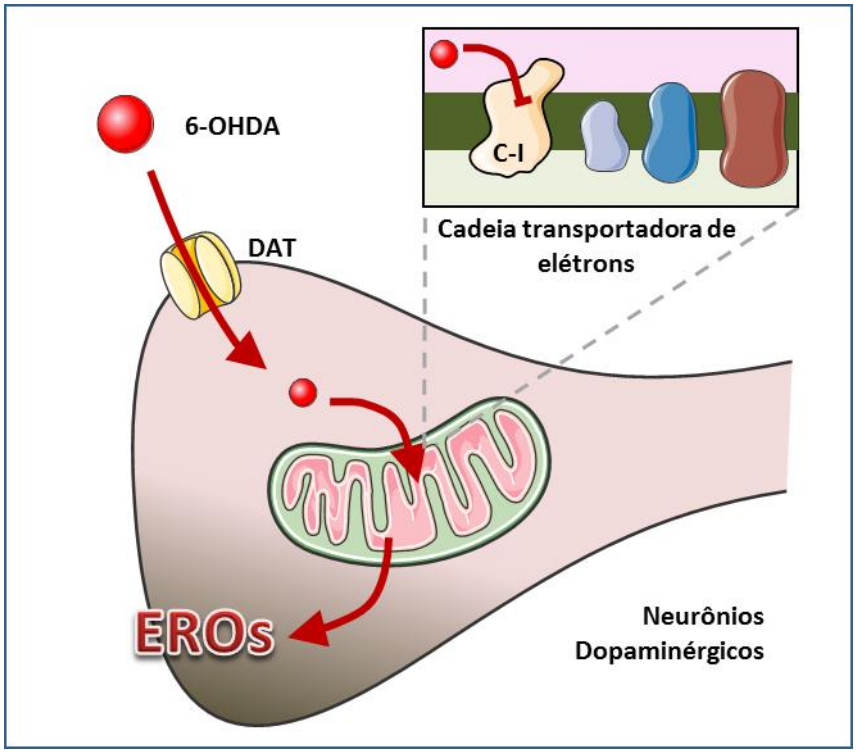


Figura 1.: Mecanismo de ação do composto 6-hidroxidopamina. A 6-OHDA é captada por transportadores de dopamina (DAT) dos neurônios dopaminérgicos. Na mitocôndria, inibe o complexo I (C-I) da cadeia transportadora de elétrons, resultando na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e morte neuronal.

Dentro dos neurônios dopaminérgicos (figura 1), a 6-OHDA se acumula e altera a homeostase celular, resultando em disfunção mitocondrial, produção de espécies reativas de oxigênio e por fim em morte neuronal (Simola et al., 2007). Outras neurotoxinas como o 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina (MPTP), o paraquat e a rotenona também são utilizadas para a indução de hemiparkinsonismo através da produção de espécies reativas de oxigênio em neurônios catecolaminérgicos. O MPTP, entretanto, é altamente tóxico e pode levar à morte dos animais. Além do uso de neurotoxinas, a injeção de oligômeros de α-sinucleína no ventrículo lateral produz outro modelo animal de Doença de Parkinson que mimetiza sintomas motores e não motores, inclusive com deficiência dopaminérgica no bulbo olfatório, consequente disfunção olfatória e degeneração de neurônios dopaminérgicos da via nigroestriatal a longo prazo (Fortuna et al., 2017).

O estabelecimento de uma relação entre alguns genes e o desenvolvimento da Doença de Parkinson estimulou a exploração de modelos murinos geneticamente modificados, sobretudo envolvendo a expressão de α-sinucleína. Camundongos expressando α-sinucleína humana apresentam agregados proteicos e morte de neurônios dopaminérgicos (Masliah et al., 2000), enquanto que a deleção do gene de α-sinucleína confere certa resistência a neurotoxicidade induzida por 6-OHDA (Alvarez-Fischer et al., 2008). Além disso, a transfecção através de vetores virais adeno-associados também permite a inserção de mutações de α-sinucleína no tronco encefálico com aparecimento de agregados proteicos (Dauer e Przedborski, 2003). Dentre os modelos genéticos, a indução de expressão de mutações em genes LRRK2 em camundongos gerou animais com a fisiopatologia de Doença de Parkinson mais acentuada, embora o perfil comportamental de acinesia seja mais

adequado para o estudo dos efeito do tratamento a longo prazo com L-Dopa em relação ao estudo de terapias alternativas (Li et al., 2009).

1.2 Sistema Purinérgico

Na década de 70, Burnstock sugeriu que o ATP, molécula endógena responsável pela distribuição energética celular, atuaria no sistema nervoso também como neurotransmissor em sinapses (Burnstock, 1972). Este mesmo autor persistiu na elucidação da importância da molécula e descreveu em trabalhos subsequentes um sistema de receptores para ATP e outras moléculas adenosinérgicas resultantes da metabolização do ATP. Esse sistema consiste em duas grandes famílias de receptores: P1, receptores adenosinérgicos ligantes de adenosina; e P2, os chamados receptores purinérgicos ligantes de ATP, ADP, UTP, UDP e UDP-glicose. A família de receptores P2, estudada neste trabalho, é subdividida em receptores ionotrópicos denominados P2X e em receptores metabotrópicos P2Y (Burnstock e Kennedy, 1985).

Os receptores ionotrópicos formam canais de íons constituídos por três subunidades, cada uma com uma alça extracelular contendo o sítio ligante de ATP e outros que possivelmente estejam envolvidos na modulação do receptor por cátions, dois domínios transmembranares e extremidades C e N terminais intracelulares com sítios ligantes de proteínas cinases (figura 2). Essa subfamília de receptores possui sete isoformas conhecidas (P2X 1-7), cada uma com peculiaridades em relação à ativação, inativação e propriedades farmacológicas. Além disso, os canais podem ser formados por 3 subunidades da mesma isoforma (homogêneos) ou de isoformas distintas (heterogêneos) (Burnstock, 2007b).

Os receptores metabotrópicos P2Y são acoplados à proteína G, com a extremidade N terminal extracelular, sete domínios transmembranares e a extremidade C terminal intracelular contendo motivos de ligação de cinases. As isoformas dos receptores metabotrópicos P2Y 1, 2, 4, 6, 11, 12, 13 e 14 são encontradas em mamíferos e possuem pouca similaridade em sua sequência de resíduos de aminoácidos, o que leva a uma grande variedade de efeitos farmacológicos e operacionais. A ativação pode desencadear diferentes sinalizações intracelulares de modulação de cálcio intracelular e alteração dos níveis de AMPc de acordo com o tipo de proteína G no qual está associado. A associação dos receptores P2Y1, 2, 4, 6 e 11 com proteínas Gq induz ativação de fosfolipase A2, C e D (figura 2) e liberação de cálcio do retículo endoplasmático, enquanto a associação dos receptores P2Y12, 13 e 14 com proteínas Gi/o modulam a cncentração de cálcio intracelular por inibição de adenilil ciclase (Erb e Weisman, 2012). Além disso, há poucas evidências de que as isoformas 5, 9 e 10 sejam receptores de nucleotídeos e desencadeiem a ativação de cascatas de sinalização intracelular (Burnstock, 2007b).

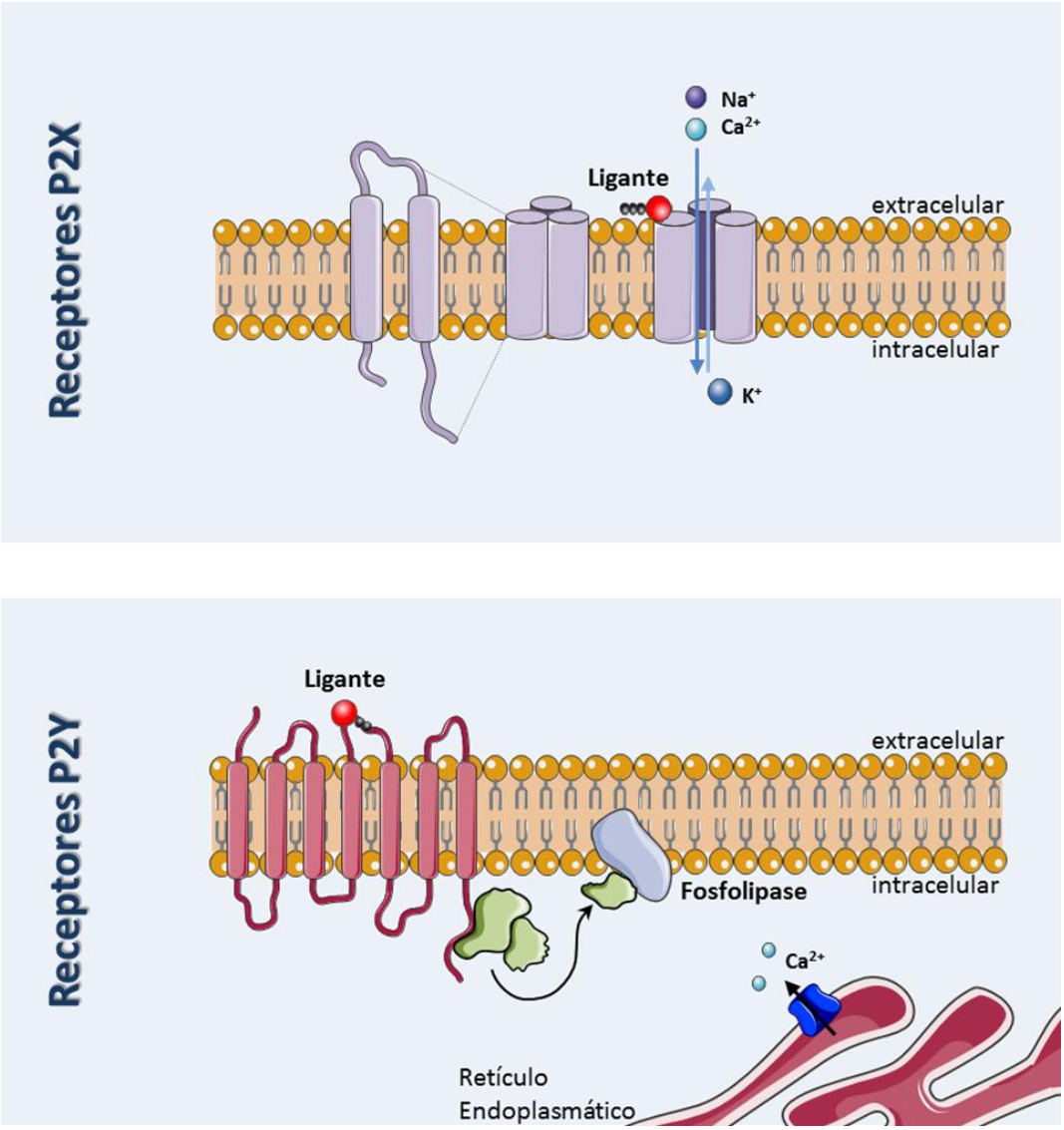


Figura 2.: Subfamílias de receptores purinérgicos P2. Receptores do subtipo P2X são receptores ionotrópicos com um domínio extracelular ligante de ATP, 2 domínios transmenbranares e 1 domínio intracelular. Se organizam em 3 subunidades iguais ou de subtipos diferentes formando canal iônico cuja ligação de ATP induz abertura. Receptores P2Y são metabotrópicos acoplados a proteína G e, sua ativação pode estimular, dentre outras vias, fosfolipases de membrana que liberam cálcio do retículo endoplasmático.

A ativação dos diferentes receptores purinérgicos pode ser modulada pela ação das enzimas ectonucleotidases. As fosfatases alcalinas, E-NTDPases (ectonucleosídeo trifosfato-difosfohidrolases) e E-NPP (ectonucleosídeo pirofosfatase/fosfodiesterases) promovem a hidrólise de nucleosídeos 5’ di- e trifosfatados (ADP, ATP e UTP), enquanto ecto-5’nucleotidases (ecto 5’-NT/CD73) e

fosfatases alcalinas hidrolizam nucleosídeos 5’ monofosfatados (AMP) a adenosina. Esta por sua vez é metabolizada por desaminação pela adenosina deaminase, gerando inosina, ou refosforilada a AMP pela adenosina. Cada metabólito é capaz de ativar diferentes receptores purinérgicos, sendo a modulação enzimática um fator essencial na modulação purinérgica (Burnstock, 2007b; Zimmermann, 2006).

1.2.2 Sistema Purinérgico no Sistema Nervoso embrionário e adulto

Muitos estudos evidenciam a participação dos receptores purinérgicos durante o desenvolvimento embrionário. Estudos com embriões de galinha mostraram que os receptores purinérgicos são uns dos primeiros receptores funcionais durante a fase de gastrulação (Laasberg, 1990). Além disso, durante todo o desenvolvimento embrionário do encéfalo de ratos é possível observar a expressão das diversas isoformas de receptores P2X e seus efeitos inibitórios sobre o crescimento axonial dos neurônios motores, principalmente da isoforma P2X3 (Cheung et al., 2005).

Apesar de induzir efeito neurogênico, proliferativo e de diferenciação, a ativação dos receptores P2X7 por altas concentrações de ATP pode induzir a formação de grandes poros na membrana que aumenta sua permeabilidade e sinaliza apoptose celular. Em situações patológicas, onde há liberação intensa de ATP por células em processo de morte, esses receptores são externalizados e agravam o processo apoptótico (Burnstock, 2007b). Além disso, o receptor P2X7 modula a apoptose durante a embriogênese e participa da comunicação entre glia e neurônio durante a diferenciação neural (Hogg et al., 2004). A neurogênese pós-natal também envolve essa subfamília de receptores, uma vez que os subtipos

P2X4-6 são expressos durante esse processo (Cheung et al., 2005; da Silva et al., 2007).

A distribuição dos receptores purinérgicos nas células neurais das diversas regiões do sistema nervoso é muito heterogênea. Nas regiões do estriado e substância negra do encéfalo adulto, principais áreas envolvidas na Doença de Parkinson, as isoformas mais expressas são P2X 1-6, P2Y1 e P2Y13. Além desses locais, podemos encontrar receptores P2X 1-6 no córtex, núcleo hipotalâmico ventromedial, núcleos supraoptico, paraventricular e do trato solitário, medula ventrolateral e complexo dorsal do vago. Receptores P2Y1 podem ser encontrados no *nucleus accumbens,* hipocampo, cerebelo e córtex e a isoforma P2Y13 no tálamo, núcleo caudado, hipocampo, cerebelo, córtex e medula ventrolateral. Entretanto, o subtipo P2Y12 é expresso principalmente por células da glia (Burnstock, 2007a; Burnstock e Knight, 2004).

Os receptores P2Y atuam favorecendo a proliferação de células indiferenciadas da zona subventricular do hipocampo, e seu bloqueio induz a diferenciação dessas células em neurônios e células da glia *in vitro* (Lin et al., 2007). Em células de carcinoma embrionárias, a ativação de diferentes isoformas P2X não só induzem a proliferação, mas também a diferenciação em neurônios. Nessas mesmas células, os receptores purinérgicos parecem favorecer a diferenciação em neurônios glutamatérgicos e colinérgicos (Resende et al., 2007).

1.2.3 Receptores P2 na doença de Parkinson

Estudos recentes têm demonstrado que a inibição de receptores da família P1 do tipo A_{2A} possui efeito benéfico em modelos animais de Doença de Parkinson, porém o envolvimento dos receptores P2 ainda é um campo a ser explorado

(Gyoneva et al., 2014; Xiao et al., 2011). Em estudos com modelos animais e celulares, compostos que induzem a morte de neurônios dopaminérgicos resultam em uma liberação aumentada de ATP e outros nucleotídeos, que culmina na ativação de receptores purinérgicos nas células vizinhas, expandindo a lesão e piorando o estado patológico.

Embora a análise imunohistoquímica para receptores P2X7 não tenha demonstrado diferença de expressão no estriado e substância negra de animais lesionados com 6-OHDA em relação a animais controle (Amadio et al., 2007), a modulação farmacológica desse receptor tem demonstrado prevenir e reverter o comportamento hemiparkinsoniano nesses modelos in vivo e in vitro. A injeção intraestriatal aguda de A-438059 (antagonista do receptor P2X7, 1 hora antes e 1 hora depois da injeção de 6-OHDA) preveniu o déficit dopaminérgico estriatal quando comparado com o hemisfério controle (Marcellino et al., 2010). O composto Brilliant Blue G (BBG, antagonista de receptores P2X7 que ultrapassa a barreira hematoencefálica e pode ser administrado sistemicamente) também se mostrou eficaz. Numa dose de 45 mg/kg administrada diariamente por 14 dias (primeira dose 2 horas antes da lesão), preveniu o comportamento rotacional, prejuízo de memória a curto prazo e o déficit dopaminérgico no estriado e substância negra (Carmo et al., 2014).

Enquanto esses estudos trazem resultados que demonstram o efeito preventivo do BBG – uma vez que a lesão dopaminérgica não foi estabelecida antes do início do tratamento - resultados anteriores de nosso laboratório demonstraram que a administração diária de BBG (50 mg/kg, intraperitoneal) durante 7 dias, uma semana após a indução da morte celular, é capaz de reverter a lesão restaurando as fibras dopaminérgicas do estriado e número de corpos celulares da substância

negra, inibindo o comportamento rotacional induzido por apomorfina. Nesse trabalho, o tratamento com BBG foi iniciado uma semana após a injeção de 6-OHDA, período de tempo suficiente para a lesão se estabelecer e provando o efeito de reversão da droga (Ferrazoli et al., 2017).

A agregação proteica observada na Doença de Parkinson também parece estar relacionada com o sistema purinérgico. O antagonismo ou deleção do receptor P2X1, por exemplo, reduz a agregação de α-sinucleína induzida pela liberação de ATP por células apoptóticas *in vitro* (Gan et al., 2015). Embora o bloqueio do receptor P2X7 não ter sido capaz de reduzir a agregação de α-sinucleína nesse estudo, a liberação de ATP induzida por α-sinucleína *in vitro* ativa P2X7 e mobiliza cálcio intracelular (Wilkaniec et al., 2017). Além disso, células microgliais submetidas a α-sinucleína apresentam aumento na produção de espécies reativas de oxigênio através da ativação do receptor P2X7, cujo antagonismo é capaz de prevenir (Jiang et al., 2015). Adicionalmente, a ativação do receptor P2X1 parece contribuir para a agregação de α-sinucleína, que por sua vez modula a atividade de receptores P2X7, produção de espécies reativas de oxigênio e liberação de ATP (Gan et al., 2015).

Poucos estudos ligam diretamente os receptores purinérgicos com predisposição genética para a Doença de Parkinson. Porém, o polimorfismo do receptor P2X7 1513A>C, que facilita a formação de poros pela ativação deste receptor e induz morte celular (Gu et al., 2001), parece ser um fator de risco para desenvolvimento de Doença de Parkinson esporádica numa população Han chinesa (Liu et al., 2013).

Um estudo recente mostrou que a expressão gênica do receptor P2Y6 está aumentada em células de neuroblastoma humano SH-SY5Y quando submetidas a um insulto com a neurotoxina 1-metil-4-fenilpiridinium (MPP^+) (Qian et al., 2017). Além, disso, o antagonismo ou deleção da expressão desse receptor diminuiu a morte celular provocada pelo MPP^+ pela diminuição da produção de espécies reativas de oxigênio (Qian et al., 2017). No processo de morte celular *in vivo*, a liberação de UDP pelas células apoptóticas e consequente ativação de P2Y6 induz a produção das citocinas CCL2 e CCL3 em células da microglia e sua ativação fagocítica, indicando que esse subtipo de receptor pode estar envolvido na resposta inflamatória de doenças neurodegenerativas (Kim et al., 2011). Recentemente, foi descoberto que células mononucleares de sangue periférico de pacientes com Doença de Parkinson com menos de 80 anos apresentam um elevado nível do receptor P2Y6, e o uso de modelo *in vitro* de resposta microglial corroborou a hipótese do envolvimento da microglia no efeito neuroinflamatório (Yang et al., 2017).

Assim, a modulação dos receptores purinérgicos P2Y6 e consequente resposta pró-/anti-inflamatória parece ser uma terapia promissora para a Doença de Parkinson. Além do P2Y6, a modulação inflamatória do receptor P2X7 também se mostra promissora. De fato, Choi e colaboradores (Choi et al., 2009) mostraram por *single cell* RT-PCR que neurônios dopaminérgicos não expressam o receptor P2X7, o que levanta a hipótese de modulação glial no efeito protetor do BBG. Corroborando essa hipótese, foi observada a co-localização de células gliais com o receptor P2X7 em análise imunohistoquímica (Marcellino et al, 2010).

2. Justificativa

A Doença de Parkinson é uma doença altamente incapacitante, que afeta a qualidade de vida não somente dos indivíduos acometidos como também de seus próximos, o que a torna um interessante alvo de pesquisa. Um dos principais tópicos de pesquisa de nosso laboratório são os receptores purinérgicos e seu envolvimento em processos de diferenciação celular e patofisiologia de diferentes doenças. Recentemente, demonstramos o potencial neurorregenerativo do receptor P2X7 em modelo animal de Doença de Parkinson. Levando em consideração a extensa participação desses receptores no desenvolvimento do sistema nervoso embrionário, bem como em processos neuroinflamatórios e neurodegenerativos, este trabalho realizou um screening de receptores do tipo P2 em modelo animal de Doença de Parkinson, e analisou o efeito neuroprotetor, neurorregenerativo e imunomodulatório do antagonismo de receptores de interesse.

3. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Analisar o envolvimento de receptores purinérgicos no modelo animal de Doença de Parkinson induzido pela administração de 6-OHDA em ratos e o efeito da modulação desses receptores na reversão da lesão.

2.2 Ojetivos específicos

- Caracterizar a lesão induzida por 6-OHDA em ratos e sua progressão ao longo de 5 semanas quanto ao déficit dopaminérgico nas regiões do estriado e substância negra e efeito comportamental;
- Avaliar a expressão dos receptores purinérgicos do subtipo P2 no estriado durante a progressão da lesão e selecionar receptores de interesse para modulação;
- Analisar o efeito do tratamento com moduladores de receptores P2 na reversão do déficit dopaminérgico e do comportamento hemiparkinsoniano dos animais lesionados com 6-OHDA;
- Verificar o efeito do tratamento com moduladores de receptores P2 no estado de ativação de células microgliais do estriado e substância negra dos animais lesionados com 6-OHDA;
- Verificar o possível efeito do tratamento com com moduladores de receptores P2 em neurônios não-dopaminérgicos da região do estriado e substância negra de animais lesionados com 6-OHDA;

- Analisar o efeito de moduladores de receptores P2 em células SH-SY5Y diferenciadas em neurônios dopaminérgicos e induzidas a morte por 6-OHDA;
- Avaliar o efeito da terapia combinada de transplante de células precursoras neurais e moduladores de receptores P2 em animais submetidos a lesão por 6-OHDA.

4. Materiais e Métodos

Durante este trabalho, utilizamos diferentes protocolos de acordo com a pergunta a ser respondida. A figura 3 esquematiza todos os protocolos utilizados, que serão referenciados ao longo da descrição dos materiais e métodos.

