

LIVIA MENDONÇA MUNHÓZ DATI

**Doença de Parkinson: possível envolvimento de receptores de cininas,
purinas e de potencial transiente.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Prof. Dr. Luiz Roberto G. Britto

Versão Original

São Paulo

2017

Resumo

DATI, L. M. M. **Doença de Parkinson: possível envolvimento de receptores de cininas, purinas e de potencial transiente.** 2017. 108f. Tese (Doutorado em Fisiologia Humana) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

A Doença de Parkinson (DP) é uma doença neurodegenerativa que envolve a perda de neurônios da substância negra, provocando bradicinesia, acinesia, tremores de repouso, rigidez muscular, alterações da marcha e instabilidade postural, além de deficiências cognitivas mais tardias. Um modelo animal muito usado para estudar a DP é o modelo que utiliza a administração direta de 6-OH-dopamina (6-OHDA) no feixe prosencefálico medial, substância negra ou no estriado, sendo esta droga responsável pela morte dos neurônios. Há evidências de que alguns sistemas de comunicação celular podem modular o desenvolvimento da DP. Por exemplo, as cininas, que agem em receptores B1 e B2, podem estar envolvidas com neuroproteção. Ainda, outros receptores que têm sido relacionados com neurodegeneração são os canais de potencial transiente (TRPs), que são divididos em subtipos, como: TRPV, TRPM, TRPC, TRPML e TRPP. Outro grupo de receptores que também podem contribuir para o desenvolvimento da DP são os receptores purinérgicos, como P2X2, P2X4, P2X7 e P2Y4. Levando em consideração os efeitos destes receptores em células do sistema nervoso, este trabalho teve como objetivo avaliar a expressão e o envolvimento destes receptores de membrana na DP induzida por 6-OHDA em camundongos da linhagem C57Bl/6 e nocautes para os receptores B2. Além disso, agonistas/ antagonistas dos receptores B2 e um antagonista de TRPM7 foram utilizados para avaliar a possível ação protetora destas moléculas na DP. Para a avaliação dos receptores de bradicinina, TRPM7 e purinérgicos no desenvolvimento do modelo da DP foram realizadas as técnicas de imunohistoquímica e *Western blotting*. Quando o modelo foi induzido no nocaute do receptor B2 foi observado uma redução de tirosina hidroxilase na substância negra. GFAP revelou redução no estriado e na substância negra. Quando utilizado antagonista foi observado redução de tirosina hidroxilase no estriado e substância negra, contudo quando utilizado agonista do receptor B2 não foi encontrado diferença entre os grupos. Em relação aos receptores purinérgicos, foi observado que o receptor P2X2, P2X7 e P2Y4 tiveram aumento da expressão na substância negra dos animais com indução do modelo de DP. O receptor P2X4, revelou aumento da expressão tanto no estriado quanto na substância negra. Quando avaliado o canal TRPM7, foi observado aumento da expressão do receptor no modelo de DP, quando utilizado o antagonista (carvacrol) foi observado que os animais com injeção de 6-OHDA, não apresentaram diferença em relação ao controle, quando verificado os níveis de caspase-3 foi encontrado semelhança entre os grupos. Com isso pode sugerir que todos os receptores avaliados podem estar envolvidos quando ocorre a lesão por 6-OHDA no encéfalo dos animais. A partir desses resultados pode-se sugerir o envolvimento desse canal no desenvolvimento da DP. Levando em consideração os efeitos encontrados utilizando o modelo da DP, em relação àqueles receptores, é possível sugerir novos alvos terapêuticos para a DP.

Palavras-chave: Doença de Parkinson. 6-OHDA. Receptor de Bradicinina (B2). Receptor Purinérgico. Canal de Potencial de Cation Transiente (TRPM7).

ABSTRACT

DATI, L. M. M. **Parkinson's disease: possible involvement of kinin, purine and transient potential receptors.** 2017. 108f. PHD. Thesis (Doctorate in Human Physiology) - Biomedical Sciences Institute, University of São Paulo, São Paulo, 2017.

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disease that involves the loss of neurons of the substantia nigra, causing bradykinesia, akinesia, rest tremors, muscle stiffness, gait changes and postural instability, as well as later cognitive deficiencies. An animal model widely used to study PD is the model that uses the direct administration of 6-OH-dopamine (6-OHDA) in the medial prosencephalic bundle, black substance or striatum, being this drug responsible for the death of the neurons. There is evidence that some cellular communication systems can modulate the development of PD. For example, kinins, which act on B1 and B2 receptors, may be involved in neuroprotection. Furthermore, other receptors that have been related to neurodegeneration are transient potential channels (TRPs), which are divided into subtypes, such as: TRPV, TRPM, TRPC, TRPML and TRPP. Another group of receptors that may also contribute to the development of PD are purinergic receptors, such as P2X2, P2X4, P2X7 and P2Y4. Taking into account the effects of these receptors on cells of the nervous system, this work aimed to evaluate the expression and the involvement of these membrane receptors in 6-OHDA induced PD in mice of the C57Bl / 6 line and knockouts for B2 receptors. In addition, B2 receptor agonists / antagonists and a TRPM7 antagonist were used to evaluate the possible protective action of these molecules in PD. For the evaluation of bradykinin, TRPM7 and purinergic receptors in the development of the PD model immunohistochemistry and Western blot techniques were performed. When the model was induced in the knockout of the B2 receptor a reduction of tyrosine hydroxylase in the substantia nigra was observed. GFAP revealed reduction in striatum and black matter. When used antagonist, reduction of tyrosine hydroxylase was observed in the striatum and substantia nigra, however when used agonist of the B2 receptor, no difference was found between the groups. Regarding the purinergic receptors, it was observed that the P2X2, P2X7 and P2Y4 receptor had increased expression in the substantia nigra of the animals with induction of the PD model. The P2X4 receptor showed increased expression in both the striatum and black matter. When the TRPM7 channel was evaluated, an increase in receptor expression was observed in the PD model. When the antagonist (carvacrol) was used, it was observed that the animals with 6-OHDA injection had no difference in relation to the control, when the levels of Caspase-3 was found similarity between the groups. This may suggest that all the receptors evaluated may be involved when the 6-OHDA injury occurs in the animals' brains. From these results, it is possible to suggest the involvement of this channel in the development of PD. Taking into account the effects found using the PD model, in relation to those receptors, it is possible to suggest new therapeutic targets for PD.