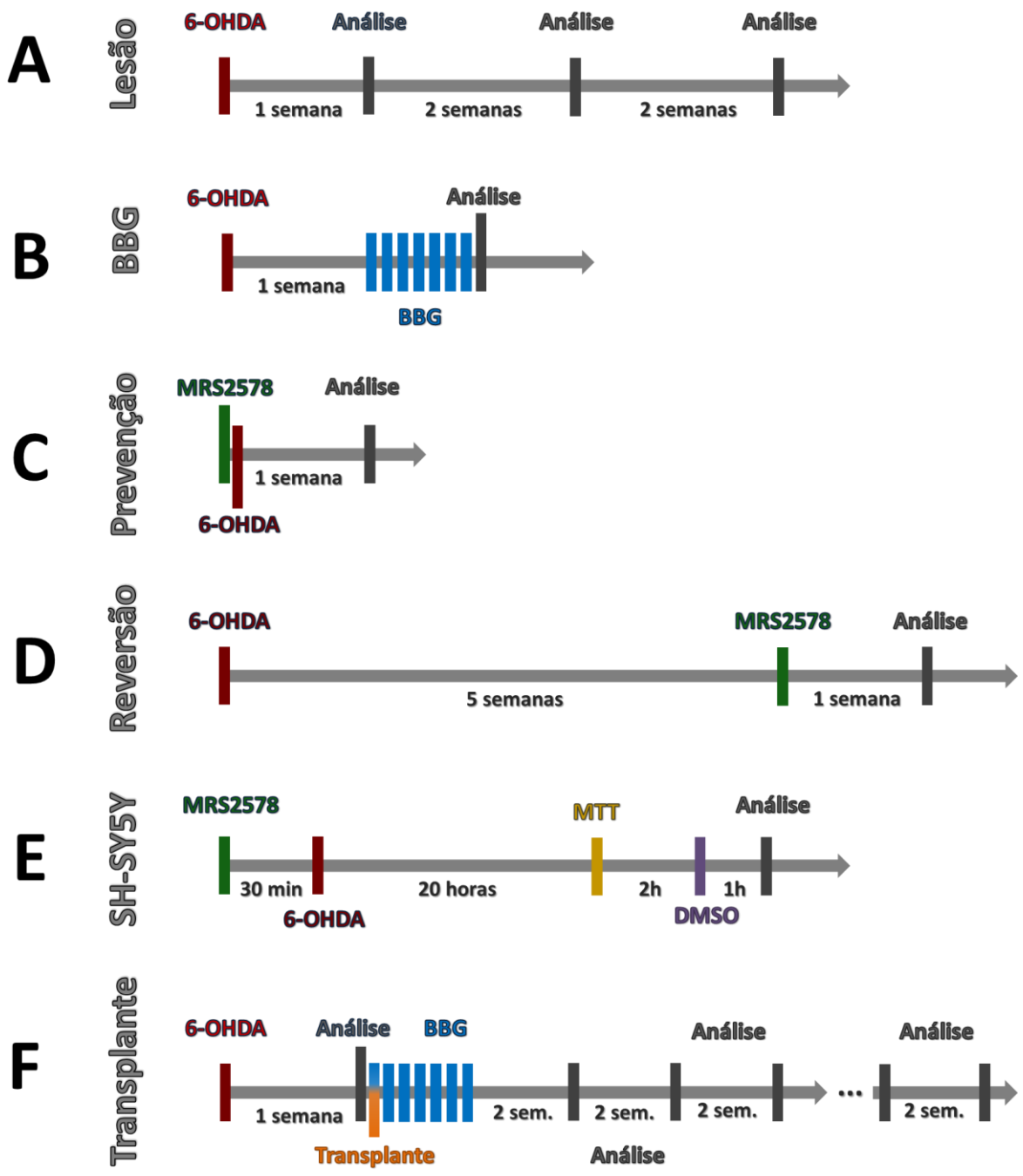


Figura 3.: Protocolos seguidos na realização desse trabalho. Protocolos referentes a (A) estudo da lesão durante 5 semanas, (B) estudo do efeito do tratamento com Brilliant Blue G (BBG) em animais lesionados com 6-OHDA, estudo do efeito (C) preventivo ou (D) reversivo da lesão dopaminpergica com o antagonista do receptor P2Y6, MRS2578, (E) ensaio in vitro do efeito preventivo do MRS2578 de neuroproteção em neurônios dopaminérgicos, (F) terapia combinada de transplante de células progenitoras neurais e tratamento com BBG. As análises se referem a análises bioquímicas e/ou comportamentais, de acordo com o estudo em questão.

3.1 Animais

Ratos Sprague-Dawley machos com 60 dias de vida no início do tratamento foram fornecidos e alojados pelo biotério do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ-USP), com acesso irrestrito a água e comida e ciclo claro/escuro de 12:12 horas. Todos os procedimentos foram aprovados anteriormente pelo Comitê de Ética do IQ-USP (Certificados 15/2013, 57/2017) e conduzidos em concordância com os Princípios Éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e com o "*NIH Guide for Care and Use of Laboratory Animals*".

3.1.1 Modelo animal de Doença de Parkinson

A lesão unilateral da via nigroestriatal foi estabelecida de acordo com Ferrazoli e colaboradores (2017). Em resumo, animais foram anestesiados com uma solução 50%-50% xilazina-quetamina (33mg/kg, intraperitonial; Ceva), e acomodados no aparelho estereotáxico (KOPF). Uma incisão pontual foi realizada no crânio utilizando um drill para a administração de 2µl de 6-OHDA (Sigma-Aldrich), preparada no momento do uso na concentração de 7µg/µl dissolvida em 0,9% solução salina de água deionizada com 0,9% NaCl e 0,02% ácido ascórbico (Sigma-Aldrich) para evitar oxidação. Como ilustrado na figura 4, a injeção foi realizada no feixe prosencefálico medial do hemisfério direito dos animais (Deumens et al., 2002),

seguindo as coordenadas estereotáxicas a partir do bregma: AP -4.4; ML -1.2; DV -8.2 (Paxinos e Watson, 2013).

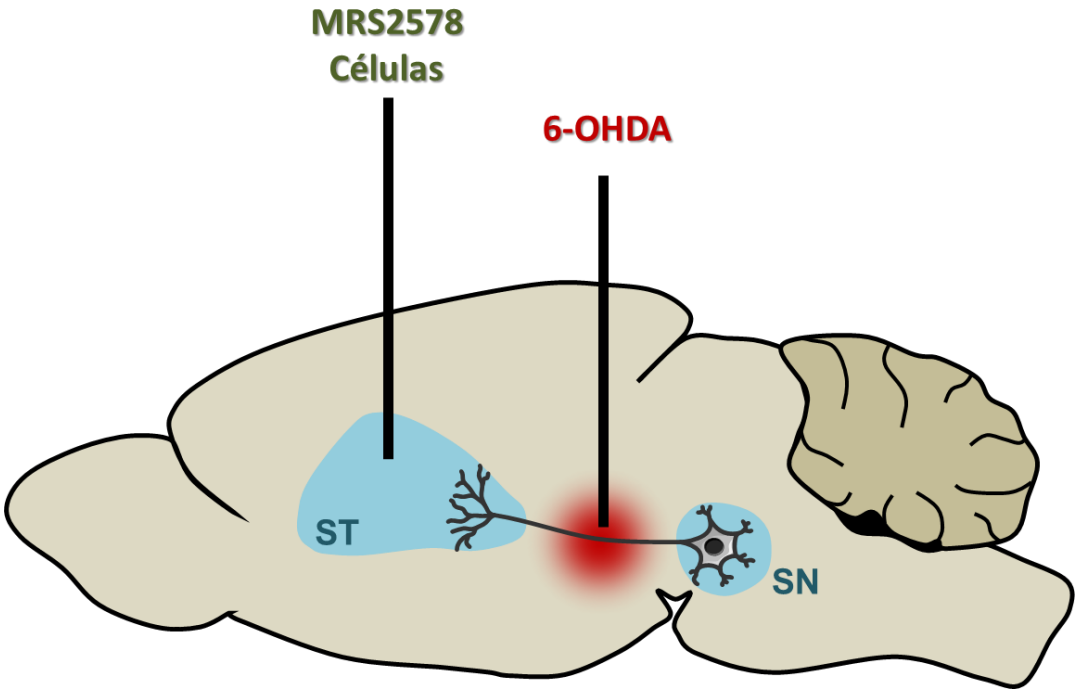


Figura 4.: Ilustração representativa das injeções intracranianas. A injeção de 6-OHDA foi realizada no feixe prosencefálico medial (AP -4.4; ML -1.2; DV -8.2 em mm, em relação ao bregma), induzindo a morte dos neurônios dopaminérgicos originados na região da substância negra (SN) e suas ramificações para o estriado (ST), que compoem a via nigroestriatal. O inibidor do receptor P2Y6 (MRS2578) foi injetado em um ponto do estriado (AP: -0,4; ML: -3,3; DV: -5,2 em mm, em relação ao bregma) e as células em 5 pontos do estriado (AP -0,4; ML -3,3; DV -6,5; -6,0; -5,5; -5,0; -4,5 em mm, em relação ao bregma).

3.1.2 Teste rotacional induzido por apomorfina

Para confirmar a indução do modelo com 6-OHDA, os animais foram submetidos ao teste rotacional 7 dias após a lesão da via nigroestriatal. Para tanto, animais foram injetados intraperitonealmente com o agonista dopaminérgico hidrocloreto de apomorfina (Sigma-Aldrich) na dose de 0,5 mg/kg (preparado em

0,9% salina com 0,02% ácido ascórbico). O número de rotações contralaterais a injeção de 6-OHDA foi contabilizado por 1 minuto. Animais que apresentaram comportamento rotacional, indicando o sucesso da lesão, foram utilizados nos procedimentos seguintes. Esse teste foi utilizado para verificar não somente o sucesso da cirurgia mas também para analisar o efeito tipo antiparkinsoniano dos tratamentos testados. Além disso, para investigar a progressão da lesão, animais foram submetidos ao teste rotacional 1, 3 e 5 semanas após a injeção de 6-OHDA.

3.1.3 Administração de Brilliant Blue G (BBG)

Uma semana após a injeção de 6-OHDA, os animais foram submetidos ao tratamento com BBG (figura 3, B). Diariamente, BBG (Sigma-Aldrich; 5 a 75 mg/kg em 0,9% salina com 0,02% ácido ascórbico) ou salina (grupo controle) foram administrados intraperitonealmente durante 7 dias. No 8º dia, os animais foram decapitados ou perfundidos para análises bioquímicas. No estudo da terapia combinada com transplante celular, o tratamento foi iniciado no mesmo dia da cirurgia de transplante na dose de 50 mg/kg.

3.1.4 Administração de MRS2578

Dez minutos antes (figura 3, C) ou 5 semanas após (figura 3, D) a injeção de 6-OHDA os animais foram administrados com o antagonista do receptor P2Y6 MRS2578 (MRS, 2µg/kg, dissolvido em PBS com 1% DMSO e diluído em salina) no estriado. Uma incisão pontual foi realizada no crânio utilizando um drill seguindo as coordenadas estereotáxicas a partir do bregma: AP: -0,4; ML: -3,3; DV: -5,2 (Paxinos & Watson, 2013) e a solução foi injetada (figura 4). Uma semana após a injeção, os animais foram submetidos ao teste rotacional e decapitados ou perfundidos para análises bioquímicas.

3.1.5 Transplante celular

Para o transplante celular, os animais foram anestesiados com uma solução 50%-50% xilazina-quetamina (33mg/kg, intraperitonial), posicionados no estereotáxico e injetados com uma suspensão contendo $25x10^4$ células progenitoras neurais diferenciadas de células-tronco embrionárias E14Tg2a em 3 µL de meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) High (animais tratados) ou com somente DMEM (controle) através de 5 injeções de 0,5 µL cada, realizadas em 5 pontos do estriado (AP -0,4; ML -3,3; DV -6,5; -6,0; -5,5; -5,0; -4,5; em mm, em relação ao bregma, coordenadas AP e ML ilustradas na figura 4) (Paxinos e Watson, 2013; Rodríguez-Gómez et al., 2007). No mesmo dia,iniciamos o tratamento com BBG 50 mg/kg (figura 3, F).

3.2 Cultura celular

3.2.1 Cultivo e diferenciação de células SH-SY5Y

Células de neuroblastoma humano SH-SY5Y foram expandidas em meio DMEM/F-12 (Gibco, E.U.A.) suplementado com 10% soro fetal bovino (SFB), 100 U/mL penicilina (Sigma), 0,1 mg/mL de streptomicina (Sigma) e 0,01 µM de aminoácidos não essenciais (Gibco) em incubadora a 37°C em 5% CO^2. O meio foi trocado a cada 3 dias e as células repicadas quando alcancada 90% de confluência (aproximadamente $3x10^3$ a $1x10^5$ células). Para a diferenciação dopaminérgica, as células foram plaqueadas em placas de 24 poços numa densidade de $6x10^4$. Após 24 horas, a diferenciação foi induzida reduzindo a concentração de SFB para 1% e suplementando o meio com 10 µM ácido all trans-retinóico (Sigma). As células foram mantidas em cultura durante 7 dias em incubadora a 37°C em 5% CO^2 e o meio trocado a cada 2 dias.

3.2.2 Ensaio de viabilidade celular por redução de tetrazólio

Para verificar o efeito neuroprotetor do composto MRS2578, células SH-SY5Y diferenciadas em neurônios dopaminérgicos foram submetidas ao ensaio de viabilidade celular com redução de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium (MTT) a E,Z- 1-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-1,3-diphenylformazan (formazan), composto de coloração azulada (figura 3, E).

Para isso, os neurônios foram tratados com MRS2578 na concentração de 1, 10 e 100 µM durante 30 minutos. Após o tratamento, as células foram submetidas a morte por 6-OHDA 100 µM. Decorridas 22 horas, foi adicionado MTT 1mg/mL por 2 horas para redução do tetrazólio. Os cristais de formazan foram dissolvidos em DMSO e a absorbância a 600nm foi verificada em leitor FlexStation 3 Multi-Mode Microplate ReaderFast (Molecular Devices).

3.2.3 Cultivo e diferenciação de células E14Tg2a

Para o transplante celular, células-tronco embrionárias E14Tg2a originadas da massa interna de blastocisto de camundongo foram expandidas e mantidas em cultura com meio de indiferenciação a 37°C e 5% de CO_2. Quando apresentaram 80% de confluência, células foram dissociadas com tripsina e coletadas ou centrifugadas e ressuspendidas em meio de corpos embrióides (EB). As células foram mantidas em placas não-aderentes para a formação de EB. Após 2 dias, as células foram coletadas para transplante ou mantidas em cultura por mais 2 dias. Os EB foram semeados em placas de 6 poços tratadas previamente com laminina (1 µg/mL) em meio EB. Após 24 horas, o meio foi substituído por meio de células precursoras neurais e mantidas em cultura por mais 6 dias. As células foram dissociadas com acutase, parte foi utilizada para transplante e o restante plaqueado

em placas de 24 poços previamente tratadas com laminina (1 µg/mL), em meio de célula precursora dopaminérgica. Para verificar o potencial de diferenciação dopaminergica, após 6 dias o meio foi substituído por meio de neurônio dopaminérgico e as células foram mantidas por 10 dias para a diferenciação total em neurônio dopaminérgico. A composição dos meios está descrita na tabela 1.

Tabela 1.: Composição dos meios celulares utilizados

Meio	Componente	Quantia
Indiferenciação	DMEM - high glucose	q.s.
	ES Cell Qualified Fetal Bovine Serum (ES FBS)	15% V/V
	MEM Non-Essencial Aminoacids (NEAA)	1% V/V
	Piruvato de Sódio	2 mM
	L-Glutamina	2 mM
	LIF 10.000x	0,1% V/V
	2-mercaptoetanol	0,55 mM
Corpos Embrióides (EBs)	DMEM - high glucose	q.s.
	ES Cell Qualified Fetal Bovine Serum (ES FBS)	20% V/V
	MEM Non-Essencial Aminoacids (NEAA)	1% V/V
	Piruvato de Sódio	2 mM
	L-Glutamina	2 mM
	2-mercaptoetanol	0,55 mM
Células Precursoras Neurais (CPN)	DMEM F-12, sem HEPES	q.s.
	Insulina	5 µg/mL
	Apotransferrin	50 µg/mL
	Selenito de sódio	30 mM
	Fibronectina	5 µg/mL
	L-Glutamina	2 Mm
Células Precursoras Dopaminérgicas (CPD)	DMEM F-12, sem HEPES	q.s.
	Glicose	1,55 mg/mL
	Ácido Ascórbico	200 µM
	Insulina	25 µg/mL
	Apotransferrina	50 µg/mL
	Selenito de Sódio	30 Mm
	Progesterona	20 nM
	Putrescina	100 µM
	L-Glutamina	2 mM
	Fator de Crescimento do Fibroblasto básico (bFGF)	10 ng/mL
	Fator de Crescimento do Fibroblasto 8b (FGF-8b)	10 ng/mL
	Sonic Hedgehog N-Terminus (Shh-N)	10 ng/mL
Neurônios	DMEM F-12, sem HEPES	q.s.

Dopaminérgicos	Glicose	1,55 mg/mL
	Ácido Ascórbico	200 µM
	Insulina	25 µg/mL
	Apotransferrina	50 µg/mL
	Selenito de Sódio	30 mM
	Progesterona	20 nM
	Putrescina	100 µM
	L-Glutamina	2 mM

Protocolo publicado em Glaser et al., 2017. Dopaminergic and GABAergic Neuron in vitro Differentiation from Embryonic Stem Cells

3.3 Análises Bioquímicas

3.3.1 Ensaio de Imunohistoquímica

Para a análise imunohistoquímica, os animais foram anestesiados profundamente com solução quetamina/xilazina e perfundidos com aproximadamente 400 mL de solução tampão fospato salino (PBS) utilizando uma bomba peristáltica (World Precision Instruments, E.U.A.). Subsequentemente, 200 mL de solução paraformaldeído 4% em PBS (PFA, Sigma) a 4°C foi perfundida para fixação do tecido. Os cérebros foram removidos e incubados em solução 30% sacarose em PBS por 72 horas a 4°C para desidratação. Os cérebros foram colocados em meio Tissue Tek® para secção coronal em criostato (HM 500 OM, MICROM International GmbH, Germany) para obter secções sequenciais de 30µm. As fatias foram tratadas com 0,3% H_2O_2 (Synth) para eliminar atividade da peroxidase endógena, incubadas por 30 min em solução de bloqueio (5% leite em pó desnatado e 5% albumina bovina, Sigma-Aldrich) e incubadas *overnight* com anticorpo primário anti-tirosina hidroxilase (TH) (Sigma, 1:500), Iba-1 (Wako, 1:500) ou NeuN (Chemicon, 1:1000). Posteriormente, as fatias foram lavadas com PBS e incubadas com anticorpo secundário conjugado a biotina (Jackson Laboratories,

1:200). A reação foi realizada utilizando 3,3'-Diaminobenzidina e kit VECTASTAIN® Elite ABC HRP (VectorLabs).

As imagens foram obtidas utilizando microscópio automatizado TissueFAXS (TissueGnostics, Austria). A densidade óptica das microfotografias da marcação com TH foi analisada para determinar a densidade de fibras TH+ no estriado utilizando escala de cinza no ImageJ software (US National Institute of Health) e a média de 3 fatias consecutivas foi utilizada para a análise de cada animal. Na substância negra, o número de células positivas para TH foi contabilizado utilizando o software Image J. A média de 3 fatias consecutivas dos hemisférios controle e lesionado de cada animal foi utilizada.

3.3.2 Ensaio de Imunofluorescência

Imunofluorescência foi utilizada para caracterização da diferenciação celular. As células foram fixadas com 4% PFA por 15 minutos, lavadas com PBS e incubadas por 30 min em solução de bloqueio contendo 0,05% Triton-X 100 e 2% albumina bovina. Posteriormente, as culturas foram incubadas com anticorpos primários anti-nestina (1:1000 Millipore), TUJ1 (1:500, Millipore) e anti-tirosina hidroxilase (TH, 1:1000) *overnight* a 4°C. Após lavagem com PBS, as culturas foram incubadas com anticorpo secundário Alexa Fluor 488, 555 ou 647 (1:1000, Sigma). A marcação do núcleo celular foi obtida com 0,1% de 49,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). As lâminas foram montadas com Vectashield (Vector Laboratories) e fotografadas em microscópio automatizado de fluorescência TissueFAXS (TissueGnostics).

3.3.3 *Polymerase chain reaction* quantitativo em tempo real

RNA total foi extraído dos estriados e das células indiferenciadas e diferenciadas em neurônios dopaminérgicos utilizando TRIzol Reagent (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Todas as amostras foram tratadas com *amplification grade DNase I* (Sigma-Aldrich) para eliminar possível contaminação com DNA genômico. Transcrição reversa para síntese de cDNA foi realizada em um termociclador (Veriti, Applied Biosystems) utilizando enzima RevertAid Reverse Transcriptase (Thermo Scientific Fermentas) de acordo com protocolo do fabricante (Invitrogen). *Polymerase chain reaction* (PCR) quantitativo em tempo real foi realizado em 15 µl de solução tampão de reação contendo 22,5 ng de cDNA, SYBR Green Master Mix (Life Technologies), e 5 pmol de cada primer específico (Tabela 2). Os ciclos termais consistem em denaturação por 10 min a 95°C seguido por 40 ciclos de 15s a 95°C, e hibridização/extensão por 1 min a 60°C, seguido de análise da curva de *melting.* O método de comparação $2^{-\Delta\Delta CT}$ foi empregado para quantificação relativa de expressão genica como descrito anteriormente (Schmittgen and Livak, 2008). Após validação nas amostras, o gene padrão *RPL0* foi escolhido para normalização da expressão gênica. Todos os primers utilizados apresentaram eficiência de amplificação de 90-100%.

Tabela 2.: Sequência de primers utilizados na técnica de qRT-PCR para ratos.

Receptor	Sequência Forward	Sequência Reverse
P2X1	CAGTTCCACGGACTGTAT	TGAATCCCAAACACCGTGAA
P2X2	TGCCTCCTCAGGCTACAACT	AGTGGTGGTAGTGCCGTTT
P2X3	CTGCCTAACCTCACCGACAAG	AATACCCAGAACGCCACCC
P2X4	CTCATCCGCAGCCGTAAAGT	TTTTCCCACACGAACACCCA
P2X5	GGATGCCAATGTTGAGGTTG	TCCTGACGAACCCTCTCCAG
P2X6	CCCAGAGCATCCTTCTGTTCC	GGCACCAGCTCCAGATCTCA

P2X7	GGGAGGTGGTTCAGTGGGTAA	GGATGCTGTGATCCCAACAAA
P2Y1	GTCAGTGTGCTGGTATGGCT	TTTTCCGAATCCCAGTGCCA
P2Y2	TCAAACCGGCTTATGGGACC	TGGAAAGGCAGGAAGCAGAG
P2Y4	CGGCGACTGTATCGACCTTT	ATTGTGCGGGTGATGTGGAA
P2Y6	CAGGATGTCTGCTGGAACCT	CCCTCTCAGCCTCAAGCTAC
P2Y12	AACGCCTGCCTTGATCCATT	TACATTGGGGTCTCCTCGCT
P2Y13	CCGTGAAGAAATGTGCGTCC	TGAACTGGCATGTGTGACTGA
P2Y14	GGTGGGTTTCGCCTCATGT	CCTCAGGTGACCGGCATCT

3.4 Análise estatística

A análise estatística foi realizada com o software Statistica (version 7.0, StatSoft). Os dados do teste comportamental, imunohistoquímica e RT-qPCR foram analisados por análise de variância (ANOVA) de duas vias seguido por teste *post hoc* de Tukey (testes comportamentais) ou Bonferroni (análises bioquímicas). Valores de (p) abaixo de 0,05 foram considerados significativos. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão (EPM).

5. Resultados

4.1 Curva tempo-resposta da lesão com 6-OHDA

4.1.1 Caracterização da lesão

Muitos trabalhos da literatura utilizam como modelo de Doença de Parkinson a lesão da via nigroestriatal dopaminérgica pela injeção unilateral de 6-OHDA, porém o local ideal da injeção, a dose recomendada da droga e a extensão da lesão dos neurônios varia entre os protocolos (Deumens et al., 2002). Além disso, não há descrito na literatura o acompanhamento do efeito da lesão com 6-OHDA a longo prazo. Assim, caracterizamos a lesão induzida pelas coordenadas estereotáxicas e dose escolhidas durante 5 semanas.

Utilizamos como teste comportamental o teste rotacional induzido pela injeção de apomorfina, onde animais em que a lesão unilateral foi obtida com sucesso rotacionam para o lado contralateral ao hemisfério lesionado. Como esperado, antes da lesão da via nigroestriatal com 6-OHDA, os animais não apresentaram comportamento rotacional. Uma (10,00 +- 0,58), três (15,83 +- 2,02) ou cinco (16,00 +- 1,79) semanas após a lesão com 6-OHDA, o número de rotações significativamente aumentou, sendo que após cinco semanas o aumento no número de rotações foi estatisticamente significativo em comparação ao grupo de somente uma semana (Figura 5).

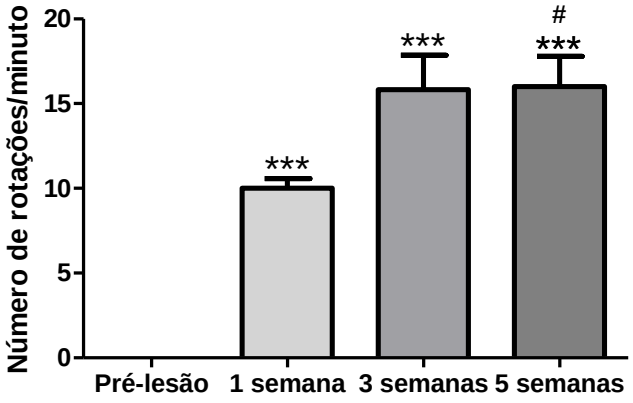


Figura 5. Comportamento rotacional de animais lesionados com 6-OHDA. Animais foram submetidos ao teste rotacional induzido por apomorfina uma semana antes e uma, três e cinco semanas após a lesão com 6-OHDA. ***p<0,001 em relação ao número de rotações pré-lesão; #p<0,05 em comparação ao grupo 1 semana pós lesão, n=6-8. Análise de variância ANOVA de uma via seguida pelo posthoc de Tukey.

Para confirmar os resultados comportamentais observados, a análise imunohistoquímica revelou uma diminuição significativa na densidade óptica da marcação para tirosina hidroxilase do estriado após uma (2,99 +- 2,25) ou cinco semanas (7,91 +- 4,28) em relação ao respectivo hemisfério controle (100,00 +- 9,85; 100,94 +- 5,67) (Figura 6, A).

Na substância negra, o número de neurônios positivos para tirosina hidroxilase está diminuído no hemisfério lesionado dos animais de uma (40,33 +- 5,04) e cinco (10,50 +- 1,50) semanas após a lesão em comparação com os respectivos hemisférios controle (163,33 +- 14,19; 107,50 +- 7,50) (Figura 6, B).

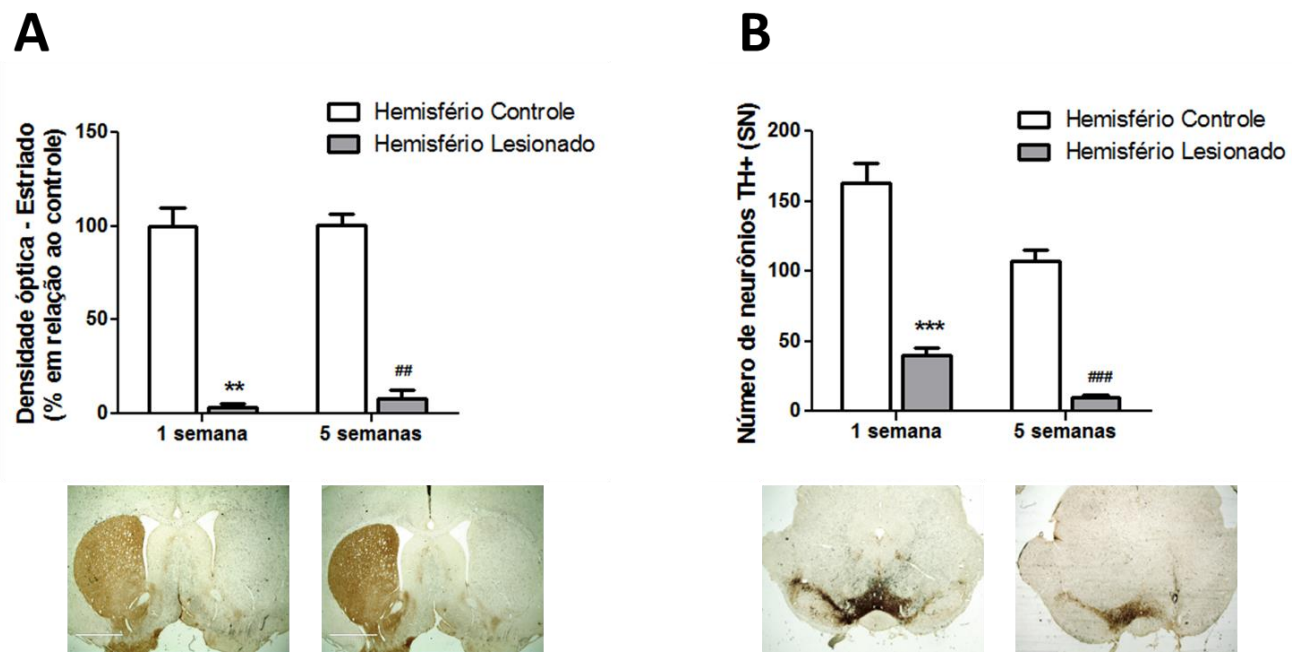


Figura 6. Análise imunohistoquímica da progressão da lesão com 6-OHDA no estriado e substância negra. (A) Densidade optica da imunomarcação para TH no estriado de animais 1 e 5 semanas pós lesão. (B) Número de neurônios TH+ na sbstância negra de animais 1 e 5 semanas pós lesão. ##,**p<0,01; ###,***p<0,001, em relação ao respectivo hemisfério controle. ANOVA de duas vias, seguida pelo posthoc de Bonferroni.

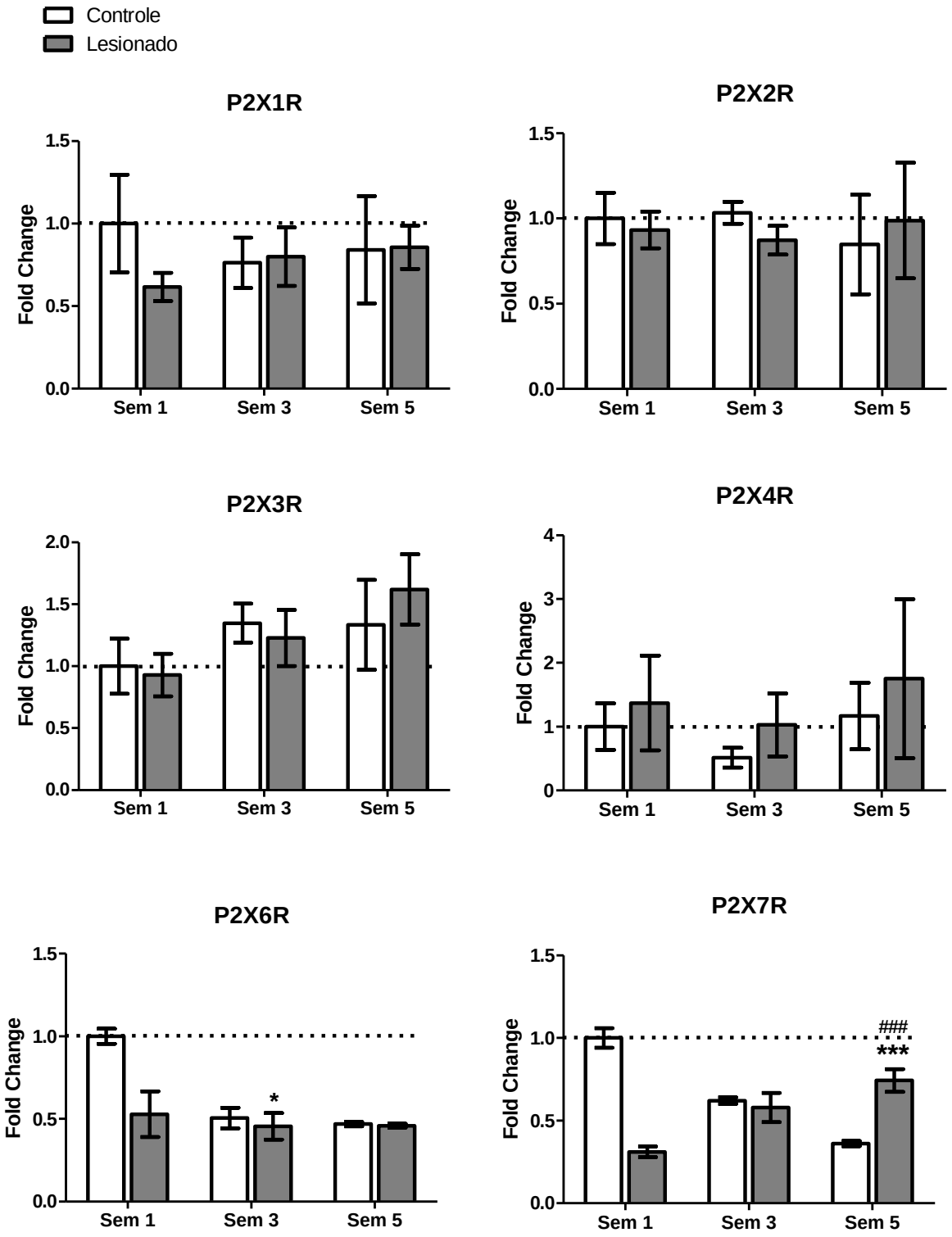
Os resultados obtidos na caracterização indicam que após uma semana da injeção de 6-OHDA na dose de 7µg/µl no feixe prosencefálico medial encontramos um perfil comportamental e bioquímico característico deste modelo animal. Além disso, apesar de ocorrer um aumento no número de rotações, a análise bioquímica mostrou que não há alterações significativas no estriado e substância negra a respeito do déficit dopaminérgico após 5 semanas.

4.1.2 Expressão dos receptores purinérgicos na progressão da lesão com 6-OHDA

Para avaliar o controle de expressão endógeno mais adequado ao nosso modelo experimental, analisamos a expressão gênica de 3 genes de referência: a.

Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (*GAPDH*); b. peptidil prolil isomerase A – ciclofilina A (*PPIA*); c. gene de proteína ribossomal 60S (*RPL0*). A expressão gênica de *RPL0* foi a mais estável entre os grupos, sugerindo ser o gene mais indicado para a normalização dos dados (resultados não mostrados).

A figura 7 apresenta a expressão dos receptores purinérgicos P2X e P2Y no estriado de ratos após 1, 3 e 5 semanas da lesão com 6-OHDA. Os receptores *P2X5* e *P2Y14* apresentaram-se pouco expressos e, portanto, não foram graficamente representados. Os receptores *P2X6*, *P2X7*, *P2Y6* e P2Y13 apresentaram diferença nos seus níveis de expressão entres os grupos nas semanas subsequentes à lesão. As médias e erro padrão das médias de todos os grupos analisados estão apresentados na tabela 3. Enquanto os hemisférios controle apresentaram uma diminuição progressiva na expressão do receptor *P2X7* durante as 5 semanas, os hemisférios lesionados da quinta semana apresentaram aumento significativo em relação ao hemisfério lesionado da primeira semana e com seu respectivo hemisfério controle. Além do receptor *P2X7*, a expressão genica de *P2Y6* aumentou significativamente na quinta semana após a lesão em comparação com todos os outros grupos. A expressão gênica do receptor *P2X6* do hemisfério lesionado apresentou diferença na terceira semana em relação ao hemisfério controle da primeira semana e a expressão gênica do receptor *P2Y13* do hemisfério lesionado da primeira semana apresentou diferença estatistica significativa em relação ao respectivo hemisfério controle e aos hemisférios lesionados da terceira e quinta semanas pós lesão.


Controle
Lesionado
P2X1R
P2X2R
P2X3R
P2X4R
P2X6R
P2X7R
Fold Change
Sem 1
Sem 3
Sem 5
*
###
***

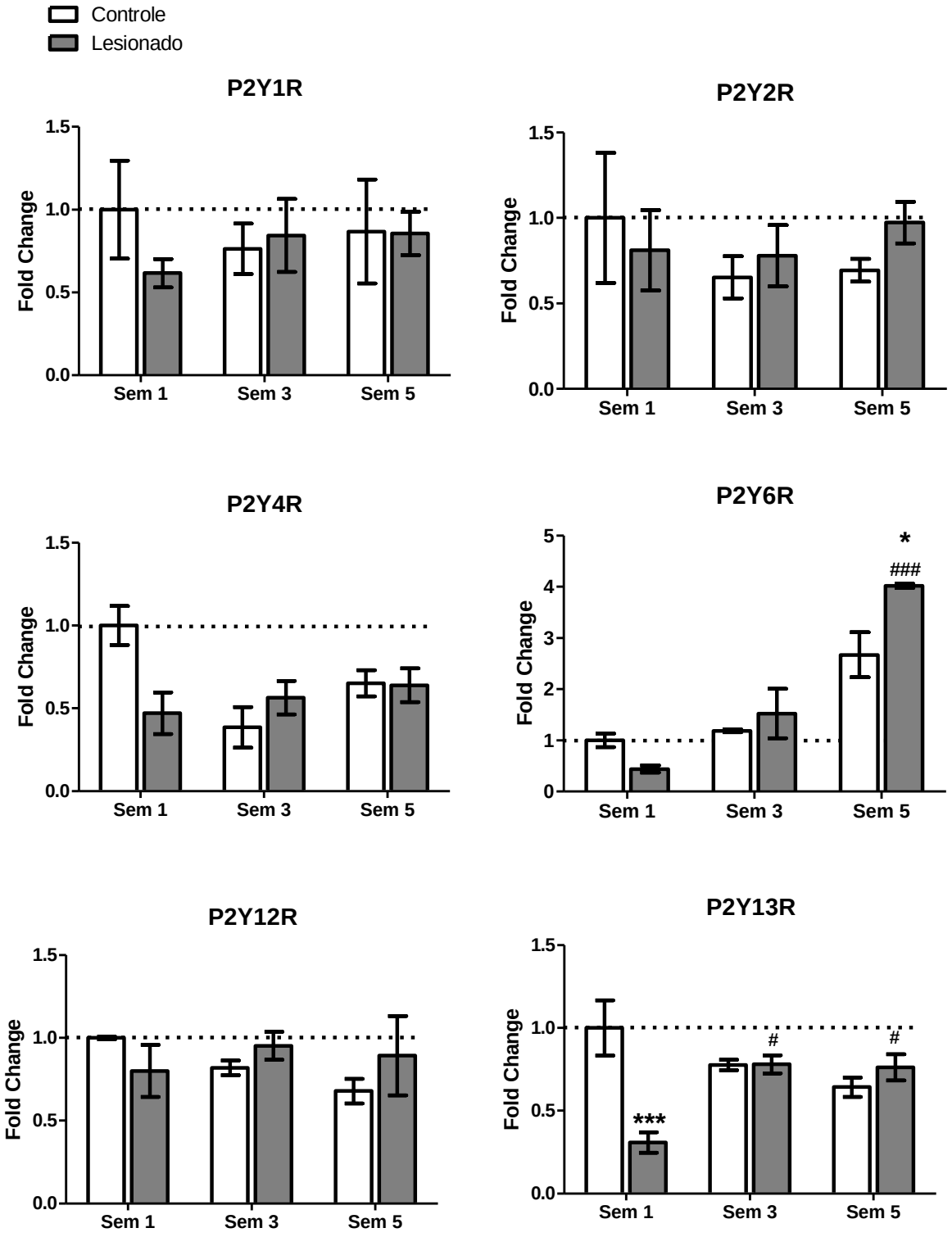


Figura 7. Padrão de expressão gênica de subtipos de receptores purinérgicos no estriado de ratos 1, 3 e 5 semanas após lesão com 6-OHDA. A expressão gênica dos receptores purinérgicos foram estudadas nos estriados controle (n=3, barras brancas) e

lesionados com 6-OHDA (n=3, barras cinzas). *p<0,05; ***p<0,001 em relação ao respectivo hemisfério controle. #p<0,05; ##p<0,01; ###p<0,001 em relação ao hemisfério lesionado 1 semana pós lesão, n=3 para cada grupo. ANOVA de duas vias seguida pelo posthoc de Bonferroni. Para efeito de melhor compreensão dos gráficos, algumas diferenças estatísticas foram omitidas para os receptores P2Y6 e P2X7.

Analisamos a expressão gênica do receptor *P2X7* em animais Sham, que passaram pela cirurgia estereotáxica com a injeção de 6-OHDA substituída por salina, para verificar se a alteração observada entre os hemisférios da primeira semana poderia ser decorrente do estresse da cirurgia. Nenhum grupo apresentou alteração estatisticamente significativa no decorrer das 5 semanas (Figura 8).

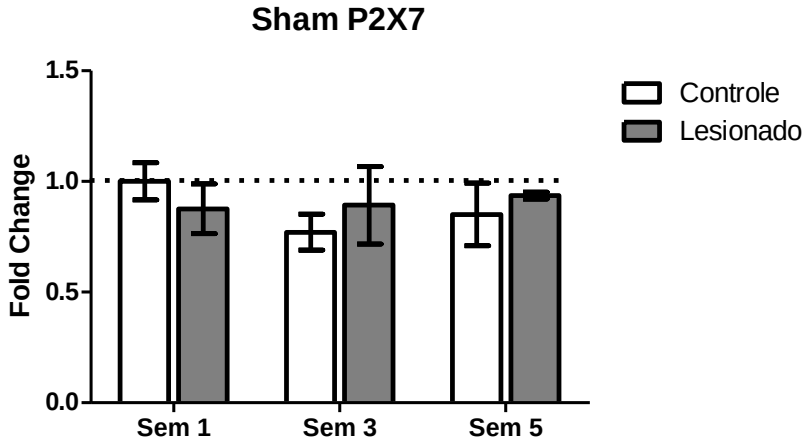


Figura 8. Padrão de expressão gênica do receptor P2X7 no estriado de ratos 1, 3 e 5 semanas após cirurgia estereotáxica. ANOVA de duas vias seguida pelo posthoc de Bonferroni. N=3.

Tabela 3: Média e erro padrão da média (E.P.M) da expressão gênica de receptores purinérgicos do estriado de animais lesionados com 6-OHDA

		1semana		3 semanas		5 semanas	
Receptor	Hemisfério	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
P2X1	Controle	1	0,295539	0,76266	0,152621	0,841021	0,324238
	Lesionado	0,616255	0,086061	0,799326	0,177804	0,856707	0,130916
P2X2	Controle	1	0,150842	1,033007	0,063778	0,872374	0,084199
	Lesionado	0,932132	0,108152	0,84774	0,292108	0,987098	0,339162

P2X3	Controle	1	0,222029	1,348204	0,157444	1,335266	0,361954
	Lesionado	0,928856	0,171903	1,22897	0,227061	1,620936	0,282737
P2X4	Controle	1	0,366095	0,51283	0,154314	1,167072	0,522273
	Lesionado	1,369442	0,742577	1,027386	0,492219	1,751231	1,247299
P2X6	Controle	1	0,045926	0,505994	0,062478	0,469	0,013
	Lesionado	0,528703	0,137772	0,455622	0,079465	0,458819	0,011293
P2X7	Controle	1	0,059367	0,620642	0,020379	0,361	0,015946
	Lesionado	0,310891	0,031641	0,579597	0,08887	0,743286	0,068438
P2Y1	Controle	1	0,295539	0,76266	0,152621	0,868548	0,313875
	Lesionado	0,616255	0,086061	0,844135	0,220173	0,856707	0,130916
P2Y2	Controle	1	0,381237	0,652446	0,123252	0,693602	0,067223
	Lesionado	0,810569	0,234992	0,778699	0,179753	0,972605	0,122317
P2Y4	Controle	1	0,117816	0,385539	0,122839	0,651714	0,07912
	Lesionado	0,470701	0,126631	0,564169	0,101308	0,63981	0,101906
P2Y6	Controle	1	0,129572	1,186855	0,025942	2,67079	0,437817
	Lesionado	0,43791	0,068715	1,521202	0,483531	4,019487	0,042148
P2Y12	Controle	1	0,008373	0,819114	0,043559	0,679144	0,074368
	Lesionado	0,800979	0,156751	0,952351	0,084087	0,892739	0,239981
P2Y13	Controle	1	0,167341	0,776598	0,031471	0,642616	0,058485
	Lesionado	0,308287	0,061431	0,78042	0,054629	0,762258	0,07912
P2X7	Controle	1	0,084308	0,770917	0,080692	0,850843	0,141659
(sham)	Lesionado	0,876016	0,112246	0,892018	0,174823	0,936039	0,015991

4.2 Modulação farmacológica do receptor P2X7

Levando em consideração o aumento da expressão gênica do receptor P2X7 na lesão com 6-OHDA e resultados anteriores de nosso laboratório que mostraram que a administração de BBG na dose de 50 mg/kg reverte o déficit dopaminérgico na região da substância negra mas não no estriado (Ferrazoli et al., 2017), estudamos o efeito do tratamento com diferentes doses de BBG neste modelo animal para verificar se doses maiores seriam eficientes também na recuperação das ramificações estriatais.

4.2.1 Análise comportamental

Uma semana após a lesão com 6-OHDA, os animais foram submetidos ao teste rotacional induzido por apomorfina e, durante 7 dias, receberam diariamente BBG (i.p.) nas doses de 5, 25, 50 e 75 mg/kg. Os resultados da figura 9 mostram que os animais lesionados tratados com BBG nas doses de 50 (1,33 +- 0,88) e 75 mg/kg (0,00 +- 0,00), mas não de 5 (10,00 +- 4,36) e 25 mg/kg (12,00 +- 1,73), apresentaram reversão do comportamento rotacional induzido por apomorfina pré-tratamento (12,50 +- 1,85), resultado indicativo de efeito antiparkinsoniano.

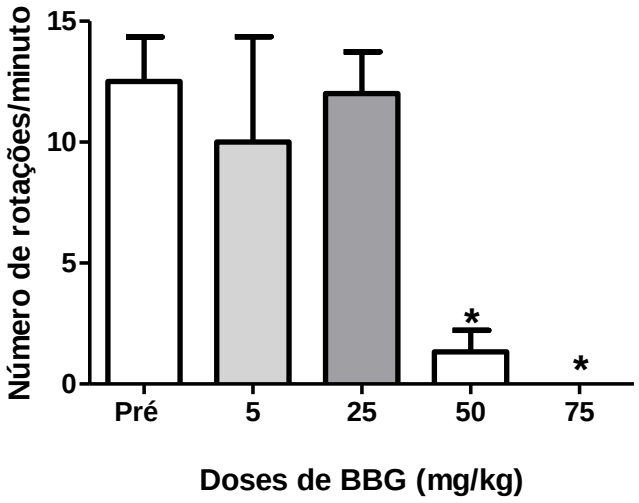


Figura 9. Curva dose-resposta da administração de BBG em animais lesionados. BBG nas doses de 5, 25, 50 e 75 mg/kg foi administrado por 7 dias 1 semana após a lesão induzida por 6-OHDA. Os animais foram submetidos ao teste rotacional induzido por apomorfina antes (pré) e depois do tratamento. *p<0,05 em relação ao número de rotações pré-tratamento, n=3-4. Análise de variância ANOVA de uma via seguida pelo posthoc de Tukey.