Keywords: Parkinson's Disease. 6-OHDA. Bradykinin Receptor (B2). Purinergic Receptor. Transient Cation Potential Channel (TRPM7).

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Parkinson

A Doença de Parkinson (DP) é caracterizada como um distúrbio neurodegenerativo progressivo, que apresenta sintomas motores como a bradicinesia, ou seja, lentidão dos movimentos voluntários ou dificuldade em iniciar os movimentos, redução da quantidade de movimentos, também chamada de acinesia, tremores de repouso, rigidez muscular, alterações da marcha e instabilidade postural. Os distúrbios motores são acompanhados por sintomas autonômicos, cognitivos e psiquiátricos (RAO et al., 2003; SANTANGELO et. al., 2017). Com o crescimento da população idosa, o Ministério da Saúde estima que no ano de 2014, cerca de 1% da população mundial com 65 anos ou mais, tenha a doença. No Brasil, aproximadamente 200 mil pessoas sofrem com a doença.

Primeiramente descrita por James Parkinson em 1817, a compreensão desta doença ganhou maior significado apenas em 1958, com a descrição do sistema nigro-estriatal de transmissão dopaminérgica. Estudos da década de 1960 revelaram ainda que tipicamente após a redução de 70-80% dos neurônios dopaminérgicos do estriado, os sintomas da patologia são detectados (RUBERG et al., 1995). A partir de então, um precursor ativo da dopamina, a L-dihidroifenilalanina (L-DOPA ou levodopa) passou a ser empregado no tratamento da DP. Com este tratamento foi observada uma melhora significativa no quadro motor. Por outro lado, o uso crônico da levopoda está relacionado com movimentos anormais, como a discinesia (OOSTEN; COOLS, 2002).

Como descrito anteriormente, as alterações motoras são devido à perda de neurônios no sistema nigro-estriatal. Uma das regiões encefálicas mais afetadas na DP é substância negra (SN). A SN é dividida em duas partes, a compacta

(SNc) e a reticulata (SNr). Na SNc, os neurônios utilizam dopamina (DA) como neurotransmissor (BLANDINI et al., 2000). Nesta região também é encontrada a enzima sintetizadora de DA, a tirosina hidroxilase (TH). A parte reticulata é composta principalmente por neurônios GABAérgicos, e suas eferências inibitórias que se projetam principalmente para os núcleos ventrais anterior e lateral do tálamo (Figura 1) (BLANDINI et al., 2000). A SN tem importantes funções dentro dos circuitos dos núcleos da base, com grande participação por meio das projeções ao estriado (caudado-putamen, CPu) (ALEXI et al., 2000).

A neurodegeneração dopaminérgica da SNc resulta na redução do funcionamento de projeções nigro-estriatais inibitórias, o que leva a hiperativação do núcleo subtalâmico. Ocorre então o aumento da ativação dos neurônios do globo pálido interno e da SNr, inibindo assim o tronco encefálico e as projeções talâmicas (OBESO et al., 2000; OBESO et al., 2004). Conseqüentemente, as vias motoras são inibidas, retardando a iniciação do movimento voluntário, essas vias estão representadas na Figura 1. Além da SNc, existe uma perda neuronal progressiva no tronco encefálico, incluindo o *locus coeruleus*, o núcleo reticular do tronco encefálico e o núcleo motor dorsal do vago, bem como nos núcleos basais de Meynert, na amígdala e na região CA2 do hipocampo (FERRER, 2009). Além da perda neuronal, são encontrados precipitados protéicos citoplasmáticos (corpúsculos de Lewy) constituídos principalmente pelas proteínas sinucleína, parkina e ubiquitina, predominantemente na SN, *locus coeruleus* e, em menor quantidade, em neurônios corticais (GIBB; LEES, 1988; LAMOTTE et al., 2016).

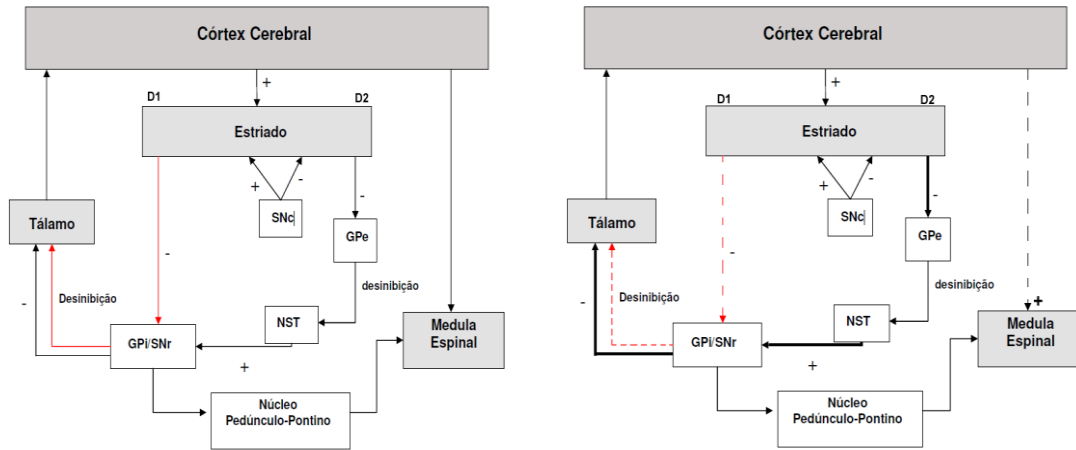


Figura 1 - Representação esquemática do movimento. No primeiro esquema mostra a circuitaria do movimento com as setas completas, em que as setas pretas significa a ativação e as setas vermelhas mostram a inibição da estrutura. No segunda esquema mostra com as setas tracejadas as alterações quando o individuo esta com DP, mostrando em qual momento da circuitaria é afetado com o a DP. Fonte: Real, C. C. 2013.

O desenvolvimento da patologia ainda é obscura, mas trabalho de Sayre e colaboradores (2008) mostrou que alteração na mitocôndria, estresse oxidativo, fatores ambientais e predisposição genética são fatores cruciais para a evolução da doença.