4.2.2 Análise dos neurônios dopaminérgicos da via nigroestriatal

Para estudar o efeito da administração de BBG nos neurônios dopaminérgicos da via nigroestriatal, analisamos a marcação para a enzima tirosina hidroxilase na

substância negra, onde se encontram os corpos celulares dos neurônios da via, e no estriado, onde encontramos as ramificações dos neurônios originados na substância negra e que compoem a via nigroestriatal.

Nos resultados apresentados na figura 10, verificamos que BBG na dose de 75 mg/kg foi capaz de reestabelecer significativamente as ramificações dopaminérgicas do estriado, como analisado pela densidade óptica da marcação imunohistoquímica para a enzima tirosina-hidroxilase (TH). Nas doses de 5, 25 e 50 mg/kg, podemos notar que há diferença estatística significativa entre os hemisférios cerebrais controle e lesionados, indicando que o déficit dopaminérgico induzido pela injeção de 6-OHDA persiste. Na dose de 75 mg/kg, a densidade óptica da marcação do hemisfério lesionado não apresenta diferença em relação ao hemisfério controle, indicando uma recuperação das ramificações dopaminérgicas do estriado desses animais.

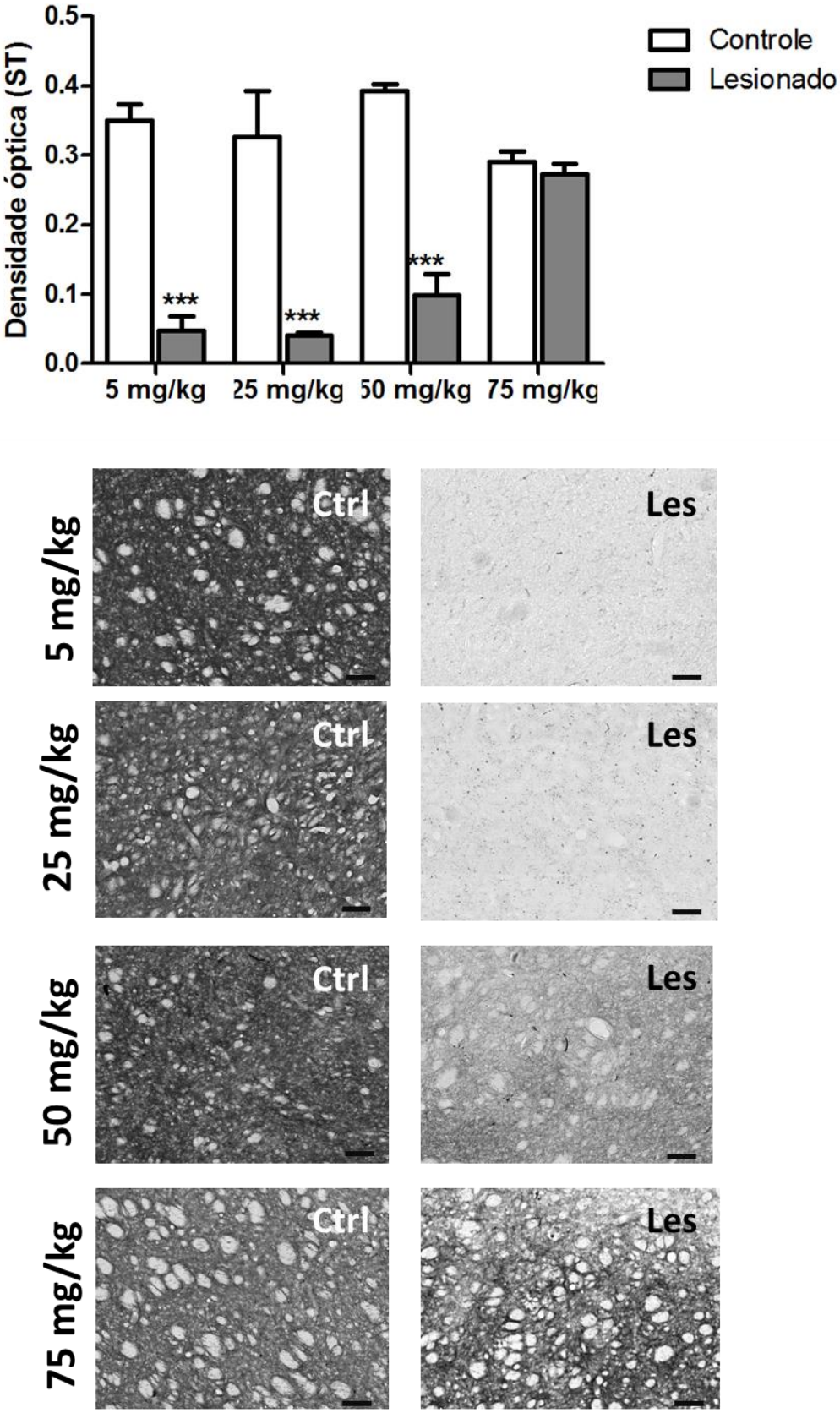
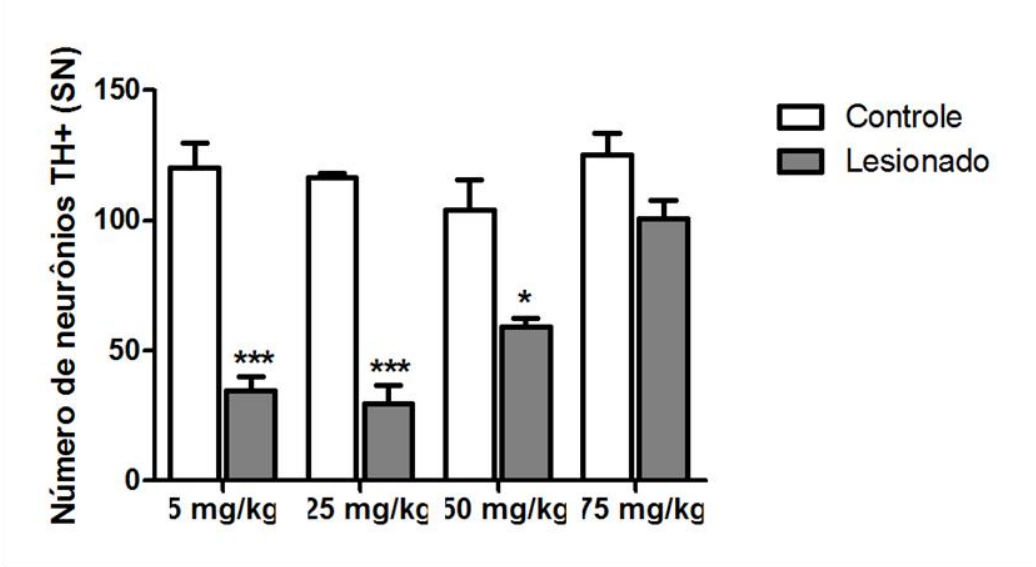

Densidade óptica (ST)
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
***
***
***
5 mg/kg
25 mg/kg
50 mg/kg
75 mg/kg
Controle
Lesionado
Ctrl
Les
5 mg/kg
25 mg/kg
50 mg/kg
75 mg/kg

Figura 10. Análise imunohistoquímica da marcação para TH no estriado de animais tratados com BBG. BBG nas doses de 5, 25, 50 e 75 mg/kg foi administrado diariamente durante 7 dias, uma semana após a lesão induzida por 6-OHDA. A densidade óptica dos hemisférios controle (Ctrl) e lesionados (Les) estão expressas como média +- erro padrão da média. ***p<0,001 em relação ao respectivo hemisfério controle, n=3. Análise de variância ANOVA de duas vias seguida pelo posthoc de Bonferroni. Escala: 100µm.

Na região da substância negra, realizamos a contagem do número de neurônios dopaminérgicos positivos para TH nos hemisférios controle e lesionado de cada grupo (figura 11). O tratamento com BBG nas doses de 50 e 75 mg/kg foram capazes de reestabelecer o número de neurônios dopaminérgicos, sendo que a dose de 75 mg/kg não apresentou diferença estatística em relação ao hemisfério controle, indicando efeito neurorregenerativo. Os valores das médias e erros padrão da média estão discorridos na tabela 4.


Número de neurônios TH+ (SN)
150
100
50
0
***
***
*
5 mg/kg
25 mg/kg
50 mg/kg
75 mg/kg
Controle
Lesionado

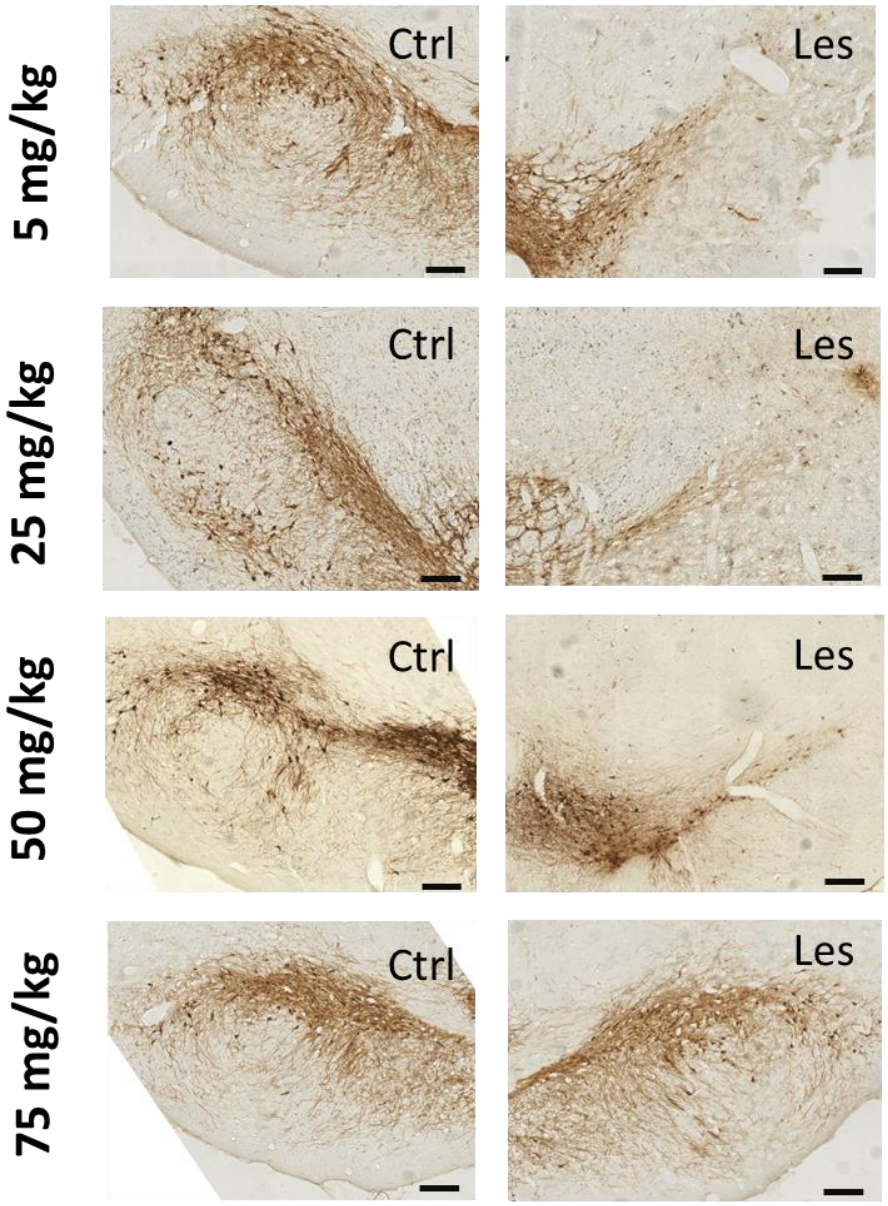

5 mg/kg
Ctrl
Les
25 mg/kg
Ctrl
Les
50 mg/kg
Ctrl
Les
75 mg/kg
Ctrl
Les

Figura 11. Análise imunohistoquímica da marcação para TH na substância negra de animais tratados com BBG. BBG nas doses de 5, 25, 50 e 75 mg/kg foi administrado diariamente durante 7 dias, uma semana após a lesão induzida por 6-OHDA. O número de neurônios positivos para TH dos hemisférios controle (Ctrl) e lesionados (Les) estão expressos como média +- erro padrão da média. ***p<0,001, p<0,05 em relação ao respectivo hemisfério controle, n=3. Análise de variância ANOVA de duas vias seguida pelo posthoc de Bonferroni. Escala: 200µm.

Tabela 4: Média e erro padrão da média (E.P.M) das análises imunohistoquímicas para TH de animais tratados com BBG

Estrutura	Hemisfério	Tratamento	Média	E.P.M
Estriado (densidade óptica)	Hemisfério Controle	BBG 5 mg/kg	0,350667	0,023096
		BBG 25 mg/kg	0,326667	0,065535
		BBG 50 mg/kg	0,392333	0,009404
		BBG 75 mg/kg	0,291000	0,014731
	Hemisfério Lesionado	BBG 5 mg/kg	0,048333	0,020513
		BBG 25 mg/kg	0,041333	0,003844
		BBG 50 mg/kg	0,098667	0,029689
		BBG 75 mg/kg	0,272333	0,015773
Substância Negra (número de neurônios)	Hemisfério Controle	BBG 5 mg/kg	120,3333	9,3512
		BBG 25 mg/kg	116,3333	1,7638
		BBG 50 mg/kg	104,0000	11,7898
		BBG 75 mg/kg	125,0000	8,5049
	Hemisfério Lesionado	BBG 5 mg/kg	34,6667	5,3645
		BBG 25 mg/kg	29,6667	6,8880
		BBG 50 mg/kg	59,0000	3,5119
		BBG 75 mg/kg	100,6667	7,2188

4.2.3 Análise do estado de ativação das células microgliais

Células da microglia reativas apresentam morfologia diferenciada e, quando marcadas com anticorpo anti-Iba-1, apresentam maior intensidade e área marcadas do que microglia em estado de repouso. Assim, analisamos a área marcada com Iba-1 no estriado e substância negra de animais lesionados com 6-OHDA e tratados com BBG 50 mg/kg por 7 dias para verificar uma possível modulação inflamatória.

No estriado, nenhum grupo apresentou marcação para Iba-1 alterada. A área marcada com Iba-1 dos hemisférios controle (15484,33 +- 3264,26) e lesionado (14586,33 +- 5216,73) dos animais salina são estatisticamente iguais aos hemisférios controle (19112,33 +- 8979,98) e lesionado (15241,33 +- 4632,53) dos animais tratados com BBG (figura 12).

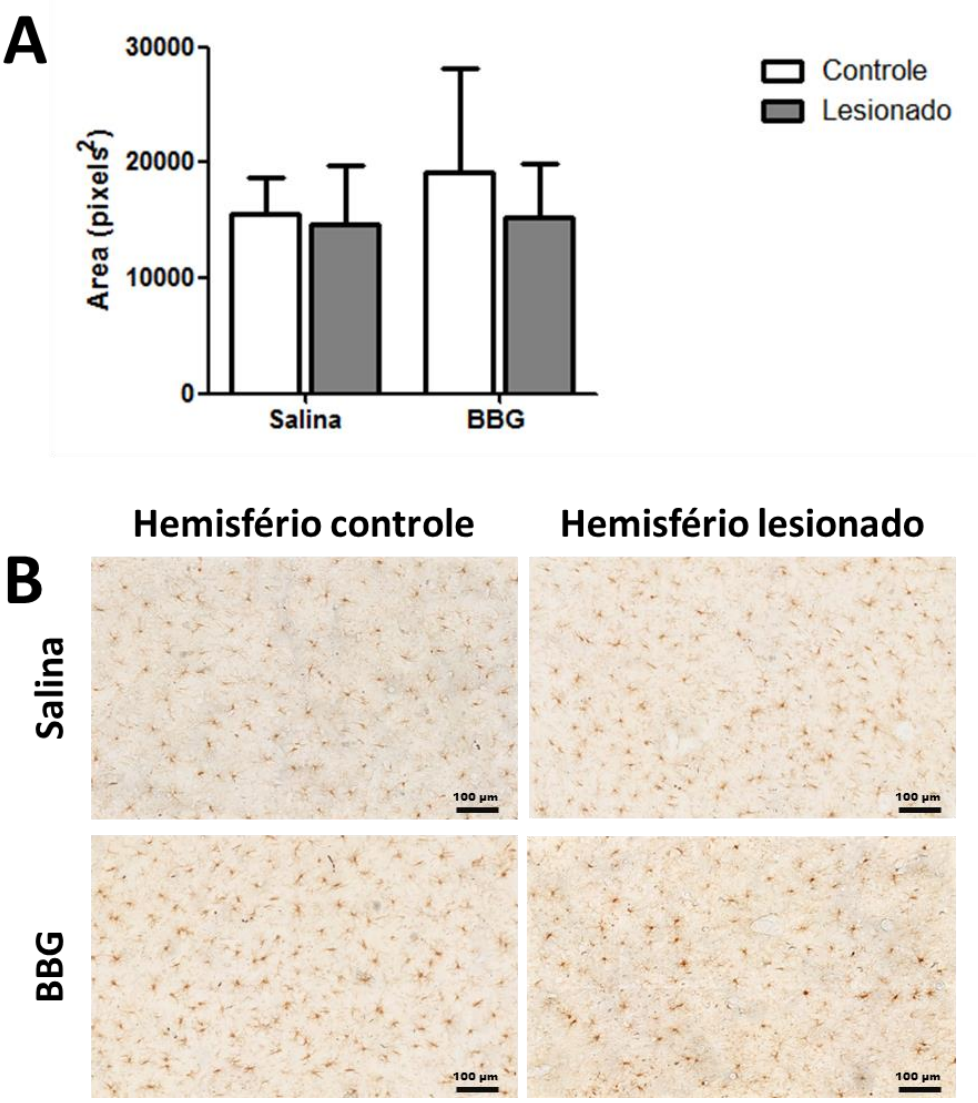


Figura 12. Análise imunohistoquímica da marcação para Iba-1 no estriado de animais tratados com BBG. Marcação para Iba-1 na região do estriado de animais tratados com BBG na dose de 50 mg/kg diariamente durante 7 dias, uma semana após a lesão induzida por 6-OHDA. A área marcada com Iba-1 nos hemisférios controle (Ctrl) e lesionados (Les)

está expressa como média +- erro padrão da média. n=3. Análise de variância ANOVA de duas vias seguida pelo posthoc de Bonferroni. Escala: 100µm.

Na substância negra, o hemisfério lesionado dos animais sem tratamento apresentaram aumento estatisticamente significativo na área marcada com Iba-1 (35154,00 +- 6578,26) em relação ao respectivo hemisfério controle (8745,33 +- 605,80), indicando a presença de células da microglia reativas. Esse efeito foi abolido pelo tratamento com BBG, como observado pela ausência de diferença entre o estriado lesionado desses animais (14972,00 +- 3009,02) em relação ao respectivo hemisfério controle (5933,33 +- 1406,74) e presença de diminuição estatisticamente significativa em relação ao hemisfério lesionado dos animais sem tratamento (Figura 13).

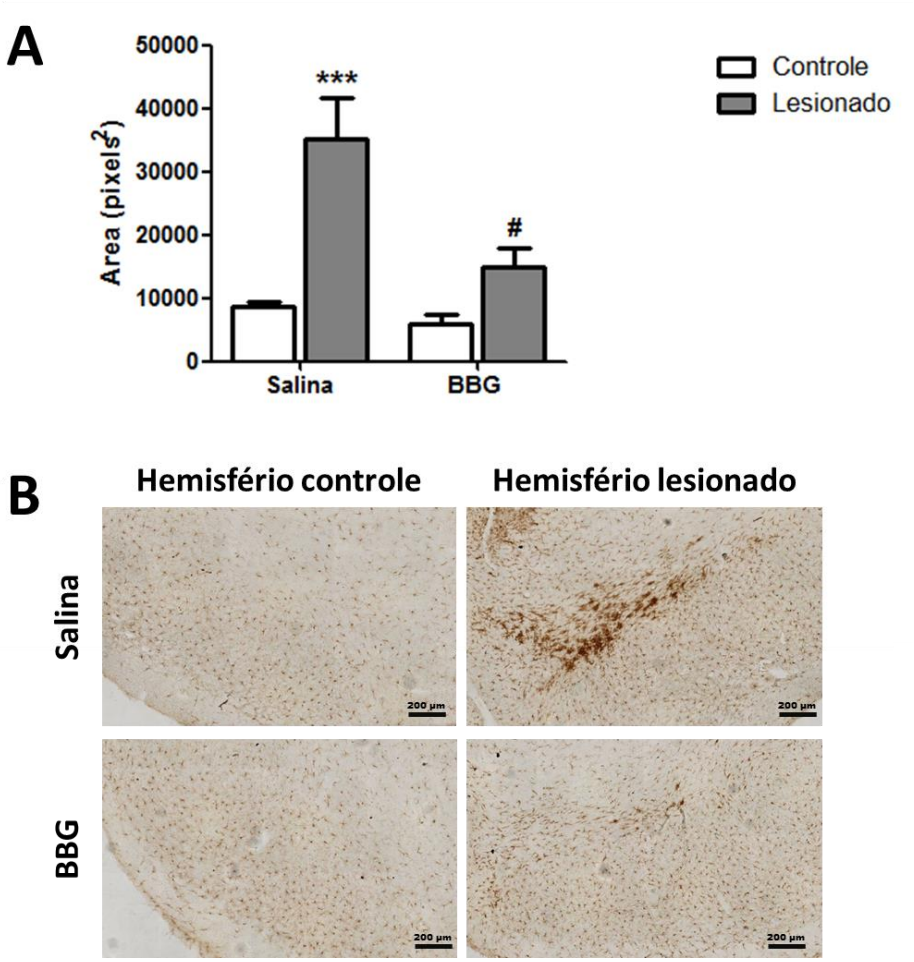


Figura 13. Análise imunohistoquímica da marcação para Iba-1 na substância negra de animais tratados com BBG. Marcação para Iba-1 na região da substância negra de animais tratados com BBG na dose de 50 mg/kg diariamente durante 7 dias, uma semana após a lesão induzida por 6-OHDA. A área marcada com Iba-1 nos hemisférios controle (Ctrl) e lesionados (Les) está expressa como média +- erro padrão da média. ***$p<0,01$ em relação ao respectivo hemisfério controle, #$p<0,05$ em relação ao hemisfério lesionado sem tratamento; n=3. Análise de variância ANOVA de duas vias seguida pelo posthoc de Bonferroni. Escala: 200µm.

4.2.4 Análise de outros tipos de neurônios

Para verificar se o tratamento com BBG 50 e 75 mg/kg induziu alteração em outros tipos de neurônios, imunohistoquímica para marcador neuronal NeuN foi realizada. Regiões medindo aproximadamente 1,5 por 1,0 mm no estriado e 1,8 por 1,2 mm na substância negra foram utilizadas na contagem. Os hemisférios lesionados e controles de todos os grupos, tanto no estriado quanto na substância negra, não apresentaram diferenças estatisticamente significativas no número de neurônios $NeuN^+$ (Figura 14). Esse resultado indica que a morte de neurônios dopaminérgicos induzida pela 6-OHDA não induz a morte de outros tipos de neurônios e que a recuperação induzida pelo tratamento com BBG não envolve o aumento de neurônios não dopaminérgicos. As médias e erro padrão das médias estão apresentadas na tabela 5.

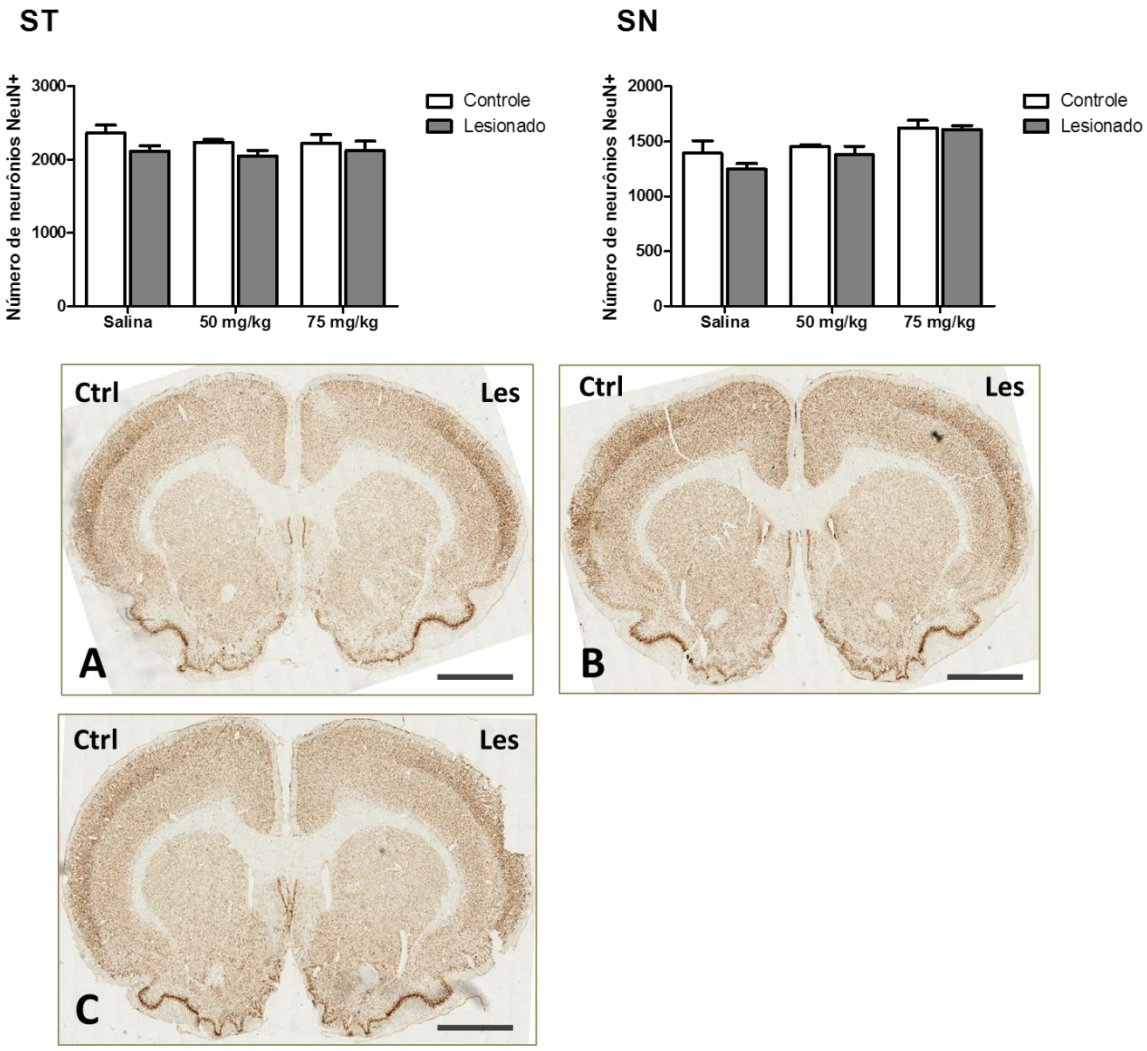


Figura 14. Análise imunohistoquímica da marcação para NeuN em animais tratados com BBG. Marcação para NeuN na região do estriado (ST) e substância negra (SN) de animais tratados com BBG na dose de 50 mg/kg ou 75 mg/kg diariamente durante 7 dias, uma semana após a lesão induzida por 6-OHDA. O número de neurônios NeuN+ nos hemisférios controle (Ctrl) e lesionado (Les) está expresso como média +- erro padrão da média. Cortes representativos da região do estriado dos animais (A) controle, (B) BBG 50 mg/kg, (C) BBG 75 mg/kg. n=3. Análise de variância ANOVA de duas vias seguida pelo posthoc de Bonferroni. Escala: 2mm

Tabela 5.: Número de neurônios NeuN+ em animais tratados com BBG

		Estriado		Substância Negra	
Grupo	Hemisfério	Média	EPM	Média	EPM
Salina	Controle	2362,333	109,4872	1392,333	112,0897
	Lesionado	2118	74,3797	1248,333	49,6566

BBG	Controle	2237,333	36,3608	1451,333	20,0859
50 mg/kg	Lesionado	2053	74,8421	1376	79,2864
BBG	Controle	2225	113,8479	1622,5	68,5
75 mg/kg	Lesionado	2124,333	130,2118	1608	35

4.3 Modulação farmacológica do receptor P2Y6

Como observamos um aumento estatisticamente significativo na expressão gênica dos receptores P2Y6 no decorrer de 5 semanas após a lesão com 6-OHDA, analisamos o efeito do uso do antagonista desse receptor, MRS2578, em células submetidas a 6-OHDA e em animais lesionados com 6-OHDA.

4.3.1 Ensaio de viabilidade celular por redução de MTT

Há na literatura dados envolvendo o efeito protetor do MRS2578 em células SH-SY5Y submetidas a morte celular, porém não há relatos da ação frente a exposição das células à morte induzida pela droga 6-OHDA (Qian et al., 2017). Sendo assim, testamos o tratamento preventivo com a droga MRS2578 em células submetidas a morte celular induzida por 6-OHDA. No ensaio de viabilidade por MTT, as células viáveis reduzem o anel tetrazólio do composto gerando cristais de coloração azulada, solúveis em DMSO. Quanto mais escura a coloração, maior a quantidade de células viáveis.

Nossos dados mostram que o tratamento das células com o composto MRS2578 na concentração de 1 µM (0,46 +- 0,04), mas não nas concentrações de 10 (0,21 +- 0,01) e 100 µM (0,22 +- 0,01), foi capaz de prevenir a morte induzida por 6-OHDA (0,53 +- 0,07), como observado pelo aumento da absorbância e ausência de diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle (0,56 +- 0,05). Como esperado, a morte induzida por 6-OHDA apresentou absorbância

significativamente menor em relação ao grupo controle em uma concentração de 100 µM, já padronizada em nosso laboratório por Semeano, ATS (figura 15).

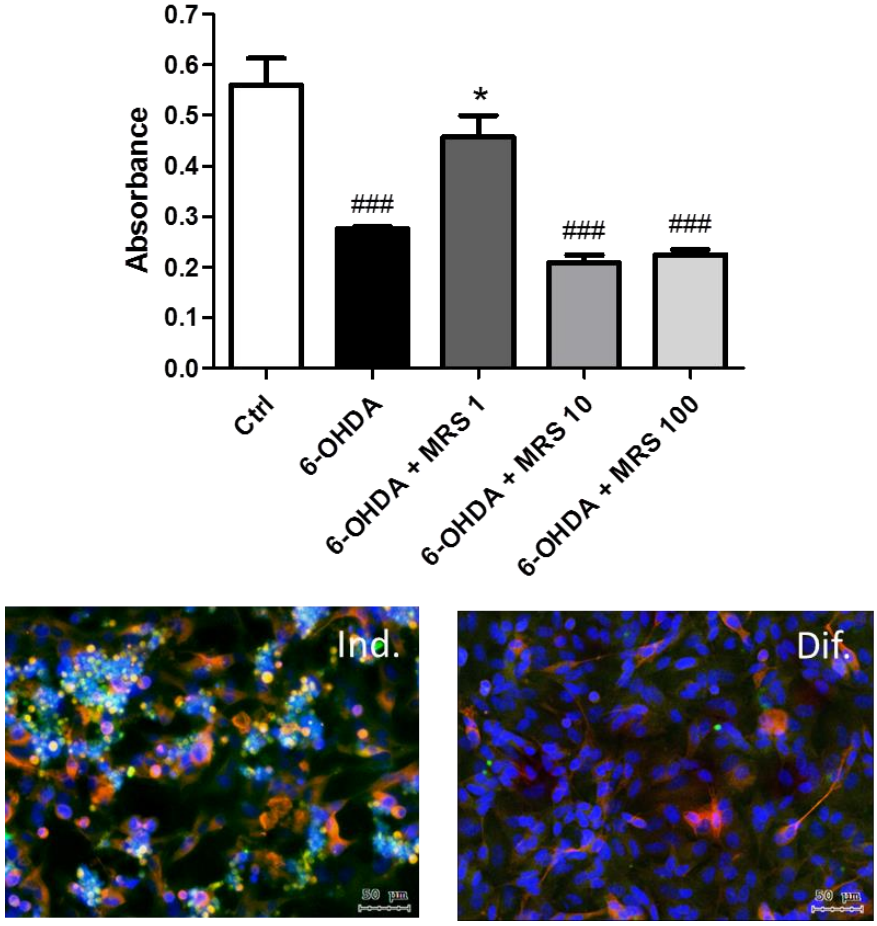


Figura 15.: Ensaio de viabilidade celular por redução de MTT. A viabilidade celular de células humanas SH-SY5Y diferenciadas em neurônios dopaminérgicos, tratadas com MRS2578 (MRS) em doses de 1, 10 e 100 µM por 30 minutos e submetidas a morte por 6-OHDA por 24 horas foi testada por redução de MTT. A absorbância a 600 nm está expressa como média +- erro padrão da média. Imunofluorescência para TH (verde, neurônios dopaminérgicos) e Tuj-1 (vermelho, neurônios) em células indiferenciadas e após diferenciação. * $p<0,05$ em relação ao grupo sem tratamento com morte induzida por 6-OHDA; ###$p<0,001$ em relação ao grupo 6-OHDA sem tratamento; n=3. Análise de variância ANOVA de uma via seguida pelo posthoc de Bonferroni. Escala: 50µm.

4.3.2 Análise comportamental

Por apresentar alterações na expressão gênica após 5 semanas da lesão induzida por 6-OHDA, testamos o efeito comportamental *in vivo* da administração de MRS2578. Utilizamos dois tratamentos: a. Preventivo, onde o composto MRS2578 foi administrado 10 minutos antes da injeção de 6-OHDA; b. Reversivo, onde o composto foi administrado após 5 semanas da lesão com 6-OHDA. Uma semana após os tratamentos, realizamos o teste rotacional induzido por apomorfina.

O comportamento rotacional induzido pela administração de apomorfina observado nos animais controle (10,50 +- 1,10) foi abolido nos animais tratados com uma dose única de MRS2578 antes da lesão com 6-OHDA (3,75 +- 1,67), indicando um efeito antiparkinsoniano preventivo (figura 16). Porém, quando tratados 5 semanas após a lesão com 6-OHDA, os animais não apresentaram diferença estatisticamente significativa no número de rotações (5,75 +- 3,38).

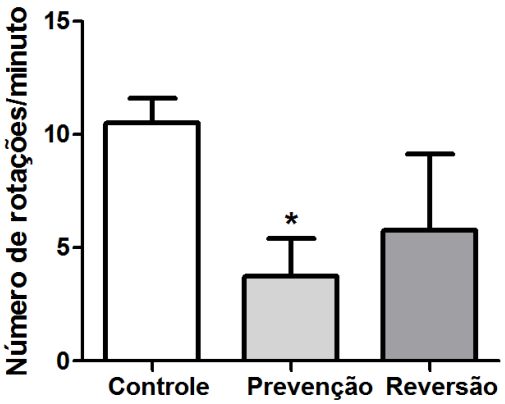
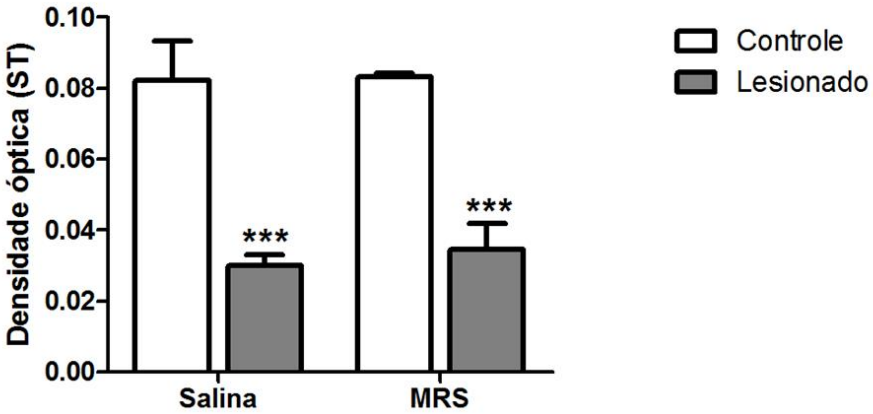


Figura 16. Teste rotacional induzido por apomorfina em animais tratados com MRS2578. MRS2578 administrado intraestriatalmente em dose única a 2µg/kg antes (prevenção) ou 5 semanas depois (reversão) da lesão com 6-OHDA. *p<0,05 em relação ao grupo controle, n=4-8. Análise de variância ANOVA de uma via seguida pelo posthoc de Tukey.

4.3.3 Análise dos neurônios dopaminérgicos da via nigroestriatal

Levando em consideração os resultados obtidos nos testes comportamentais com o sucesso da administração preventiva de MRS2578 em animais lesionados com 6-OHDA, analisamos os neurônios dopaminérgicos da via nigroestriatal através de imunohistoquímica para tirosina hidroxilase. Os resultados apresentados na figura 17 mostram que a administração de MRS2578 não foi capaz de prevenir a morte das ramificações dopaminérgicas do estriado, uma vez que a densidade óptica tanto do hemisfério lesionado do grupo salina (0,03 +- 0,00) em relação ao respectivo hemisfério controle (0,08 +- 0,01) quanto do hemisfério lesionado dos animais tratados com MRS2578 (0,03+-0,01) em relação ao respectivo hemisfério controle (0,08 +- 0,00) apresentam diferença entre si.



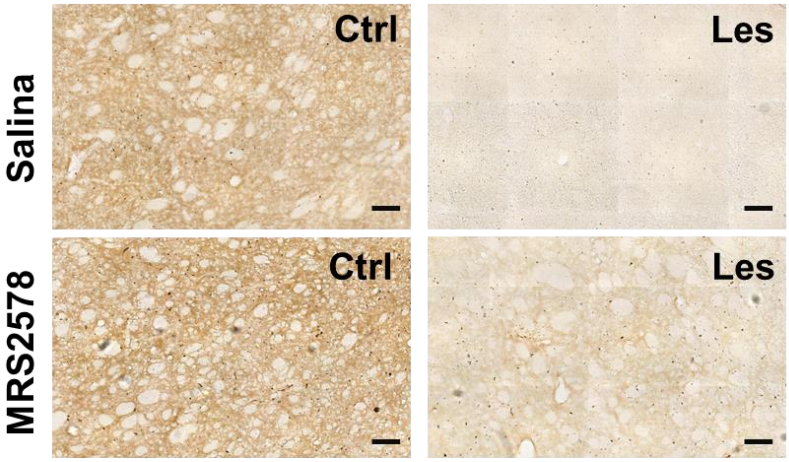


Figura 17. Análise imunohistoquímica da marcação para TH no estriado de animais tratados com MRS2578. MRS2578 (MRS) foi administrado em dose única 10 minutos antes da lesão induzida por 6-OHDA. A densidade óptica dos hemisférios controle (Ctrl) e lesionados (Les) estão expressas como média +- erro padrão da média. ***p<0,001 em relação ao respectivo hemisfério controle, n=3. Análise de variância ANOVA de duas vias seguida pelo posthoc de Bonferroni. Escala: 100µm.

Na região da substância negra (figura 18), o tratamento preventivo com MRS2578 foi capaz de reestabelecer o número de neurônios dopaminérgicos do hemisfério lesionado (39,37 +- 5,45) em relação ao respectivo hemisfério controle (77,25 +- 10,94), como sugerido pela falta de diferença estatisticamente significativa. Como controle da lesão com 6-OHDA, os animais lesionados que receberam salina apresentaram diminuição no número de neurônios dopaminérgicos na substância negra do hemisfério lesionado (20,67 +- 4,41) em relação ao hemisfério controle (83,33 +- 14,19).

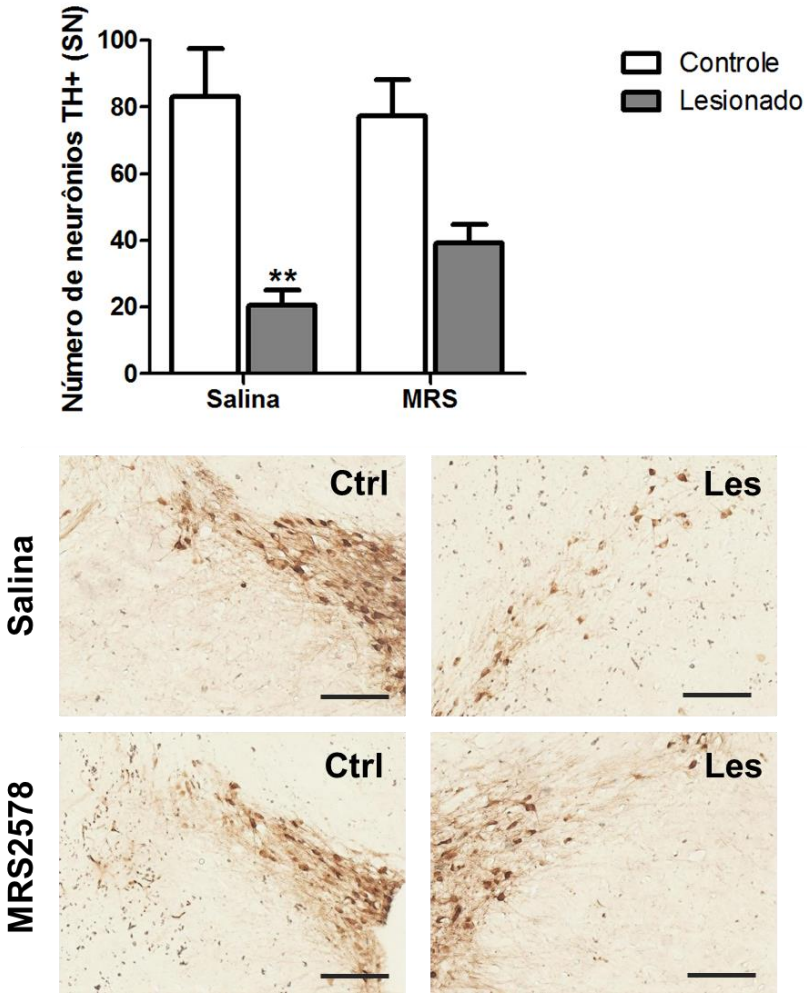


Figura 18. Análise imunohistoquímica da marcação para TH na substância negra de animais tratados com MRS2578. Marcação para TH na região da substância negra de animais tratados com dose única intraestriatal de MRS2578 a 2µg/kg e posteriormente lesionados com 6-OHDA. O número de neurônios positivos para TH dos hemisférios controle (Ctrl) e lesionados (Les) estão expressos como média +- erro padrão da média. **p<0,01 em relação ao respectivo hemisfério controle, n=3. Análise de variância ANOVA de duas vias seguida pelo posthoc de Bonferroni. Escala: 200µm.

4.3.4 Análise do estado de ativação das células microgliais

No estriado, o hemisfério lesionado com 6-OHDA sem tratamento (2111,67 +- 135,99) não apresentou alteração na marcação para Iba-1 em relação ao respectivo hemisfério controle (2188,67 +- 95,37). Similarmente, a área marcada com Iba-1 dos hemisférios controle (2732,25 +- 235,66) e lesionado (2243,00 +- 186,58) dos

animais submetidos ao tratamento preventivo com MRS2578 são estatisticamente iguais entre si (figura 19).

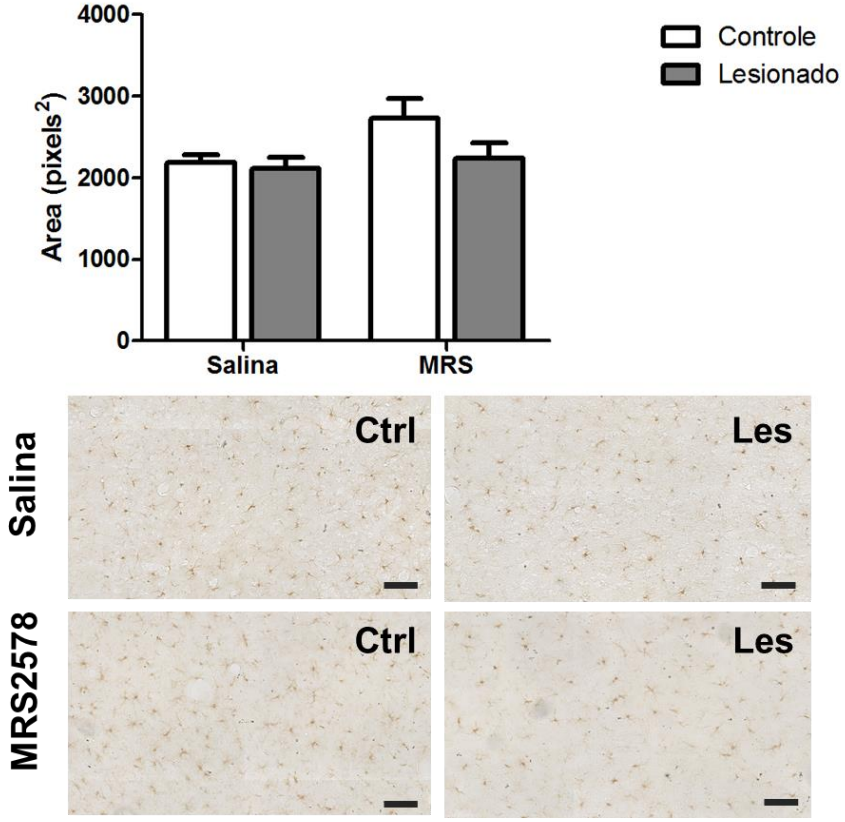


Figura 19.: Análise imunohistoquímica da marcação para Iba-1 no estriado de animais tratados com MRS. Marcação para Iba-1 na região do estriado de animais tratados com MRS2578 (MRS) previamente à lesão com 6-OHDA. A área marcada com Iba-1 nos hemisférios controle (Ctrl) e lesionados (Les) está expressa como média +- erro padrão da média. n=3-4. Análise de variância ANOVA de duas vias seguida pelo posthoc de Bonferroni. Escala: 100µm.

Por outro lado, o tratamento preventivo com MRS2578 foi capaz de prevenir a ativação microglial da substância negra (figura 20) no hemisfério lesionado (20285,50 +- 5535,98) em relação ao respectivo hemisfério controle (7854,00 +- 1002,37), como sugerido pela falta de alteração estatisticamente significativa, e em relação ao hemisfério lesionado sem tratamento (42452,00 +- 3544,13). O hemisfério

controle dos animais sem tratamento apresentou área marcada equivalente a morfologia microglial inativa (8530,67 +- 1650,87).