Outros sistemas sofrem alterações no decorrer da doença, como disfunção monoaminérgica múltipla, incluindo além do déficit no sistema dopaminérgico, ainda apresenta déficit no sistema colinérgico, serotoninérgico e noradrenérgico. Estas alterações explicam a diminuição da capacidade do organismo em controlar os movimentos e apresenta alterações psiquiátricas (TEIVE, 2006).

1.2 O modelo experimental de DP por injeção de 6-OHDA.

Na tentativa de estudar a DP, muitos modelos experimentais têm sido desenvolvidos para induzir em animais as características da DP observada na clínica em humanos. A DP pode ser induzida experimentalmente em modelos animais utilizando-se algumas substâncias análogas da dopamina como a 6-OH-

Dopamina (6-OHDA), contaminantes da heroína sintética como o 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), herbicidas e pesticidas como a rotenona, paraquat e maneb (OBESO et al., 2004). Esses modelos são capazes de mimetizar uma ou mais características da DP, particularmente se essas lesões induzidas forem parciais ou graduadas (MEREDITH et al., 2008; PURISAI et al., 2007).

A 6-OHDA é a neurotoxina mais comumente utilizada para degeneração nigral em modelos experimentais (BLUM et al., 2001). Apresenta estrutura química parecida com a dopamina (DA) (é um análogo hidroxilado do neurotransmissor DA) (BREESE; TRAYLOR, 1971). A 6-OHDA é transportada para os corpos celulares e fibras dos neurônios catecolaminérgicos (DEUMENS et al., 2002). Nos neurônios, a 6-OHDA é oxidada e durante este processo ocorre a produção de peróxido de hidrogênio, uma espécie reativa altamente tóxica para a célula (MEREDITH et al., 2008). De acordo com Deumens e colaboradores (2002), a 6-OHDA inibe os efeitos de enzimas mitocondriais da cadeia respiratória, como é o caso das enzimas I e IV, provocando assim déficits metabólicos na mitocôndria. A morte dos neurônios dopaminérgicos induzida por 6-OHDA envolve mecanismo de morte celular por apoptose; sendo assim, o processo envolve a ativação da cascata das caspases, sendo ao final ativada a caspase 3 (ALVAREZ-FISCHER et al., 2008).

A 6-OHDA não é capaz de atravessar a barreira hemato-encefálica, e dessa maneira é necessário que ela seja administrada por via direta (intracisternal, intraventricular ou diretamente no parênquima cerebral) (BLUM et al., 2001; MEREDITH et al., 2008). O grau de depleção dos neurônios dopaminérgicos e seus terminais estriatais dependem da localização e da dose da toxina injetada

(MEREDITH et al., 2008). A fase inicial de morte celular ocorre 12 horas após a administração de 6-OHDA e continua por aproximadamente mais 7 – 10 dias (JEON et al., 1995). O pico de morte celular ocorre em 4 - 6 dias pós lesão. Esta fase inicial é seguida por uma fase prolongada de morte celular que dura cerca de 30 dias, dependendo da dose administrada (ALEXI et al., 2000).

A 6-OHDA é geralmente administrada unilateralmente na SN, no feixe prosencefálico medial (MFB) ou no estriado (CPu) (MEREDITH et al., 2008; DEUMENS et al., 2002), sendo que o complexo CPu é a região mais utilizada por tornar a destruição da via nigroestriatal dopaminérgica mais seletiva e menos agressiva (DEUMENS et al., 2002). Quando injetada no CPu, a toxina produz uma prolongada degeneração retrógrada dos neurônios nigroestriatais (UNGERSTEDT, 1968; ALVAREZ-FISCHER et al., 2008), reproduzindo assim as características fisiopatológicas responsáveis pelas deficiências motoras na DP (BLUM et al., 2001).

Stott e Barker (2013) utilizou a 6-OHDA na concentração de 5µg/ µL, na porção do estriado de camundongos, com o objetivo de avaliar a morte de neurônios em diferentes tempos e avaliando a eficácia da injeção unilateral, deixando um lado controle e outro tratado. Sendo assim, foi observado que o lado controle não foi alterado com a injeção da droga no lado contralateral; além disso, os autores mostraram que quanto mais tempo de sobrevivência do animal após a cirurgia mais morte de neurônios são observados, utilizando tirosina hidroxilase como marcador da diminuição do sistema dopaminérgico, e conseqüentemente, pode avaliar a evolução da doença.

1.3 O Sistema de Cininas

O primeiro estudo relacionando às cininas data de 1909 por Abelous e Bardier, que avaliaram os efeitos hipotensivos das cininas da urina humana. Estudo recente de Monreau e colaboradores (2005) mostrou que as cininas são ativadas em processos fisiológicos como na regulação da pressão sanguínea, funções renais e cardíacas, e processos patológicos, como a inflamação. Além disso, as cininas promovem resposta a estes danos, aumentando o fluxo sanguíneo, dor e edema no local afetado.

A cinina é formada a partir de 2 cascatas bioquímicas, uma no tecido e outra no plasma. No tecido a formação de cininas ocorre quando há um trauma, presença de substância endotóxica e danos, ativando enzimas proteolíticas liberadas durante o trauma. O precursor para a formação da cinina no tecido é o cininogênio de baixo peso molecular, sendo que a calicreína cliva este precursor, formando a calidina, cinina predominante nos tecidos. Já na corrente sanguínea, quando ocorre um trauma, dano ou presença de substância endotóxica, o Fator XII ou Fator de Hageman é ativado, induzindo a clivagem do precursor de cinina, o cininogênio de alto peso molecular, pela calicreína, que irá agir de duas formas: (i) liberando o precursor de bradicinina, e (ii) agindo também no Fator XII, estimulando a continuidade do ciclo (BHOOLA et al.,1992). Essa via esta representada na figura 2, em que mostra esquematicamente a formação da bradicinina e os respectivos receptores em que irão ativar e desencadear as alterações intracelular.