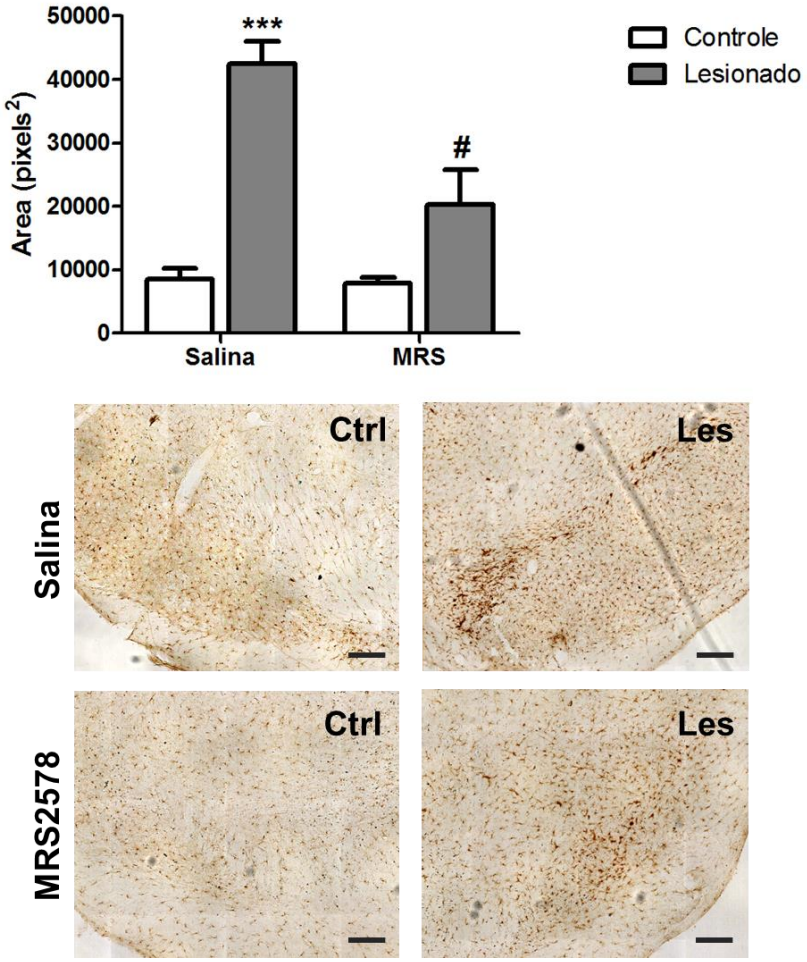


Figura 20.: Análise imunohistoquímica da marcação para Iba-1 na substância negra de animais tratados com MRS. Marcação para Iba-1 na região do estriado de animais tratados com MRS2578 (MRS) previamente a lesão com 6-OHDA. A área marcada com Iba-1 nos hemisférios controle (Ctrl) e lesionados (Les) está expressa como média +- erro padrão da média. ***p<0,01 em relação ao respectivo hemisfério controle, #p<0,05 em relação ao hemisfério lesionado sem tratamento; n=3-4. Análise de variância ANOVA de duas vias seguida pelo posthoc de Bonferroni. Escala: 200µm.

4.4 Terapia de transplante celular

4.4.1 Caracterização da diferenciação dopaminérgica de células E14Tg2a

Para a terapia de transplante celular, células embrionárias pluripotentes murinas E14Tg2a foram submetidas a diferenciação dopaminérgica (figura 21). Como esperado, observamos a expressão do marcador de precursor neural “Nestina” e do marcador de neurônio “Tuj1” (β3-tubulina específica para neurônios) nas células progenitoras neurais (CPN). Induzimos a diferenciação dopaminérgica para verificar a habilidade das precursoras neurais em se diferenciar nesse tipo neuronal de interesse. Quando na fase de neurônio dopaminérgico, as células apresentaram marcação para neurônio “Tuj1” e para neurônio dopaminérgico “TH” (tirosina hidroxilase), indicando o sucesso da diferenciação.

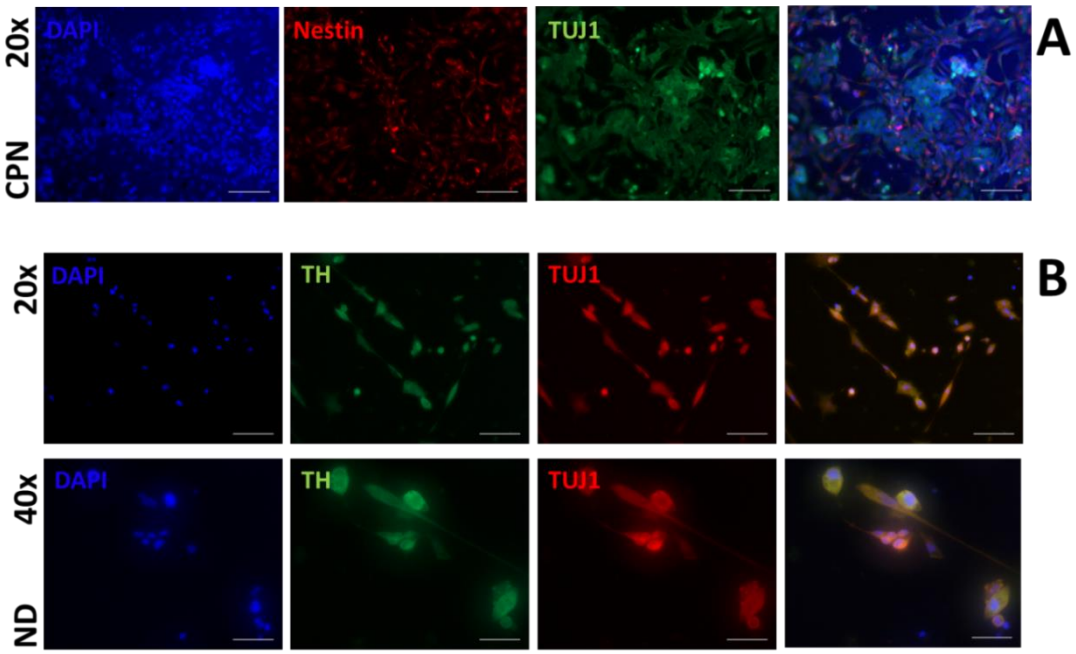


Figura 21.: Análise de expressão de marcadores celulares em células E14Tg2a diferenciada em neurônios dopaminérgicos por imunocitoquímica. As células progenitoras neurais (CPN, painel A) foram marcadas para Nestina (marcador de CPN) e

Tuj1 (beta 3tubulina, marcador de neurônio). Os neurônios dopaminérgicos (ND, painel B) foram marcados para tirosina hidroxilase (TH, marcador de ND) e Tuj1.

4.4.2 Transplante Celular

As células diferenciadas em estágio de CPN multipotentes foram transplantadas no estriado de ratos lesionados, uma semana após a injeção de 6-OHDA. O teste rotacional induzido por apomorfina foi realizado a cada 15 dias, durante 12 semanas. Além disso, testamos a capacidade do co-tratamento do transplante com BBG (50 mg/kg, i.p., 7 dias) em reverter o comportamento rotacional. Embora na sexta e na décima semanas os animais transplantados sem tratamento com BBG apresentaram uma tendência a um número de rotações diminuído, o transplante não foi eficaz em reverter o comportamento rotacional após 12 semanas (9,25 +- 0,48) (figura 22). O co-tratamento do transplante celular com BBG foi eficaz em reverter o comportamento rotacional ao final das 12 semanas (3,25 +- 0,25) em relação ao respectivo grupo controle (12,00 +- 0,71). Porém, o tratamento dos animais com somente BBG (1,25 +- 0,48) apresentou uma maior diminuição no número de rotações estatisticamente significativa em comparação ao co-tratamento, indicando que possivelmente o transplante piore o estado inflamatório induzido por 6-OHDA e atrapalhe o efeito neurorregenerativo do BBG. As médias e erro padrão da média de todos os grupos está apresentada na tabela 6.

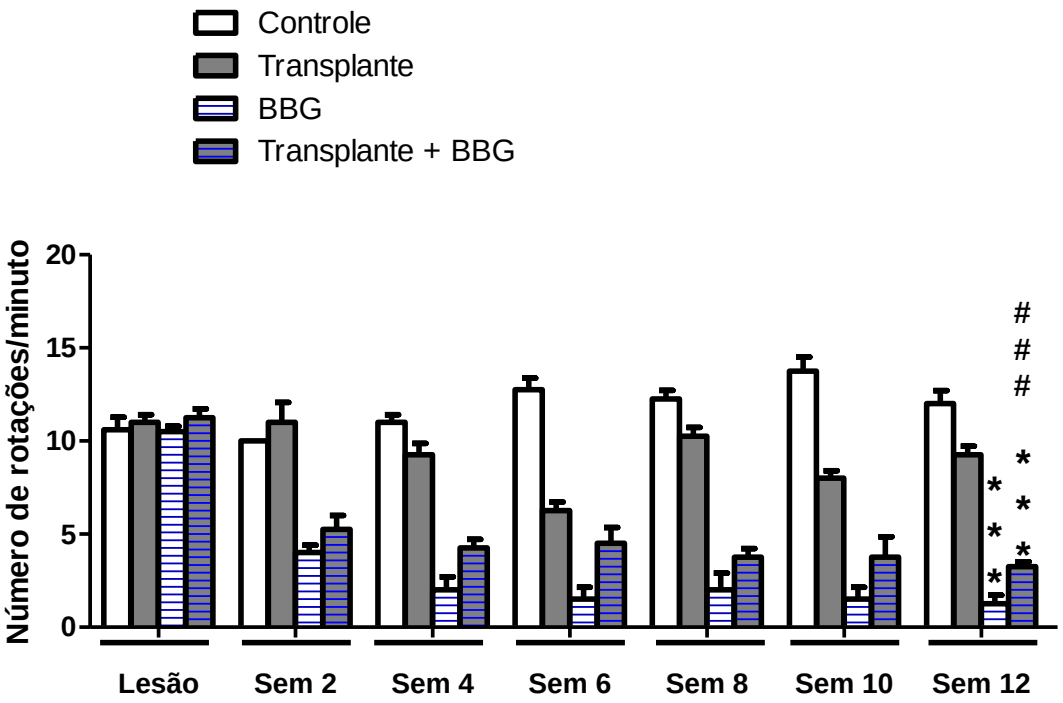


Figura 22. Teste rotacional induzido por apomorfina em animais transplantados e tratados com BBG. Número de rotações/minuto dos animais lesionados com 6-OHDA (controle), tratados somente com BBG 50 mg/kg (BBG), somente transplantados com células precursoras neurais (transplante) ou em terapia combinada de transplante e tratamento com BBG 50 mg/kg (translpante+BBG) por um período de 12 semanas após o transplante. Resultados significativos representados somente para o período de 12 semanas. ***p<0,001 em relação ao respectivo grupo controle; ### p<0,001 em relação ao grupo tratado somente com BBG; n=4-5 para cada grupo. ANOVA fatorial seguida de posthoc de Tukey.

Tabela 6: Número de rotações por minuto de animais transplantados com ou sem tratamento com BBG

	Controle		Transplante		BBG		Transplante + BBG	
Semana	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
Lesionado	10,60000	0,678233	11,00000	0,408248	10,50000	0,288675	11,25000	0,478714
2 semanas	10,00000	0,000000	11,00000	1,080123	4,00000	0,408248	5,25000	0,750000
4 semanas	11,00000	0,408248	9,25000	0,629153	2,00000	0,707107	4,25000	0,478714
6 semanas	12,75000	0,629153	6,25000	0,478714	1,50000	0,645497	4,50000	0,866025
8 semanas	12,25000	0,478714	10,25000	0,478714	2,00000	0,912871	3,75000	0,478714
10 semanas	13,75000	0,750000	8,00000	0,408248	1,50000	0,645497	3,75000	1,108678
12 semanas	12,00000	0,707107	9,25000	0,478714	1,25000	0,478714	3,25000	0,250000

6. Discussão

A Doença de Parkinson é uma doença altamente incapacitante e de grande prevalência. Pouco se sabe sobre sua etiologia e os tratamentos atuais consistem na diminuição dos sintomas, uma vez que ainda não foi encontrada uma maneira de reverter o déficit de neurônios dopaminérgicos observados nos pacientes acometidos. Assim, modelos animais são amplamente utilizados na pesquisa de novos medicamentos e terapias que impeçam ou revertam o deficit dopaminérgico da via nigroestriatal. Neste trabalho, utilizamos o modelo de Doença de Parkinson por lesão da via nigroestriatal através da injeção de 6-OHDA no feixe prosencefálico medial. Caracterizamos a lesão quanto a extensão da lesão dopaminérgica e resposta comportamental dos animais no teste rotacional induzido por apomorfina em até 5 semanas após a lesão.

Para isso, os animais foram submetidos ao teste rotacional, cujo comportamento rotacional é indicativo de lesão, 1, 3 ou 5 semanas após a lesão. Apesar de haver um aumento no número de rotações entre 1 e 5 semanas, a análise imunohistoquímica dos neurônios dopaminérgicos positivos para tirosina hidroxilase da região da substância negra e suas ramificações no estriado não apresentaram diferença, indicando uma grande amplitude na lesão após a primeira semana. Na análise imunohistoquímica, analisamos através do software ImageJ o número de neurônios na região da substância negra e a densidade óptica na região do estriado, uma vez que nesta região se encontram somente as ramificações neuronais. Como esperado, em ambas regiões pudemos observar uma extensa diminuição da marcação para tirosina hidroxilase nos hemisférios lesionados com 6-OHDA em comparação com os hemisférios controle. Além disso, após 5 semanas, não

observamos uma recuperação espontânea dos neurônios dopaminérgicos como observado em algumas variações de protocolo da lesão com 6-OHDA, com diferentes doses e locais de aplicação da droga (Schwarting and Huston, 1996).

Levando em consideração a grande participação dos receptores purinérgicos em processos fisiológicos e patológicos, analizamos a expressão gênica desses receptores nos animais lesionados. Primeiramente, testamos os genes padrão *GAPDH*, *PPIA* e *RPL0* para normalização das amostras. A expressão do gene de GAPDH apresentou alterações significativas entre os grupos de diferentes condições experimentais. A enzima GAPDH participa do processo de glicólise, e por sua regulação ser ligada ao processo de fosforilação oxidativa da cadeia respiratória mitocondrial, é superexpressa em condições patológicas com desbalanço de concentrações de ATP e ADP (Ramzan et al., 2013; Tarze et al., 2007). O composto 6-OHDA utilizado na modelagem da Doença de Parkinson atua inibindo o complexo I da cadeia respiratória mitocondrial, possível causa da alteração observada na expressão gênica de GAPDH. Já a proteína ciclofilina A, codificada pelo gene PPIA, tem sido demonstrada interagir com intermediadores apoptóticos em processos de dano cerebral (Hagberg et al., 2009).

Com relação a expressão gênica dos receptores purinérgicos normalizados pelo gene padrão RPL0, observamos que o estriado lesionado dos animais 5 semanas após a lesão apresentou um aumento na expressão gênica dos receptores P2X7 em comparação com o hemisfério lesionado dos animais 1 semana após a lesão e em comparação com o respectivo hemisfério controle. A visão geral do padrão de expressão desse receptor mostra um aumento progressivo nos estriados lesionados com o passar das semanas. Sabe-se que a ativação sustentada do receptor P2X7 em condições patológicas pode levar a abertura de macroporos

membranares com permeabilidade aumentada que induz cascatas de sinalização pró-apoptóticas (Di Virgilio et al., 2018). De fato, a expressão do receptor P2X7 tem se mostrado diretamente relacionada com a habilidade do ATP em desencadear processos apoptóticos (North, 2002). Esses trabalhos corroboram o aumento observado na expressão gênica do P2X7 nos hemisférios lesionados com 6-OHDA, uma vez que possivelmente ocorre intensa liberação de ATP pelas células danificadas, abertura de macroporos membranares e ativação de células microgliais com aumento de liberação de citocinas pró-inflamatórias (Monif et al., 2010).

Dados da literatura mostram o envolvimento de receptores purinérgicos em modelos animais de estresse (Farooq et al., 2018; Yue et al., 2017). Levando em consideração que todas as amostras analisadas são provenientes de animais que passaram pelo procedimento cirurgico e o perfil gênico do receptor P2X7 mostrou um *fold change* aumentado no hemisfério controle 1 semana após a lesão, coletamos amostras de animais Sham para avaliar se trata-se de um aumento decorrente do estresse da manipulação. Os animais Sham não apresentaram diferença na expressão gênica entre os grupos. Esse resultado indica que a alteração da expressão gênica do receptor P2X7 observada nos animais lesionados é decorrente do modelo animal utilizado de injeção de 6-OHDA, e não das condições experimentais inerentes à droga utilizada.

Além do receptor P2X7, o subtipo de receptor purinérgico P2Y6 também apresentou aumento gradual nos hemisférios com o decorrer das 5 semanas subsequentes à injeção com 6-OHDA. Recentemente, um estudo em células mononucleares do sangue periférico de indivíduos com Doença de Parkinson demonstrou um aumento da expressão gênica do receptor P2Y6, que foi proposto pelos autores como possível marcador biológico para a doença (Yang et al., 2017).

Além disso, sabe-se que o receptor P2Y6 participa da ativação microglial e controle de fagocitose de neurônios viáveis, e sua inibição previne a perda neuronal em condições inflamatórias (Neher et al., 2014). Levando em consideração que a Doença de Parkinson apresenta um quadro neurodegenerativo acompanhado por processo neuroinflamatório, o aumento na expressão gênica do receptor P2Y6 dos hemisférios lesionados poderia ser decorrente do aumento do quadro inflamatório. Além dos hemisférios lesionados, os hemisférios controle apresentaram aumento gradativo na expressão gênica do receptor P2Y6, em menor intensidade. Esses dados podem indicar a participação desse subtipo de receptor no processo de envelhecimento, apesar de não haver estudos na literatura que corroborem essa hipótese. Entretanto, o cérebro não-patológico em envelhecimento apresenta maior susceptibilidade a resposta inflamatória, uma possível causa e/ou consequência do aumento da expressão gênica do receptor P2Y6 (Poddar et al., 2018).

Pouco se sabe sobre a função dos receptores P2Y13, que apresentaram uma diminuição da expressão gênica uma semana após a lesão e retorno às condições basais após três semanas. Mecanismos compensatórios poderiam explicar a diminuição inicial, uma vez que deleção genética desse receptor induz a neurogênese hipocampal adulta acompanhada de diminuição de células microgliais com morfologia reativa (Stefani et al., 2018). Além disso, cultura de astrócitos cerebelares mostram que a ativação do subtipo de receptor P2Y13 com o agonista 2-metil-tio-ADP possui efeito neuroprotetor contra estresse oxidativo (Morente et al., 2014), sendo que o aumento da expressão gênica desse subtipo de receptor nos hemisférios após 3 semanas poderia ocorrer devido a mecanismos de defesa antioxidante.

Com o intuito de verificar se a inibição do receptor P2X7 em doses maiores que a encontrada na literatura (Ferrazoli et al., 2017) é capaz de reverter o deficit dopaminérgico estriatal em modelo animal de doença de Parkinson, ratos lesionados com 6-OHDA foram tratados com BBG em doses de 5, 25, 50 e 75 mg/kg. Como previamente descrito por nosso grupo (Ferrazoli et al., 2017), BBG na dose de 50 mg/kg foi capaz de reverter o deficit dopaminérgico na região da substância negra, mas não na região do estriado. Porém, quando tratados com uma dose de BBG de 75 mg/kg, os animais apresentaram regeneração completa dos neurônios dopaminérgicos da via nigroestriatal. Além de nossos resultados que mostram o efeito do BBG em reverter o déficit dopaminérgico, um estudo da literatura mostra que o antagonismo do receptor P2X7 também é eficaz em prevenir a morte desses neurônios nesse mesmo modelo animal, quando os animais foram tratados previamente a lesão (Carmo et al., 2014).

Com a liberação de ATP decorrente da morte celular induzida por 6-OHDA, há a amplificação da neuroinflamação e do processo lesivo, e aumento da liberação de citocinas pró-inflamatórias como IL-1β, TNF-alfa e óxido nitrico (Zhang et al., 2005). Parte dessa ação ocorre devido a ligação do ATP e ativação dos receptores purinérgicos P2X7. Durante a resposta imune, DAMPs ativam receptores de reconhecimento de padrões (PRRs, do inglês *"Pattern Recognition Receptors"*), amplamente expressos no sistema nervoso central por células microgliais, neurônios e astrócitos (Kigerl et al., 2014). Essa ativação exacerba a liberação de ATP, que se liga a receptores P2X7 e consequentemente ativa inflamassomas NALP3 e secreção de interleucinas pró-inflamatórias (Di Virgilio, 2007). A inibição do receptor P2X7 pelo tratamento com BBG poderia estar atuando imunomodulando o microambiente da lesão, impedindo a exacerbação da lesão e criando condições favoráveis à

repopulação neuronal pelos mecanismos de reparo tecidual, como recrutamento e indução de diferenciação de células progenitoras neurais das áreas neurogênicas do cérebro. Como revisado em Oliveira et al. (Oliveira et al., 2016), essa hipótese é corroborada pela constatação de que células progenitoras neurais das zonas subventricular e subgranular do cérebro adulto expressam receptores P2X7 (Genzen et al., 2009; Messemer et al., 2013), e que a inibição desse receptor é essencial para a diferenciação de células precursoras neurais em neurônios *in vitro* (Glaser et al., 2014a).

Utilizamos a marcação com NeuN para verificar o efeito do tratamento com BBG em outros tipos neuronais, uma vez que esse marcador apresenta forte expressão em neurônios - exceto os dopaminérgicos da substância negra (Cannon e Greenamyre, 2009). Apesar da intensidade da marcação com NeuN ser amplamente utilizada como indicador de diferenciação, sendo novos neurônios marcados mais intensamente que neurônios mais maduros, dados da literatura indicam que a intensidade pode variar dentro de uma mesma população neuronal (Gusel'nikova e Korzhevskiy, 2015). Assim, analizamos somente o número de células marcadas. Nossos dados indicam que o tratamento com BBG não altera o número de neurônios não-dopaminérgicos do estriado e substância negra, indicando um efeito específico na modulação da população neuronal. Esse dado poderia indicar que a morte seletiva e o déficit dopaminérgico desencadeie efeitos neurogênicos do BBG voltados para a repopulação das células perdidas, como por exemplo induzir o recrutamento e diferenciação de células progenitoras das zonas neurogênicas em neurônios dopaminérgicos, e não a indução a qualquer outro tipo neuronal. Entretanto, mais estudos são necessários para validar essa hipótese.

Além de antagonizar receptores purinérgicos P2X7, o composto BBG também bloqueia, com menor potência, canais de sódio dependentes de voltagem dos neurônios (Jo and Bean, 2011). Sabe-se que um aumento na permeabilidade membranar ao sódio contribui para neurodegeneração axonial (Stys et al., 1992). O bloqueio de canais de sódio dependentes de voltagem tem sido expeculado participar de efeito neuroprotetor em diferentes modelos neurodegenerativos (Kapoor, 2008; Li et al., 2014; Verleye et al., 2016). Apesar de exercer menor efeito em canais de sódio do que em receptores P2X7, a condução de outros estudos seria interessante para elucidar a dimensão de cada modulação no efeito neuroprotetor do BBG.

Como observamos um aumento na expressão gênica do receptor purinérgico P2Y6 no decorrer das 5 semanas após a lesão com 6-OHDA, tratamos os animais lesionados intraestriatalmente com uma única dose do antagonista do receptor P2Y6 antes e 5 semanas depois do estabelecimento da lesão. Nossos resultados mostram, pela primeira vez, que o tratamento com MRS2578 é capaz de prevenir a morte de neurônios dopaminérgicos nesse modelo animal de doença de Parkinson, apesar de não exercer efeito neurorregenerativo quando administrado 5 semanas após a lesão. Além disso, o tratamento preventivo *in vitro* de células SH-SY5Y foi capaz de proteger os neurônios dopaminérgicos da morte induzida por 6-OHDA em uma concentração de 1 μM, menor que a utilizada *in vivo*. Quando induzida a morte com o composto MPP+, essa linhagem celular apresenta um pico de expressão do receptor P2Y6, correspondente ao aumento de citocinas pró-inflamatórias (Qian et al., 2017). Além disso, o knockdown desse receptor diminui proteínas envolvidas no estresse oxidativo (Qian et al., 2017), indicando um possível mecanismo pelo qual o composto MRS2578 possa estar protegendo a morte induzida por 6-OHDA in vitro.