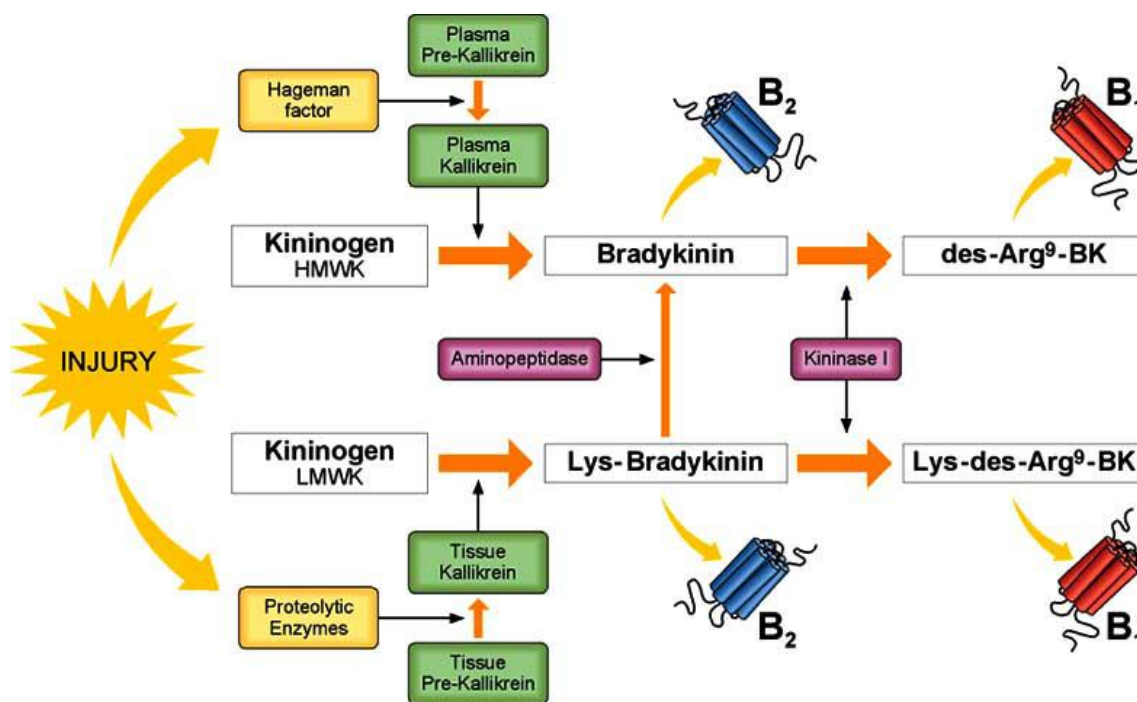


Figura 2 - Figura esquemática da formação via algum trauma com as alterações bioquímicas, até a formação da bradicinina e calidina. Além disso, ainda está representando os receptores. Fonte: Rodi et al., 2005.

Uma das cininas mais comuns é a bradicinina. A bradicinina é encontrada tanto no plasma quanto nos tecidos. No sistema nervoso central a bradicinina é encontrada no bulbo, cerebelo, córtex, estriado e medula espinhal, sendo que a maior concentração da bradicinina ocorre no hipotálamo e na hipófise (PERRY; SNYDER, 1984; KARIYA et al., 1985).

A bradicinina e a calidina são rapidamente degradadas pela peptidase conhecida por cininase. A meia vida da bradicinina é em torno de 30 segundos no plasma ou quando administrada por via intracerebroventricular (KARIYA et al., 1982).

Os efeitos da bradicinina e da calidina são mediados pela ação em dois tipos de receptores, B1 e B2, como mostrado na figura 2. Estes receptores estão

localizados na membrana plasmática, são compostos por 7 domínios transmembrânicos e são acoplados a proteína G (Gs e Gq), sendo importantes pelo número de vias de sinalizações bioquímicas ativadas (WEBB et al., 1994). Os receptores acoplados a proteína G (Gs e Gq), quando ativados, levam à estimulação da fosfolipase C da membrana, o que ativa três vias: a via do inositoltrifosfato (IP₃) que estimulará a liberação de cálcio intracelular do retículo endoplasmático; a via da estimulação de diacilglicerol (DAG) que irá agir na formação de proteína quinase C (PKC); e a terceira via que pode ser estimulada por esses receptores é a que envolve a fosfolipase A2, induzindo a liberação de ácido araquidônico da membrana celular, estimulando a liberação de prostanoídes que desempenham efeitos pró-inflamatórios (SCHELL; IRVINE, 2006).

O receptor B2 possui afinidade pelas cininas intactas (bradicinina e calidina), enquanto o receptor B1 é ativado pelos metabólitos provenientes da clivagem da Arg C-terminal das cininas, pelas cininases do tipo I, que libera des-Arg9-bradicinina e des-Arg10-calidina (para revisão ver BHOOLA et al., 1992). Em contraste com o receptor B2, que é expresso numa grande variedade de células e tecidos, o receptor B1 é pouco expresso em condições normais, mas pode ser induzido *in vivo* e *in vitro* por endotoxinas, citocinas e fatores de crescimento, o que poderia indicar algum papel durante processos patológicos (PESQUERO; BADER, 1998).

Trabalhos tem mostrado o efeito da bradicinina no sistema nervoso central, como o estudo realizado por Appel e Barefoord (1989), mostrando que, em células PC12, a bradicinina age estimulando o rápido aumento de cálcio intracelular, induzindo a liberação de neurotransmissor. Estudo realizado por

Martins (2008) mostrou que a bradicinina (BK) está envolvida na diferenciação neural de células progenitoras neurais (CPN) por um *loop* autócrino que resulta em ativação do receptor B2 de cininas. Além de seu envolvimento no processo de diferenciação neural, a BK também atua no processo de proteção microvascular endotelial em modelos de acidente vascular encefálico (BOVENZI et al., 2010).

Outro trabalho que utilizou a bradicinina neste contexto foi o desenvolvido por Trujillo e colaboradores, de 2012, que mostrou que em cultura cortical de ratos a expressão do receptor B1 está aumentada; já a expressão do receptor B2 é baixa inicialmente, mas durante a diferenciação celular a expressão deste receptor aumenta consideravelmente. Além disso, os autores avaliaram a migração celular e observaram que quando as células foram incubadas com bradicinina houve maior migração, sugerindo que esta migração está relacionada com neurogênese e gliogênese.