Entretanto, o efeito observado *in vivo* parece estar relacionado com a modulação da ativação de células microgliais, como observado in vitro por Qian e colaboradores (2017).

Representantes do sistema imune no sistema nervoso central, as células da microglia se tornam reativas quando estimuladas por DAMPs, exacerbando a produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias, induzindo a morte neuronal e contribuindo para a expansão do dano dopaminérgico na Doença de Parkinson (Joe et al., 2018). Nos hemisférios lesionados com 6-OHDA dos animais sem tratamento, pudemos observar células microgliais reativas na região da substância negra, mas não na região do estriado. O resultado observado pode ser um reflexo da localização e orientação dos neurônios afetados no modelo animal por lesão com 6-OHDA, uma vez que os corpos celulares dos neurônios dopaminérgicos da via nigroestriatal estão presentes na região da substância negra e somente suas ramificações estão presentes no estriado. Além disso, a região da substância negra possui uma alta densidade de células microgliais e portanto é altamente susceptível a exacerbação de processos inflamatórios e consequentemente sensível a indução de neurotoxicidade (Kim et al., 2000).

A liberação de ATP e ativação de receptores purinérgicos parece disparar respostas inflamatórias com recrutamento e ativação da microglia residente, exacerbando a secreção de citocinas pró-inflamatórias e contribuindo para o aumento do dano neuronal (Fuxe et al., 2008), uma vez que o antagonismo de receptores P2X7 e P2Y6 exercem efeito neuroprotetor acompanhado de inibição de células microgliais. Em um primeiro momento, a ativação microglial com fenótipo conhecido como M2 está envolvida em processos de reparo e defesa do sistema imune, desencadeando mecanismos de proteção contra estresse oxidativo e

fagocitose de fragmentos celulares (Tang e Le, 2016). Entretanto, a liberação sustentada de nucleotídeos e nucleosídeos decorrente da morte celular, como ATP e UDP (agonistas de receptores P2X7 e P2Y6, respectivamente), induz a transição microglial para o fenótipo M1, que exacerbam processos pró-apoptóticos que envolvem a produção de ROS, citocinas e de prostaglandinas pró-inflamatórias (Zhang et al., 2005). Resultados da literatura mostram que o antagonismo do receptor P2X7 induz neuroproteção associada a redução da atividade microglial e da resposta inflamatória (Durrenberger et al., 2012).

A conexão entre os receptores purinérgicos e a ativação microglial em processos neuroinflamatórios tem sido amplamente estudada. Sabe-se que o ATP liberado em processos neurodegenerativos atua como quimiotáxico, induzindo a ativação de receptores P2Y12 microgliais e sua migração para o sítio da lesão (Inoue et al., 2007). Com relação ao receptor P2Y6, foi observado o aumento de sua expressão, cuja ativação por UDP liberado por células em degeneração induz fagocitose microglial dependente da concentração do nucleotídeo (Inoue et al., 2007). Além disso, o UDP liberado e ligação ao receptor P2Y6 também ativa cascatas de sinalização que culminam na liberação de óxido nítrico e apoptose de astrócitos (Quintas et al., 2014).

Recentemente foi observada a presença de células microgliais exercendo o processo de fagoptose, onde células microgliais induzem a morte de neurônios viáveis por fagocitose, em condições neuroinflamatórias (Brown e Neher, 2012). Em modelo murino de lesão com 6-OHDA, foi constatada a presença de células microgliais reativas que antecedem a perda neuronal e fagocitam precocemente neurônios dopaminérgicos (Marinova-Mutafchieva et al., 2009). Em cultura de neurônios e células gliais derivadas de cerebelo de rato, o uso do antagonista de

receptores P2Y6, MRS2578, foi capaz de atrasar a morte neuronal induzida por LPS possivelmente por modular negativamente a fagoptose microglial (Neher et al., 2014).

Esses dados encontrados na literatura permitem a especulação do possível efeito que o tratamento preventivo com o inibidor do receptor P2Y6 exerce no modelo animal de doença de Parkinson utilizado neste trabalho. A contenção da morte de neurônios dopaminérgicos observada com o tratamento preventivo com MRS2578 pode estar relacionada com a inibição da fagoptose microglial e consequente diminuição da morte de neurônios viáveis, mostrando pela primeira vez o possível uso do antagonismo do receptor P2Y6 como terapia antiparkinsoniana.

Levando em consideração o efeito imunomodulador do tratamento com BBG, analisamos o efeito do antagonismo do receptor P2X7 em combinação com transplante celular de células-tronco embrionárias diferenciadas em células progenitoras neurais. Devido a sua capacidade de se diferenciar em todos os 200 tipos celulares do organismo adulto, as células-tronco embrionárias possuem interessante aplicabilidade terapêutica. De fato, a terapia de transplante de células-tronco tem mostrado resultados promissores em modelos animais da doença de Parkinson (Bjorklund et al., 2002; Rodríguez-Gómez et al., 2007), porém a elucidação dos mecanismos moleculares envolvidos ainda precisa ser explorada para que a integração e diferenciação correta após o transplante possa ser modulada.

Estudos de transplante celular com diferentes linhagens e em diferentes estágios de diferenciação têm sido conduzidos. O transplante com neurônios dopaminérgicos em humanos demonstrou que, em curto prazo, induz o aparecimento de efeitos

adversos como discinesia (Freed et al., 2001; Olanow et al., 2003), porém após alguns anos uma melhora considerável na sintomatologia pode ser observada (Ma et al., 2010). Em roedores, células precursoras neurais transplantadas obtiveram maior sucesso na reversão do modelo de Doença de Parkinson em relação ao transplante com células precursoras dopaminérgicas, possivelmente por liberar fatores antiinflamatórios (Kim et al., 2018), corroborando a escolha do tipo celular utilizado no trabalho aqui apresentado. Outros trabalhos com transplante de células precursoras neurais utilizaram co-tratamento com fatores que induzem a diferenciação neuronal, como SHH e FGF-8 (Hagell e Brundin, 2001), ou que facilitem a produção de dopamina, como tirosina hidroxilase (Kim et al., 2006; Ryu et al., 2005). Assim, células-tronco embrionárias E14Tg2a diferenciadas em células progenitoras neurais foram injetadas no estriado de animais lesionados com 6-OHDA e tratados ou não com BBG 50 mg/kg. Observamos durante 12 semanas após o transplante que os animais tratados somente com BBG apresentaram uma reversão maior do comportamento hemiparkinsoniano do que quando tratados e transplantados com essas células. Além disso, o transplante celular *per se* não apresentou efeito antiparkinsoniano.

O uso do antagonista de P2X7 poderia auxiliar no transplante não somente por imunomodulação como também por indução de diferenciação, uma vez que a expressão do receptor P2X7 é suprimida durante a diferenciação de células tronco embrionárias em neurônios in vitro (Glaser et al., 2014b). Concluímos que, apesar do tratamento com BBG ser capaz de diminuir o ambiente inflamatório e favorecer o efeito do transplante, a terapia celular com células progenitoras neurais possivelmente exacerba o ambiente inflamatório e diminui a eficiência do tratamento em comparação com somente BBG.

7. Conclusões

Os resultados aqui apresentados trazem indícios da importância da modulação de receptores purinérgicos no estudo da Doença de Parkinson. A lesão induzida por 6-OHDA, modelo animal de Doença de Parkinson amplamente utilizado na pesquisa, altera a expressão de diferentes receptores purinérgicos até 5 semanas após a lesão e a antagonização dos receptores P2X7 e P2Y6 apresentam efeito antiparkinsoniano. Enquanto o antagonismo dos receptores P2X7 exerce efeito neurorregenerativo em animais com a lesão da via nigroestriatal já estabelecida, o antagonismo dos receptores P2Y6 previamente à lesão exerce efeito neuroprotetor por prevenir a morte induzida, como observado pela marcação de neurônios dopaminérgicos. Além disso, por alterarem o estado morfológico das células microgliais, esses tratamentos parecem exercer imunomodulação, indicando que a lesão com 6-OHDA induz efeito pró-inflamatório dependente da ativação de receptores P2X7 e P2Y6 (figura 23).

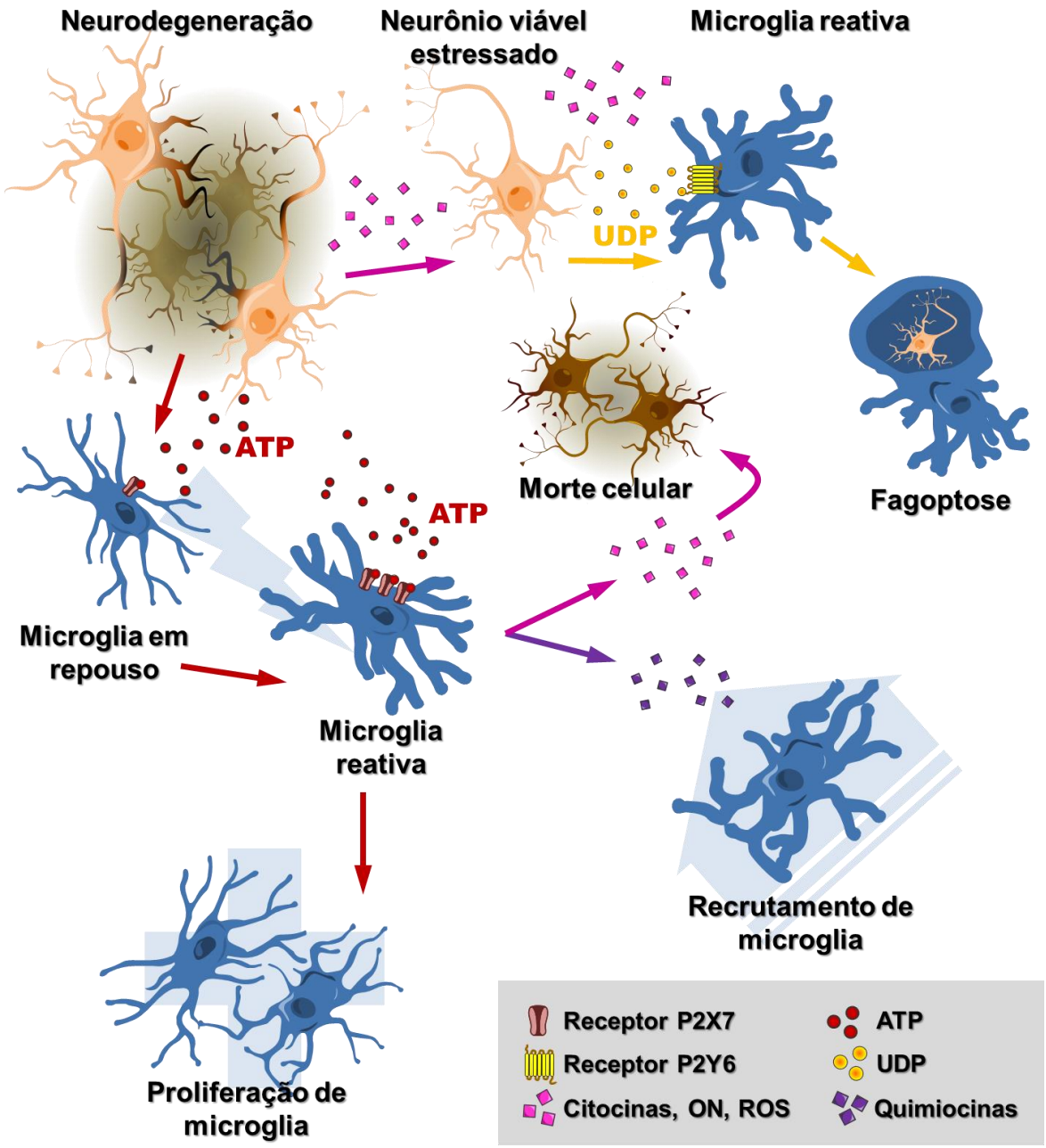


Figura 23.: Possíveis mecanismos neuroinflamatórios modulados por receptores P2X7 e P2Y6 na lesão com 6-OHDA. A neurodegeneração induzida por 6-OHDA induz a liberação excessiva de ATP, que atua em receptores purinérgicos P2X7 microgliais e tornam essas células reativas. A ativação exacerbada do receptor P2X7 induz a proliferação de células da microglia e liberação de citocinas, óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio que culminam em aumento da morte celular. Além disso, induz a liberação de quimiocinas que recrutam microglia residente. Além de ATP, as células do processo de neurodegeneração liberam óxido nítrico e citocinas que estressam neurônios viáveis. Estes por sua vez liberam UDP que ativa receptores P2Y6 de células microgliais reativas e induzem o processo de fagoptose.

O antagonismo do receptor P2X7 com o composto BBG, corante alimentício utilizado na indústria em diversos produtos, exerce efeito antiparkinsoniano comportamental e neurorregeneração dopaminérgica da via nigroestriatal. Pela análise de diferentes tipos celulares neurais, podemos inferir que esse efeito deve-se à modulação do ambiente inflamatório, que possibilita e favorece a repopulação neuronal. Uma vez que a regulação negativa dos receptores P2X7 é essencial para a diferenciação neuronal in vitro, o tratamento com BBG pode estar atuando também na indução de diferenciação dopaminérgica de células das zonas neurogênicas e sua migração para as zonas lesionadas.

Já o antagonismo dos receptores purinérgicos P2Y6 com a droga MRS2578, que apresenta efeito somente no protocolo de prevenção, pode estar contendo o efeito inflamatório induzido pela 6-OHDA e impedindo a expansão da lesão por fagoptose microglial, processo onde células da microglia reativas fagocitam células viáveis.

Por fim, o uso concomitante de BBG com transplante de células precursoras neurais não foi tão eficaz em reverter o comportamento rotacional em comparação com o tratamento somente com BBG, indicando que o transplante possa estar desencadeando processos pró-apoptóticos e pró-inflamatórios que atrapalham o efeito neurorregenerativo do BBG.

De maneira geral, a modulação dos receptores purinérgicos se mostrou uma ferramenta promissora na pesquisa de cura e compreensão das bases moleculares da Doença de Parkinson.

8. Perspectivas

Os resultados promissores aqui apresentados levantam pontos interessantes a serem explorados. Como perspectivas, o laboratório pretende:

- Analisar o efeito direto do tratamento com BBG em células progenitoras neurais das zonas neurogênicas do cérebro de animais lesionados com 6-OHDA através de ensaio com BrdU;

- Realizar ensaios pré-clínicos para validação do uso de BBG no tratamento da Doença de Parkinson;

- Verificar os mecanismos moleculares envolvidos no co-tratamento de BBG e teraia celular, bem como o efeito do tratamento prévio *in vitro* com BBG das células para transplante;

- Analisar o efeito do antagonismo dos receptores P2Y6 no processo de fagoptose microglial através de ensaios *in vitro;*

- Avaliar o efeito dos tratamentos com BBG ou MRS2578 em animais lesionados com 6-OHDA submetidos a diferentes testes comportamentais de memória e desempenho motor;

- Investigar os possíveis efeitos neuroprotetores, neurorregenerativos e neuromoduladores dos tratamentos com BBG ou MRS2578 em modelo animal de Doença de Parkinson induzido pela injeção de α-sinucleína.

9. Referências Bibliográficas

Alvarez-Fischer, D., Henze, C., Strenzke, C., Westrich, J., Ferger, B., Höglinger, G. U., et al. (2008). Characterization of the striatal 6-OHDA model of Parkinson's disease in wild type and α-synuclein-deleted mice. *Exp. Neurol.* 210, 182–193. doi:10.1016/j.expneurol.2007.10.012.

Amadio, S., Montilli, C., Picconi, B., Calabresi, P., and Volonté, C. (2007). Mapping P2X and P2Y receptor proteins in striatum and substantia nigra: An immunohistological study. *Purinergic Signal.* 3, 389–98. doi:10.1007/s11302-007-9069-8.

Baker, S. A., Baker, K. A., and Hagg, T. (2004). Dopaminergic nigrostriatal projections regulate neural precursor proliferation in the adult mouse subventricular zone. *Eur. J. Neurosci.* 20, 575–579. doi:10.1111/j.1460-9568.2004.03486.x.

Björklund, A., and Dunnett, S. B. (2007). Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends Neurosci.* 30, 194–202. doi:10.1016/j.tins.2007.03.006.

Bjorklund, L. M., Sanchez-Pernaute, R., Chung, S., Andersson, T., Chen, I. Y. C., McNaught, K. S. P., et al. (2002). Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 2344–2349. doi:10.1073/pnas.022438099.

Brown, G. C., and Neher, J. J. (2010). Inflammatory Neurodegeneration and Mechanisms of Microglial Killing of Neurons. *Mol. Neurobiol.* 41, 242–247. doi:10.1007/s12035-010-8105-9.

Brown, G. C., and Neher, J. J. (2012). Eaten alive! Cell death by primary phagocytosis: “phagoptosis.” *Trends Biochem. Sci.* 37, 325–332. doi:10.1016/j.tibs.2012.05.002.

Burnstock, G. (1972). Purinergic nerves. *Pharmacol. Rev.* 24, 509–81. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4404211 [Accessed September 3, 2017].

Burnstock, G. (2007a). Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol. Rev.* 87, 659–797. doi:10.1152/physrev.00043.2006.

Burnstock, G. (2007b). Purine and pyrimidine receptors. *Cell. Mol. Life Sci.* 64, 1471–1483. doi:10.1007/s00018-007-6497-0.

Burnstock, G., and Kennedy, C. (1985). Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor? *Gen. Pharmacol.* 16, 433–40. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2996968 [Accessed May 30, 2018].

Burnstock, G., and Knight, G. E. (2004). Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. *Int. Rev. Cytol.* doi:10.1016/S0074-7696(04)40002-3.

Cannon, J. R., and Greenamyre, J. T. (2009). NeuN is not a reliable marker of dopamine neurons in rat substantia nigra. *Neurosci. Lett.* 464, 14–17. doi:10.1016/j.neulet.2009.08.023.

Carmo, M. R. S., Menezes, A. P. F., Nunes, A. C. L., Pliássova, A., Rolo, A. P., Palmeira, C. M., et al. (2014). The P2X7 receptor antagonist Brilliant Blue G attenuates contralateral rotations in a rat model of Parkinsonism through a combined control of synaptotoxicity, neurotoxicity and gliosis.

Neuropharmacology 81, 142–52. doi:10.1016/j.neuropharm.2014.01.045.

Cheung, K. K., Chan, W. Y., and Burnstock, G. (2005). Expression of P2X purinoceptors during rat brain development and their inhibitory role on motor axon outgrowth in neural tube explant cultures. *Neuroscience* 133, 937–945. doi:10.1016/j.neuroscience.2005.03.032.

Choi, Y. M., Jang, J. Y., Jang, M., Kim, S. H., Kang, Y. K., Cho, H., et al. (2009). Modulation of firing activity by ATP in dopamine neurons of the rat substantia nigra pars compacta. *Neuroscience* 160, 587–95. doi:10.1016/j.neuroscience.2009.02.067.

da Silva, R. L., Resende, R. R., and Ulrich, H. (2007). Genomic Physiology: Alternative splicing of P2X6 receptors in developing mouse brain and during in vitro neuronal differentiation. *Exp. Physiol.* 92, 139–145. doi:10.1113/expphysiol.2006.921304.

Dankova, J., Bédard, P., Langelier, P., and Poirier, L. J. (1978). Dopaminergic agents and circling behaviour. *Gen. Pharmacol. Vasc. Syst.* 9, 295–302. doi:10.1016/0306-3623(78)90064-2.

Dauer, W., and Przedborski, S. (2003). Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* 39, 889–909. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12971891 [Accessed February 8, 2018].

Davalos, D., Grutzendler, J., Yang, G., Kim, J. V, Zuo, Y., Jung, S., et al. (2005). ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat. Neurosci.* 8, 752–758. doi:10.1038/nn1472.

de Lau, L. M., and Breteler, M. M. (2006). Epidemiology of Parkinson's disease.

Lancet Neurol. 5, 525–535. doi:10.1016/S1474-4422(06)70471-9.

Deumens, R., Blokland, A., and Prickaerts, J. (2002). Modeling Parkinson's disease in rats: an evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. *Exp. Neurol.* 175, 303–17. doi:10.1006/exnr.2002.7891.

Di Virgilio, F. (2007). Purinergic signalling in the immune system. A brief update. *Purinergic Signal.* 3, 1–3. doi:10.1007/s11302-006-9048-5.

Di Virgilio, F., Schmalzing, G., and Markwardt, F. (2018). The Elusive P2X7 Macropore. *Trends Cell Biol.* 28, 392–404. doi:10.1016/j.tcb.2018.01.005.

Durrenberger, P. F., Grünblatt, E., Fernando, F. S., Monoranu, C. M., Evans, J., Riederer, P., et al. (2012). Inflammatory Pathways in Parkinson's Disease; A BNE Microarray Study. *Parkinsons. Dis.* 2012, 1–16. doi:10.1155/2012/214714.

Erb, L., and Weisman, G. A. (2012). Coupling of P2Y receptors to G proteins and other signaling pathways. *Wiley Interdiscip. Rev. Membr. Transp. Signal.* 1, 789–803. doi:10.1002/wmts.62.

Ernst, A., Alkass, K., Bernard, S., Salehpour, M., Perl, S., Tisdale, J., et al. (2014). Neurogenesis in the Striatum of the Adult Human Brain. *Cell* 156, 1072–1083. doi:10.1016/j.cell.2014.01.044.

Farooq, R. K., Tanti, A., Ainouche, S., Roger, S., Belzung, C., and Camus, V. (2018). A P2X7 receptor antagonist reverses behavioural alterations, microglial activation and neuroendocrine dysregulation in an unpredictable chronic mild stress (UCMS) model of depression in mice. *Psychoneuroendocrinology* 97, 120–130. doi:10.1016/j.psyneuen.2018.07.016.

Ferrazoli, E. G., de Souza, H. D. N., Nascimento, I. C., Oliveira-Giacomelli, Á., Schwindt, T. T., Britto, L. R., et al. (2017). Brilliant Blue G, But Not Fenofibrate, Treatment Reverts Hemiparkinsonian Behavior and Restores Dopamine Levels in an Animal Model of Parkinson's Disease. *Cell Transplant.* 26, 669–677. doi:10.3727/096368917X695227.

Fortuna, J. T. S., Gralle, M., Beckman, D., Neves, F. S., Diniz, L. P., Frost, P. S., et al. (2017). Brain infusion of α-synuclein oligomers induces motor and non-motor Parkinson's disease-like symptoms in mice. *Behav. Brain Res.* 333, 150–160. doi:10.1016/j.bbr.2017.06.047.

Freed, C. R., Greene, P. E., Breeze, R. E., Tsai, W.-Y., DuMouchel, W., Kao, R., et al. (2001). Transplantation of Embryonic Dopamine Neurons for Severe Parkinson's Disease. *N. Engl. J. Med.* 344, 710–719. doi:10.1056/NEJM200103083441002.

Fuxe, K. G., Tarakanov, A. O., Goncharova, L. B., and Agnati, L. F. (2008). A new road to neuroinflammation in Parkinson's disease? *Brain Res. Rev.* 58, 453–8. doi:10.1016/j.brainresrev.2008.04.003.

Gan, M., Moussaud, S., Jiang, P., and McLean, P. J. (2015). Extracellular ATP induces intracellular alpha-synuclein accumulation via P2X1 receptor-mediated lysosomal dysfunction. *Neurobiol. Aging* 36, 1209–1220. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2014.10.037.

Genzen, J. R., Platel, J.-C., Rubio, M. E., and Bordey, A. (2009). Ependymal cells along the lateral ventricle express functional P2X(7) receptors. *Purinergic Signal.* 5, 299–307. doi:10.1007/s11302-009-9143-5.