Com objetivo de avaliar o envolvimento desses receptores em traumas no encéfalo, Ferreira e colaboradores (2013) observaram o possível efeito protetor de traumas neurológicos quando utilizados antagonistas para o receptor B2 (HOE-140). Nesse estudo foram utilizados ratos Swiss, com uma cânula fixada no crânio, por onde era administrado o antagonista na concentração de 1 ou 10 nmol/kg.

Os resultados deste trabalho mostram que, quando utilizado o antagonista para receptor B2, os animais pareciam ter sido protegidos contra impacto na memória, atenuando edema cerebral, fatores neurotróficos e metabólitos oxidativos. Concluíram que, quando utilizado o HOE-140, os animais tiveram redução na lesão, indicando uma possível proteção de traumas no encéfalo.

Outro estudo utilizou HOE-140 para bloquear o receptor B2, ao mesmo tempo foi utilizada bradicinina (Bk) como agonista. Nesse trabalho foi realizado com cultura primária de córtex, e as células foram tratadas com 1 μ M de HOE-140 ou 1 μ M de Bk. Nesse estudo foi observada a importância da bradicinina e do receptor B2 na diferenciação das células neuronais. Já quando foi utilizado HOE-140, foi encontrado aumento do número de células da glia, sugerindo que a bradicina contribui diretamente para a neurogênese. Neste mesmo sentido, os autores avaliaram os mesmos parâmetros em animais geneticamente modificados, com ausência do receptor B2, e foi observado que a neurogênese, gliogênese e a migração neuronal foram alteradas durante a diferenciação das neuroesferas. Com isso os autores concluíram que a sinalização induzida por bradicinina é determinante para as fases do desenvolvimento neuronal e na expressão de receptores de neurotransmissores (TRUJILLO et al., 2012).

Outro trabalho que mostrou a atuação da bradicinina foi o realizado por Bem-Shmuel e colaboradores (2013), que avaliaram a sinalização de cAMP como um possível mecanismo da Bk, induzindo a redução da produção de NO em linhagem de células de microglia, BV2. Nesse trabalho foi observado que quando as células foram expostas a Bk, a produção de NO foi diminuída de modo dose-dependente. Nesse sentido, a Bk inibiu a ativação de cAMP em resposta a elemento de ligação de proteína (CREB). Os autores concluem que a redução mediada por Bk da produção de NO na microglia é dependente da ligação com a proteína G_i e envolve a inibição da sinalização de cAMP-PKA-CREB.

1.4 Receptores Purinérgicos

O primeiro estudo que avaliou a ação de receptores purinérgicos foi realizado em 1929, por Drury e Szent-Gyorgyi, que demonstraram a ação de compostos de adenina no meio extracelular (DRURY; SZENT-GYORGYI, 1929); mais tarde, na década de 1950, Pamela Holton demonstrou a liberação de ATP por nervos (HOLTON, 1959). Todavia, somente em 1970, Burnstock e colaboradores sugeriram que o ATP e nucleotídeos relacionados podem ser neurotransmissores ou cotransmissores em sinapses do sistema nervoso central e periférico (BURNSTOCK et al., 1970; BURNSTOCK, 1986).

Os receptores purinérgicos são receptores sensíveis a purinas e são divididos em P1 e P2. O subtipo P1 inclui 4 membros, A1, A2A, A2B e A3, e são acoplados a proteína G, sendo ativados por adenosina (GESSI et al., 2011). O outro subtipo de receptores purinérgicos, P2, é dividido em 2 subfamílias, a metabotrópica P2Y e a ionotrópica P2X (KÜGELGEN; HARDEN, 2011) como está representado na figura 3.

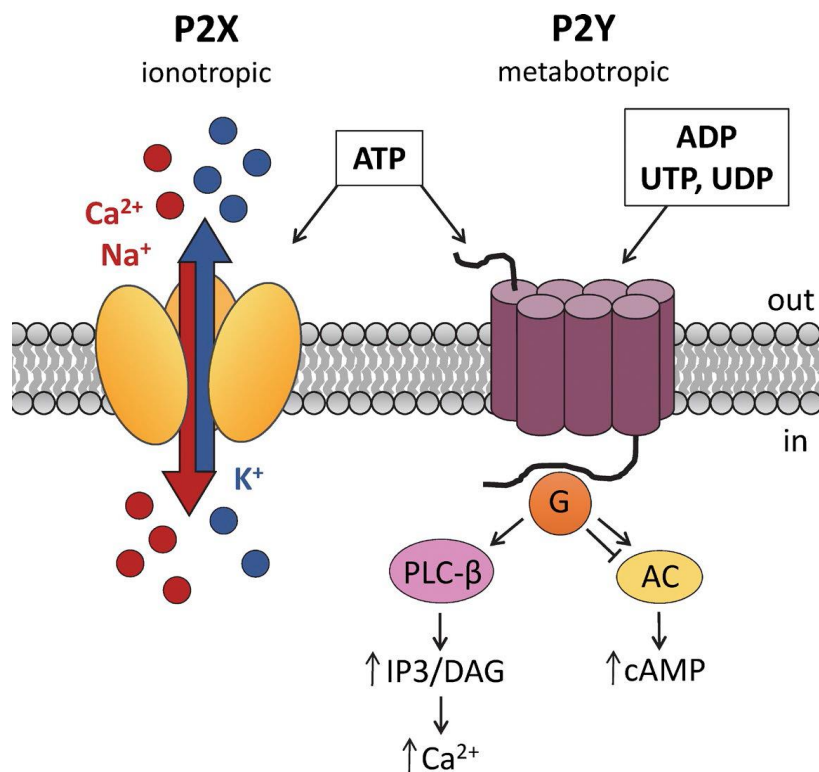


Figura 3 - Esquema representativo dos receptores purinérgicos. Na figura, mostra os subtipos dos receptores e quais os tipos de receptor de membrana, sendo ionotrópico como receptor ligado a proteína G. Fonte: BJÖRKGREM; LISHKO, 2016.