Glaser, T., de Oliveira, S. L. B., Cheffer, A., Beco, R., Martins, P., Fornazari, M., et al. (2014a). Modulation of Mouse Embryonic Stem Cell Proliferation and Neural Differentiation by the P2X7 Receptor. *PLoS One* 9, e96281. doi:10.1371/journal.pone.0096281.

Glaser, T., de Oliveira, S. L. B., Cheffer, A., Beco, R., Martins, P., Fornazari, M., et al. (2014b). Modulation of mouse embryonic stem cell proliferation and neural differentiation by the P2X7 receptor. *PLoS One* 9, e96281. doi:10.1371/journal.pone.0096281.

Gu, B. J., Zhang, W., Worthington, R. A., Sluyter, R., Dao-Ung, P., Petrou, S., et al. (2001). A Glu-496 to Ala polymorphism leads to loss of function of the human P2X7 receptor. *J. Biol. Chem.* 276, 11135–42. doi:10.1074/jbc.M010353200.

Gusel'nikova, V. V, and Korzhevskiy, D. E. (2015). NeuN as a neuronal nuclear antigen and neuron differentiation marker. *Acta Naturae* 7, 42–47. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26085943 [Accessed July 9, 2018].

Gyoneva, S., Shapiro, L., Lazo, C., Garnier-Amblard, E., Smith, Y., Miller, G. W., et al. (2014). Adenosine A2A receptor antagonism reverses inflammation-induced impairment of microglial process extension in a model of Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.* 67, 191–202. doi:10.1016/j.nbd.2014.03.004.

Hagberg, H., Mallard, C., Rousset, C. I., and Xiaoyang Wang, X. (2009). Apoptotic mechanisms in the immature brain: involvement of mitochondria. *J. Child Neurol.* 24, 1141–6. doi:10.1177/0883073809338212.

Hagell, P., and Brundin, P. (2001). Cell survival and clinical outcome following intrastriatal transplantation in Parkinson disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*

60, 741–52. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11487048 [Accessed July 30, 2018].

Hayashi, Y., Jinnou, H., Sawamoto, K., and Hitoshi, S. (2018). Adult neurogenesis and its role in brain injury and psychiatric diseases. *J. Neurochem.* doi:10.1111/jnc.14557.

Hedlund, E., Pruszak, J., Ferree, A., Viñuela, A., Hong, S., Isacson, O., et al. (2007). Selection of Embryonic Stem Cell-Derived Enhanced Green Fluorescent Protein-Positive Dopamine Neurons Using the Tyrosine Hydroxylase Promoter Is Confounded by Reporter Gene Expression in Immature Cell Populations. *Stem Cells* 25, 1126–1135. doi:10.1634/stemcells.2006-0540.

Hoang, Q. Q. (2014). Pathway for Parkinson disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 2402–3. doi:10.1073/pnas.1324284111.

Hogg, R. C., Chipperfield, H., Whyte, K. A., Stafford, M. R., Hansen, M. A., Cool, S. M., et al. (2004). Functional maturation of isolated neural progenitor cells from the adult rat hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* 19, 2410–2420. doi:10.1111/j.0953-816X.2004.03346.x.

Hornykiewicz, O. (1966). Dopamine (3-hydroxytyramine) and brain function. *Pharmacol. Rev.* 18, 925–64. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5328389 [Accessed February 17, 2018].

Hornykiewicz, O. (2002). L-DOPA: From a biologically inactive amino acid to a successful therapeutic agent. *Amino Acids* 23, 65–70. doi:10.1007/s00726-001-0111-9.

Hughes, A. J., Daniel, S. E., Kilford, L., and Lees, A. J. (1992). Accuracy of clinical

diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 55, 181–4. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1564476 [Accessed February 16, 2018].

Inoue, K., Hosoi, J., Denda, M., Palmer, K., Qiao, X., Fan, X., et al. (2007). Extracellular ATP has stimulatory effects on the expression and release of IL-6 via purinergic receptors in normal human epidermal keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 127, 362–71. doi:10.1038/sj.jid.5700526.

Jiang, T., Hoekstra, J., Heng, X., Kang, W., Ding, J., Liu, J., et al. (2015). P2X7 receptor is critical in α-synuclein–mediated microglial NADPH oxidase activation. *Neurobiol. Aging* 36, 2304–2318. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2015.03.015.

Jo, S., and Bean, B. P. (2011). Inhibition of neuronal voltage-gated sodium channels by brilliant blue G. *Mol. Pharmacol.* 80, 247–57. doi:10.1124/mol.110.070276.

Joe, E.-H., Choi, D.-J., An, J., Eun, J.-H., Jou, I., and Park, S. (2018). Astrocytes, Microglia, and Parkinson's Disease. *Exp. Neurobiol.* 27, 77–87. doi:10.5607/en.2018.27.2.77.

Kapoor, R. (2008). Sodium channel blockers and neuroprotection in multiple sclerosis using lamotrigine. *J. Neurol. Sci.* 274, 54–56. doi:10.1016/j.jns.2008.03.019.

Kempster, P. A., Hurwitz, B., and Lees, A. J. (2007). A new look at James Parkinson's Essay on the Shaking Palsy. *Neurology* 69, 482–485. doi:10.1212/01.wnl.0000266639.50620.d1.

Kigerl, K. A., de Rivero Vaccari, J. P., Dietrich, W. D., Popovich, P. G., and Keane, R. W. (2014). Pattern recognition receptors and central nervous system repair. *Exp.*

Neurol. 258, 5–16. doi:10.1016/j.expneurol.2014.01.001.

Kim, B., Jeong, H. -k., Kim, J. -h., Lee, S. Y., Jou, I., and Joe, E. -h. (2011). Uridine 5'-Diphosphate Induces Chemokine Expression in Microglia and Astrocytes through Activation of the P2Y6 Receptor. *J. Immunol.* 186, 3701–3709. doi:10.4049/jimmunol.1000212.

Kim, H. W., Lee, H.-S., Kang, J. M., Bae, S.-H., Kim, C., Lee, S.-H., et al. (2018). Dual Effects of Human Placenta-Derived Neural Cells on Neuroprotection and the Inhibition of Neuroinflammation in a Rodent Model of Parkinson's Disease. *Cell Transplant.* 27, 814–830. doi:10.1177/0963689718766324.

Kim, S. U., Park, I. H., Kim, T. H., Kim, K. S., Choi, H. B., Hong, S. H., et al. (2006). Brain transplantation of human neural stem cells transduced with tyrosine hydroxylase and GTP cyclohydrolase 1 provides functional improvement in animal models of Parkinson disease. *Neuropathology* 26, 129–40. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16708545 [Accessed July 30, 2018].

Kim, W. G., Mohney, R. P., Wilson, B., Jeohn, G. H., Liu, B., and Hong, J. S. (2000). Regional difference in susceptibility to lipopolysaccharide-induced neurotoxicity in the rat brain: role of microglia. *J. Neurosci.* 20, 6309–16. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10934283 [Accessed June 28, 2018].

Laasberg, T. (1990). Ca2(+)-mobilizing receptors of gastrulating chick embryo. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 97, 9–12. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1981347 [Accessed July 5, 2018].

Lang, A. E. (2009). When and how should treatment be started in Parkinson disease? *Neurology* 72, S39–S43. doi:10.1212/WNL.0b013e318198e177.

Lee, Y., Kim, M.-S., and Lee, J. (2017). Neuroprotective strategies to prevent and treat Parkinson's disease based on its pathophysiological mechanism. *Arch. Pharm. Res.* 40, 1117–1128. doi:10.1007/s12272-017-0960-8.

Li, X., Chen, W., Sheng, J., Cao, D., and Wang, W. (2014). Interleukin-6 inhibits voltage-gated sodium channel activity of cultured rat spinal cord neurons. *Acta Neuropsychiatr.* 26, 170–177. doi:10.1017/neu.2013.49.

Li, Y., Liu, W., Oo, T. F., Wang, L., Tang, Y., Jackson-Lewis, V., et al. (2009). Mutant LRRK2 R1441G BAC transgenic mice recapitulate cardinal features of Parkinson's disease. *Nat. Neurosci.* 12, 826–828. doi:10.1038/nn.2349.

Lin, J. H.-C., Takano, T., Arcuino, G., Wang, X., Hu, F., Darzynkiewicz, Z., et al. (2007). Purinergic signaling regulates neural progenitor cell expansion and neurogenesis. *Dev. Biol.* 302, 356–66. doi:10.1016/j.ydbio.2006.09.017.

Liu, H., Han, X., Li, Y., Zou, H., and Xie, A. (2013). Association of P2X7 receptor gene polymorphisms with sporadic Parkinson's disease in a Han Chinese population. *Neurosci. Lett.* 546, 42–45. doi:10.1016/j.neulet.2013.04.049.

Ma, Y., Tang, C., Chaly, T., Greene, P., Breeze, R., Fahn, S., et al. (2010). Dopamine Cell Implantation in Parkinson's Disease: Long-Term Clinical and 18F-FDOPA PET Outcomes. *J. Nucl. Med.* 51, 7–15. doi:10.2967/jnumed.109.066811.

Marcellino, D., Suárez-Boomgaard, D., Sánchez-Reina, M. D., Aguirre, J. A., Yoshitake, T., Yoshitake, S., et al. (2010). On the role of P2X7 receptors in dopamine nerve cell degeneration in a rat model of Parkinson's disease: studies with the P2X7 receptor antagonist A-438079. *J. Neural Transm.* 117, 681–687.

doi:10.1007/s00702-010-0400-0.

Marinova-Mutafchieva, L., Sadeghian, M., Broom, L., Davis, J. B., Medhurst, A. D., and Dexter, D. T. (2009). Relationship between microglial activation and dopaminergic neuronal loss in the substantia nigra: a time course study in a 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 110, 966–975. doi:10.1111/j.1471-4159.2009.06189.x.

Masliah, E., Rockenstein, E., Veinbergs, I., Mallory, M., Hashimoto, M., Takeda, A., et al. (2000). Dopaminergic loss and inclusion body formation in alpha-synuclein mice: implications for neurodegenerative disorders. *Science* 287, 1265–9. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10678833 [Accessed July 26, 2018].

Messemer, N., Kunert, C., Grohmann, M., Sobottka, H., Nieber, K., Zimmermann, H., et al. (2013). P2X7 receptors at adult neural progenitor cells of the mouse subventricular zone. *Neuropharmacology* 73, 122–137. doi:10.1016/j.neuropharm.2013.05.017.

Monif, M., Burnstock, G., and Williams, D. A. (2010). Microglia: Proliferation and activation driven by the P2X7 receptor. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 42, 1753–1756. doi:10.1016/j.biocel.2010.06.021.

Morente, V., Pérez-Sen, R., Ortega, F., Huerta-Cepas, J., Delicado, E. G., and Miras-Portugal, M. T. (2014). Neuroprotection elicited by P2Y13 receptors against genotoxic stress by inducing DUSP2 expression and MAPK signaling recovery. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1843, 1886–1898. doi:10.1016/j.bbamcr.2014.05.004.

Moustafa, A. A., and Poletti, M. (2013). Neural and behavioral substrates of subtypes of Parkinson's disease. *Front. Syst. Neurosci.* 7, 117. doi:10.3389/fnsys.2013.00117.

Neher, J. J., Neniskyte, U., Hornik, T., and Brown, G. C. (2014). Inhibition of UDP/P2Y6 purinergic signaling prevents phagocytosis of viable neurons by activated microglia in vitro and in vivo. *Glia* 62, 1463–75. doi:10.1002/glia.22693.

North, R. A. (2002). Molecular Physiology of P2X Receptors. *Physiol. Rev.* 82, 1013–1067. doi:10.1152/physrev.00015.2002.

Olanow, C. W., Goetz, C. G., Kordower, J. H., Stoessl, A. J., Sossi, V., Brin, M. F., et al. (2003). A double-blind controlled trial of bilateral fetal nigral transplantation in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 54, 403–414. doi:10.1002/ana.10720.

Olanow, C. W., Stern, M. B., and Sethi, K. (2009). The scientific and clinical basis for the treatment of Parkinson disease (2009). *Neurology* 72, S1–S136. doi:10.1212/WNL.0b013e3181a1d44c.

Oliveira, Á., Illes, P., and Ulrich, H. (2016). Purinergic receptors in embryonic and adult neurogenesis. *Neuropharmacology* 104, 272–281. doi:10.1016/j.neuropharm.2015.10.008.

Parkinson, J. (2002). An Essay on the Shaking Palsy. *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* 14, 223–236. doi:10.1176/jnp.14.2.223.

Pasqualetti, G., Brooks, D. J., and Edison, P. (2015). The Role of Neuroinflammation in Dementias. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 15, 17. doi:10.1007/s11910-015-0531-7.

Paxinos, G., and Watson, C. (2013). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates : Hard Cover Edition.* Elsevier Science.

Pisanu, A., Boi, L., Mulas, G., Spiga, S., Fenu, S., and Carta, A. R. (2018). Neuroinflammation in l-DOPA-induced dyskinesia: beyond the immune function. *J. Neural Transm.* doi:10.1007/s00702-018-1874-4.

Poddar, J., Pradhan, M., Ganguly, G., and Chakrabarti, S. (2018). Biochemical deficits and cognitive decline in brain aging: Intervention by dietary supplements. *J. Chem. Neuroanat.* doi:10.1016/J.JCHEMNEU.2018.04.002.

Qian, Y., Xu, S., Yang, X., and Xiao, Q. (2017). Purinergic receptor P2Y6 contributes to 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced oxidative stress and cell death in neuronal SH-SY5Y cells. *J. Neurosci. Res.* doi:10.1002/jnr.24119.

Quintas, C., Pinho, D., Pereira, C., Saraiva, L., Gonçalves, J., and Queiroz, G. (2014). Microglia P2Y6 receptors mediate nitric oxide release and astrocyte apoptosis. *J. Neuroinflammation* 11, 141. doi:10.1186/s12974-014-0141-3.

Rama Rao, K. V, and Kielian, T. (2015). Neuron-astrocyte interactions in neurodegenerative diseases: Role of neuroinflammation. *Clin. Exp. Neuroimmunol.* 6, 245–263. doi:10.1111/cen3.12237.

Ramzan, R., Weber, P., Linne, U., and Vogt, S. (2013). GAPDH: the missing link between glycolysis and mitochondrial oxidative phosphorylation? *Biochem. Soc. Trans.* 41, 1294–1297. doi:10.1042/BST20130067.

Ransohoff, R. M., Schafer, D., Vincent, A., Blachère, N. E., and Bar-Or, A. (2015). Neuroinflammation: Ways in Which the Immune System Affects the Brain. *Neurotherapeutics* 12, 896–909. doi:10.1007/s13311-015-0385-3.

Resende, R. R., Majumder, P., Gomes, K. N., Britto, L. R. G., and Ulrich, H. (2007). P19 embryonal carcinoma cells as in vitro model for studying purinergic receptor expression and modulation of N-methyl-d-aspartate–glutamate and acetylcholine receptors during neuronal differentiation. *Neuroscience* 146, 1169–1181. doi:10.1016/j.neuroscience.2007.02.041.

Rodríguez-Gómez, J. A., Lu, J.-Q., Velasco, I., Rivera, S., Zoghbi, S. S., Liow, J.-S., et al. (2007). Persistent Dopamine Functions of Neurons Derived from Embryonic Stem Cells in a Rodent Model of Parkinson Disease. *Stem Cells* 25, 918–928. doi:10.1634/stemcells.2006-0386.

Ryu, M. Y., Lee, M. A., Ahn, Y. H., Kim, K. S., Yoon, S. H., Snyder, E. Y., et al. (2005). Brain transplantation of neural stem cells cotransduced with tyrosine hydroxylase and GTP cyclohydrolase 1 in Parkinsonian rats. *Cell Transplant.* 14, 193–202. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15929554 [Accessed July 30, 2018].

Schmittgen, T. D., and Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat. Protoc.* 3, 1101–1108. doi:10.1038/nprot.2008.73.

Schulz, J. B., and Falkenburger, B. H. (2004). Neuronal pathology in Parkinson?s disease. *Cell Tissue Res.* 318, 135–147. doi:10.1007/s00441-004-0954-y.

Schwarting, R. K., and Huston, J. P. (1996). The unilateral 6-hydroxydopamine lesion model in behavioral brain research. Analysis of functional deficits, recovery and treatments. *Prog. Neurobiol.* 50, 275–331. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8971983 [Accessed July 5, 2018].

Simola, N., Morelli, M., and Carta, A. R. (2007). The 6-hydroxydopamine model of

Parkinson's disease. *Neurotox. Res.* 11, 151–67. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17449457 [Accessed August 15, 2017].

Stefani, J., Tschesnokowa, O., Parrilla, M., Robaye, B., Boeynaems, J.-M., Acker-Palmer, A., et al. (2018). Disruption of the Microglial ADP Receptor P2Y13 Enhances Adult Hippocampal Neurogenesis. *Front. Cell. Neurosci.* 12. doi:10.3389/fncel.2018.00134.

Stys, P. K., Waxman, S. G., and Ransom, B. R. (1992). Ionic mechanisms of anoxic injury in mammalian CNS white matter: role of Na+ channels and Na(+)-Ca2+ exchanger. *J. Neurosci.* 12, 430–9. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1311030 [Accessed July 9, 2018].

Tang, Y., and Le, W. (2016). Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Mol. Neurobiol.* 53, 1181–1194. doi:10.1007/s12035-014-9070-5.

Tarze, A., Deniaud, A., Le Bras, M., Maillier, E., Molle, D., Larochette, N., et al. (2007). GAPDH, a novel regulator of the pro-apoptotic mitochondrial membrane permeabilization. *Oncogene* 26, 2606–2620. doi:10.1038/sj.onc.1210074.

Thenganatt, M. A., and Jankovic, J. (2014). Parkinson Disease Subtypes. *JAMA Neurol.* 71, 499. doi:10.1001/jamaneurol.2013.6233.

Verleye, M., Buttigieg, D., and Steinschneider, R. (2016). Neuroprotective activity of stiripentol with a possible involvement of voltage-dependent calcium and sodium channels. *J. Neurosci. Res.* 94, 179–189. doi:10.1002/jnr.23688.

Wilkaniec, A., Gąssowska, M., Czapski, G. A., Cieślik, M., Sulkowski, G., and Adamczyk, A. (2017). P2X7 receptor-pannexin 1 interaction mediates

extracellular alpha-synuclein-induced ATP release in neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Purinergic Signal.* 13, 347–361. doi:10.1007/s11302-017-9567-2.

Wilms, H., Rosenstiel, P., Sievers, J., Deuschl, G., Zecca, L., and Lucius, R. (2003). Activation of microglia by human neuromelanin is NF-kappaB dependent and involves p38 mitogen-activated protein kinase: implications for Parkinson's disease. *FASEB J.* 17, 500–502. doi:10.1096/fj.02-0314fje.

Xiao, D., Cassin, J. J., Healy, B., Burdett, T. C., Chen, J.-F., Fredholm, B. B., et al. (2011). Deletion of adenosine A1 or A2A receptors reduces l-3,4-dihydroxyphenylalanine-induced dyskinesia in a model of Parkinson's disease. *Brain Res.* 1367, 310–318. doi:10.1016/j.brainres.2010.08.099.

Yang, X., Lou, Y., Liu, G., Wang, X., Qian, Y., Ding, J., et al. (2017). Microglia P2Y6 receptor is related to Parkinson's disease through neuroinflammatory process. *J. Neuroinflammation* 14, 38. doi:10.1186/s12974-017-0795-8.

Yue, N., Huang, H., Zhu, X., Han, Q., Wang, Y., Li, B., et al. (2017). Activation of P2X7 receptor and NLRP3 inflammasome assembly in hippocampal glial cells mediates chronic stress-induced depressive-like behaviors. *J. Neuroinflammation* 14, 102. doi:10.1186/s12974-017-0865-y.

Zhang, W., Wang, T., Pei, Z., Miller, D. S., Wu, X., Block, M. L., et al. (2005). Aggregated α-synuclein activates microglia: a process leading to disease progression in Parkinson's disease. *FASEB J.* 19, 533–542. doi:10.1096/fj.04-2751com.

Zimmermann, H. (2006). Nucleotide signaling in nervous system development. *Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol.* 452, 573–588. doi:10.1007/s00424-006-0067-4.

8. Lista de Anexos

8.1 Súmula Curricular

8.2 Publicações

8.2.1 Artigos completos publicados em periódicos

1. **OLIVEIRA-GIACOMELLI, Á**; NAALDIJK, Y; SARDA-ARROYO, L; GONÇALVES, MCB ; CORRÊA-VELLOSO, J; PILLAT, MM ; de SOUZA, H. D. N. ; ULRICH, H. Purinergic Receptors in Neurological Diseases With Motor Symptoms: Targets for Therapy. *Frontiers in Pharmacology*, v. 9, p. 325, 2018.

2. CORRÊA-VELLOSO, JC ; GONÇALVES, MCB; NAALDIJK, Y; **OLIVEIRA-GIACOMELLI, Á**; PILLAT, MM; ULRICH, H. Pathophysiology in the comorbidity of Bipolar Disorder and Alzheimer's Disease: Pharmacological and stem cells approaches. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, v. 80, p. 34-53, 2018.

3. FERRAZOLI, E. G. ; de SOUZA, H. D. N. ; NASCIMENTO, I. C. ; **OLIVEIRA-GIACOMELLI, Á ;** SCHWINDT, T. T. ; BRITTO, L. R. ; ULRICH, H. . Brilliant Blue G, But Not Fenofibrate, Treatment Reverts Hemiparkinsonian Behavior and Restores Dopamine Levels in an Animal Model of Parkinson’s Disease. *Cell transplantation*, v. 26, p. 669-677, 2017.

4. **OLIVEIRA, Á;** ILLES, P; ULRICH, H. Purinergic receptors in embryonic and adult neurogenesis. *Neuropharmacology*, v. 104, p. 272-281, 2016.

8.2.2 Capítulos de livros publicados

1. GLASER, T; CORRÊA-VELLOSO, JC; **OLIVEIRA-GIACOMELLI, Á;** TENG, YD. ; ULRICH, H. Dopaminergic and GABAergic Neuron In Vitro Differentiation from Embryonic Stem Cells. *Neuromethods*. 1ed.: Springer New York, 2017, v. , p. 45-53.

2. **OLIVEIRA, Á**; CORRÊA-VELLOSO, JC; GLASER, T; ULRICH, H. Stem Cells: Principles and Applications. In: Henning Ulrich; Priscilla Davidson Negraes. (Org.). *Working with Stem Cells*. 1ed.: Springer International Publishing, 2016, v. 1, p. 1-13.

3. GLASER, T; **OLIVEIRA, Á** ; SARDÀ-ARROYO, L; ULRICH, H. Growth and Neurotrophic Factor Receptors in Neural Differentiation and Phenotype Specification. In: Jan Pruszak. (Org.). *Neural Surface Antigens*. 1ed.: Elsevier, 2015, v. 1, p. 77-90.

4. GLASER, T; CASTILLO, ARG; **OLIVEIRA, Á**; ULRICH, H. Intracellular Calcium Measurements for Functional Characterization of Neuronal Phenotypes. *Methods in Molecular Biology*. 1ed.: Springer New York, 2015, v. , p. 245-255.

8.2.3 Capítulos de livros aceitos para publicação

ARAUJO, F. T. ; SEMEANO, A. T. S. ; **OLIVEIRA-GIACOMELLI, Á** ; GONÇALVES, M.C.T. ; FERRARI, M. F. R. ; PEREIRA, L. V. ; ULRICH, H. . Midbrain dopaminergic neurons differentiated from human induced pluripotent stem cells. *Methods in Molecular Biology* (CLIFTON, N.J.), 2018.