Os receptores P2Y incluem vários subtipos; P2Y1, P2Y2, P2Y4 e P2Y6 são acoplados proteína Gq. Os subtipos P2Y12, P2Y13 e P2Y14 estão acoplados à proteína Gi, e, por fim, o subtipo P2Y11 é acoplado à proteína Gq e Gs (CODDOU et al., 2011).

Os receptores P2X são receptores do tipo canal com sítio de ligação para ATP, e envolvem 7 subunidades. Os subtipos P2X1, 2, 3, 4, 6, 7 são ativados de forma homotrimérica ou heterotrimérica; o subtipo P2X5 apresenta função como heterotrímero, e o subtipo P2X7 interage diretamente com 11 diferentes proteínas intracelulares. Nos receptores P2X o mecanismo de transdução de sinais pode ser alterado com a diferença na concentração intracelular de íons,

sendo o ATP o ligante específico para o receptor P2X (NORTH, 2002; FERRARI et al., 2004; COMPAN et al., 2012).

As subunidades dos receptores P2X1-6 estão localizados predominantemente em neurônios do córtex, SNc, núcleo hipotalâmico ventromedial, núcleos supraóptico e paraventricular, medula ventrolateral, complexo dorsal do vago e núcleo do trato solitário (NORTH; VERKHRATSKY, 2006; BURNSTOCK, 2007). O receptor P2X7 é encontrado principalmente em células do sistema imune, como linfócitos e macrófagos (FERRARI et al. 2006; SCHENK et al., 2011). Os receptores P2Y estão localizados de forma bem difusa, sendo que o P2Y1 está principalmente na região dos núcleos da base, incluindo CPu, núcleo acumbens, globo pálido, hipocampo, cerebelo e córtex; o subtipo P2Y12 está mais expresso nas células da glia e o subtipo P2Y13 é encontrado no tálamo, núcleo caudado, substância negra, hipocampo, cerebelo, córtex e medula ventrolateral. (BOARDER; HOURASI, 1998; BURNSTOCK; KNIGHT, 2004; BURNSTOCK, 2006;)

A ativação de receptores purinérgicos que estão acoplados a proteína Gq induz ao aumento da concentração de cálcio intracelular, resultando em processo de diferenciação celular e embriogênese (SPITZER et al., 2004). O ATP e o UTP são os agonistas dos receptores purinérgicos P2X e P2Y; dependendo do subtipo há maior afinidade por um nucleotídeo e estes são rapidamente degradados no espaço extracelular por ectoenzimas, formando ADP e UDP, respectivamente. Esta é uma mudança importante na indução de respostas fisiológicas, como na ativação de receptor tipo P1. A liberação do ATP, juntamente com a sinalização purinérgica, induz a expansão de células

progenitoras e neurogênese destas células no encéfalo adulto (ZIMMERMANN, 1996).

Os receptores P2X e P2Y são expressos dinamicamente nos períodos pré e pós-natal, tanto no sistema nervoso central como no periférico. Os ligantes dos receptores purinérgicos estão envolvidos no mecanismo de sinalização célula-célula por ativar neurotransmissores ou liberação de neuromoduladores pelas células da glia e neurônios, para o controle da transmissão sináptica no sistema nervoso central (ABBRACCHIO; BURNSTOCK, 1998; COTRINA et al., 2000; FIELDS; BURNSTOCK, 2006). O conceito da sinalização purinérgica expandiu-se ao longo dos anos, incluindo não apenas a co-transmissão em diferentes tipos de nervos periféricos e no sistema nervoso central, mas também a ação de purinas em células não neuronais (FRANKE; ILLES, 2006).

Recentemente, os efeitos biológicos de nucleotídeos de purina extracelulares têm sido material de estudo em diversas células e tecidos. Desta forma, muita atenção tem sido dada à função sinalizatória e à atividade celular de curta duração. No entanto, existem evidências crescentes de que os receptores purinérgicos podem apresentar função na comunicação celular de longa duração, incluindo proliferação celular, diferenciação e apoptose (NEARY et al., 1996; ABBRACCHIO et al., 1998). Além disso, os receptores do tipo P1 têm sido ativamente estudados como potencial alvo terapêutico no tratamento de diversos distúrbios tais como a doença de Parkinson, esquizofrenia, isquemia, e câncer (GESSI, 2011).

Existem poucos trabalhos relacionando a DP com receptores purinérgicos. Um estudo interessante foi o de Chen e colaboradores de 2001,

induziram a DP em animais por 6-OHDA, e foi observado que houve um efeito protetor de neurônios quando foi administrado antagonista de receptor de adenosina A2A; contudo, estes resultados não foram os mesmos quando utilizado o antagonista para receptor do subtipo A1, em que não foi encontrado neuroproteção. Sendo assim, pode-se sugerir que a proteção de neurônios está envolvida com o bloqueio do receptor A2A.

Outro resultado interessante foi o encontrado por Trujillo e colaboradores de 2012, que estudaram os efeitos da bradicinina em cultura primária de neurônios corticais e observaram aumento da expressão das subunidades dos receptores purinérgicos P2X2, P2X3 e P2X4, mas diminuição da expressão dos receptores P2X5, P2X6, P2X7, P2Y2 e P2Y12, sugerindo que a bradicinina age influenciando na expressão destes receptores nos neurônios corticais.

1.5 Canal de Potencial de Cátion Transiente (TRP)

Os canais de potencial transiente (TRP) são receptores sensíveis a mudanças de cátions intracelulares e espécies reativas de oxigênio. Estes receptores são divididos em 6 subfamílias, de acordo com o canal iônico a que estão acoplados, como o receptor com canais canônicos (TRPC), canais para vaniloide (TRPV), canais paramelastatina (TRPM), canais para alquirina (TRPA), canais para mucolipina (TRPML) e canais para policistinas (TRPP) (MONTELL et al., 2002; CLAPHAM, 2003).

Os TRPs são receptores de membrana compostos por 6 domínios transmembrânicos. Para a ativação desses receptores é necessário a ligação de proteínas como SNARE e SNAP-25; sem essa ligação os receptores não se ligam na membrana das células (MONTELL, 2005). Quando estão acoplados na

membrana, estes canais são modulados por vários estímulos, como: calmodulina, temperatura, prótons, peróxido de hidrogênio, depleção dos estoques de cálcio e cátions, como cálcio e magnésio (RAMSEY et al., 2006; VENKATACHALAM; MONTELL, 2007).

Dentre as funções desempenhadas por estes receptores destaca-se, no sistema nervoso central, a contribuição na liberação de neurotransmissores excitatórios, sinalização redox, modulação nos níveis de cálcio mitocondrial, desenvolvimento do tecido neuronal, formação de brotos neuronais, comunicação entre células, ativação de microglia, balanço hidroeletrolítico, controle da temperatura corporal e sinalização sensorial (PEDERSEN et al., 2005).

Os canais tipo TRP permitem o aumento do fluxo de cálcio (MINKE, 2006) e estão envolvidos na excitotoxicidade e danos oxidativos nos tecidos neuronais. Ambos os processos estão correlacionados com a progressão das doenças neurodegenerativas, como Doença de Parkinson e esclerose lateral amiotrófica, relacionadas ao desbalanço de cálcio e conseqüentes danos neuronais mediados por processos oxidativos (BEZPROZVANNY, 2009).

Os subtipos destes receptores são encontrados em diferentes regiões com funções específicas, como o caso do subtipo TRPC5 que é encontrado no encéfalo, com a função de modular a extensão de neuritos (Revisão de MONTELL, 2005).

A função de outros canais de TRP, como o TRPC3 e TRPC4, também pode ser desencadeada por estresse oxidativo (BALZER et al., 1999; GROSCHNER et al., 2004). Os mecanismos citados para explicar a sensibilidade dos canais TRPC envolvem a ativação do TRPC pela fosfolipase C (PLC). A PLC

e seus efetores modulam positivamente a função de muitos TRPCs (VENKATACHALAM; MONTELL, 2007).

Nosso grupo tem estudado a participação do canal TRPV1 e correlacionado com o desenvolvimento de receptores na retina e degeneração neuronal que ocorre após danos no nervo óptico (LEONELLI et al., 2005; LEONELLI et al., 2009; LEONELLI et al., 2010; LEONELLI et al., 2011). Foi encontrado que a sinalização do canal tipo TRPV1 é responsável pela produção excessiva de óxido nítrico e consequente nitração de proteína em neurônios da retina e células da glia (LEONELLI et al., 2010).

O subtipo TRPM7 foi encontrado em grandes quantidades no coração, pulmão, ossos e tecido adiposo de humanos, sendo fator importante no estágio embrionário e essencial no desenvolvimento embrionário; a ausência desse receptor na fase embrionária de ratos é letal (FONFRIA, et.al. 2006).

Trabalho de Aarts e colaboradores (2003) mostrou que os receptores TRPM2 e TRPM7 estão envolvidos com morte neuronal induzida por estresse oxidativo. Estes canais são permeáveis ao cálcio, induzindo a formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Sendo assim, há indícios de que o receptor TRPM7 está envolvido na morte neuronal mediada pela formação de espécies reativas de oxigênio.

O receptor TRPM7 requer a atividade de PIP_2 para manter as atividades normais. Este fato foi demonstrado no trabalho de Langeslang e colaboradores de 2007, em que observaram que a ativação de PIP_2 mediada por PLC age estimulando potencialmente o influxo de cálcio intracelular por intermédio do receptor TRPM7, via deste receptor está representada na figura 4.

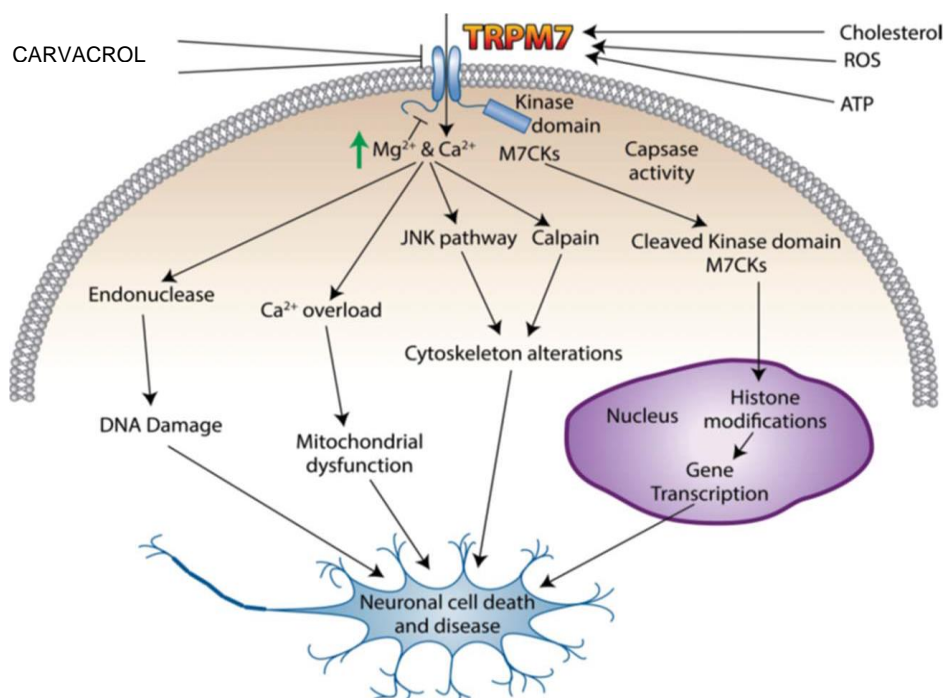


Figura 4 - Representação esquemática da sinalização intracelular do receptor TRPM7, levando em consideração o inibidor específico, no caso carvacrol e as substâncias que estimulariam o receptor. Além disso, ainda demonstra a sinalização até a morte neuronal e a possível doença. Fonte: Modificado de SUN et. al., 2015.

Além disso, foi observado que a clivagem das caspases é potencializada pela quinase do TRPM7, indicando um possível envolvimento na apoptose das células (DESAI et al., 2012). Nesse sentido, foi observado que esta ação é mediada por dinâmica do citoesqueleto, quando os canais do TRPM7 estão abertos (JEONG et al., 2006).

Foi observado que o aumento da expressão do TRPM7 ou a atividade dos canais promovem apoptose em células T, mediada por clivagem da caspase e modulação do receptor. Faz por atividade do TRPM7 (DESAI et al., 2012) ou morte neuronal por altos níveis de cálcio (NUNEZ-VILLENA et al., 2011).

Nesse sentido, foi observado que quando utilizado um antagonista do TRPM7, no caso o carvacrol, nas concentrações de 30 e 50 mg/kg, houve a inibição do receptor e uma neuroproteção nos animais que tinham sofrido indução de isquemia. Esta neuroproteção foi mediada por diminuição de

caspase-3, autoregulação de Bcl-2/Bax e Akt fosforilada, marcadores típicos de apoptose (CHEN et al., 2015).

Outro trabalho que utilizou a inibição do receptor TRPM7 foi o realizado por Li e colaboradores, de 2015, que avaliaram a neuroproteção utilizando carvacrol (0,5 e 1 mM) em cultura primária de células, essas células foram tratadas com agentes farmacológicos e foi observado a proteção dessas células quando o receptor TRPM7 estava inibido. Foi observado a inibição de óxido nítrico sintetase, prevenção do fluxo de cálcio e redução da clivagem da caspase 3. Assim, a inibição do TRPM7 pelo carvacrol foi capaz de proteger as células das injúrias.

6 CONCLUSÃO GERAL

Esse estudo mostrou que alguns receptores parecem estar envolvidos no desenvolvimento da doença de Parkinson, quando induzida pelo modelo da 6-OHDA. Apesar da literatura descrever o receptor B2 de bradicinina como neuroprotetor, neste trabalho esse efeito não foi observado quando utilizado o modelo de 6-OHDA. Além disso, não se deve excluir a possibilidade do envolvimento do receptor B1 no desenvolvimento da DP, uma vez que esse receptor é estimulado quando existe um processo inflamatório.

Em relação aos receptores purinérgicos, foi observado que os receptores P2X2, P2X4, P2X7 e P2Y4, que tem como função a sinalização intracelular quando há alteração de ions, este trabalho sugere que esses receptores tem expressão aumentada quando ocorreu a lesão por 6-OHDA no encéfalo dos animais, sugerindo que os receptores purinérgicos também são receptores que estão envolvidos no modelo de DP.

Já quando avaliado o potencial do canal de TRPM7, foi observada uma alteração positiva desse receptor no modelo, podendo sugerir o envolvimento desse receptor no desenvolvimento da DP, sendo que quando utilizado o antagonista específico desse receptor os animais apresentaram os mesmos padrões de animais controle. Assim, a inibição do TRPM7 produziu marcante neuroproteção no modelo da 6-OHDA.

Levando em consideração os efeitos encontrados ao avaliar os receptores de bradicinina, purinérgicos e TRPM7 que estes receptores estão envolvidos no desenvolvimento da DP quando utilizado o modelo com 6-OHDA, com isso pode-se sugerir um potencial terapêutico para a DP uma vez que foi encontrado certas

alterações na evolução da DP quando utilizado antagonista do receptor, como o caso do TRPM7. Em relação aos demais receptors precisa aumentar os estudos, uma vez que foi observado alteração da DP quando avaliado no modelo em estudo.

REFERÊNCIAS*

- AARTS M, IIHARA K, WEI WL, XIONG ZG, ARUNDINE M, CERWINSKI W, et al. (2003) **A key role for TRPM7 channels in anoxic neuronal death.** *Cell*; 115: 863-877.
- ABBRACCHIO MP, BURNSTOCK G (1998) **Purinergic signaling: pathophysiological roles.** *Jpn J pharmacol* 78:113–145.
- APELOUS J, BARDIER E. (1909). **Les substances hypotensives de l'urine humaine normale.** *CR Soc Biol.* 66: 511–512.
- ALEXI T, BORLONGAN CV, FAULL RL, WILLIAMS CE, CLARK RG, GLUCKMAN PD, HUGHES PE, (2000). **Neuroprotective strategies for basal ganglia degeneration: Parkinson's and Huntington's diseases.** *P. Neurobiology.* 60: 409-470.
- ALVAREZ-FISCHER D, HENZE C, STRENZKE C, WESTRICH J, FERGER B, HOGLINGER GU, OERTEL WH, HARTMANN A (2008). **Characterization of the striatal 6-OHDA model of Parkinson's disease in wild type and alpha-synuclein-deleted mice.** *Exp. Neurology.* 210: 182-193.
- APPELL KC; BAREFOOT DS (1989) **Neurotransmitter release from bradykinin-stimulated PC12 cells Stimulation of cytosolic calcium and neurotransmitter release.** *Biochem. J.* 263: 11-18.
- AUSTINAT M, BRAEUNINGER S, PESQUERO JB, BREDE M, BADER M, STOLL G, RENNÉ T, KLEINSCHNITZ C. (2009) **Blockade of bradykinin receptor B1 but not bradykinin receptor B2 provides protection from cerebral infarction and brain edema.** *Stroke*, 40 (1):285-293.
- BALZER M, LINTSCHINGER B, GROSCHNER K (1999) **Evidence for a role of Trp proteins in the oxidative stress-induced membrane conductances of porcine aortic endothelial cells.** *Cardiovasc Res*; 42: 543-549.
- BATASSINI C, BROETTO N, TORTORELLI LS, BORSOI M, ZANOTTO C, GALLAND F, SOUZA TM, LEITE MC, GONÇALVES CA. (2015). **Striatal Injury with 6-OHDA Transiently Increases Cerebrospinal GFAP and S100B.** *Hindawi Pub. Corp. Neural Plasticity.* ID 387028, 9 pages.
- BASCANDS JL, PECHER C, ROUAUD S, EMOND C, TACK JL, BASTIE MJ, BURCH R, REGOLI D, GIROLAMI JP. (1993) **Evidence for existence of two distinct bradykinin receptors on rat mesangial cells.** *Am J Physiol.* 264: 548-556.
- BEN-SHMUEL S, DANON A, FLEISHER-BERKOVICH S. (2013). **Bradykinin decreases nitric oxide release from microglia via inhibition of cyclic adenosine monophosphate signaling.** *Peptides.* 40:133-140.
- BEZPROZVANNY I. (2009) **Calcium signaling and neurodegenerative diseases.** *Trends Mol Med*; 15: 89-100.
- BHOOLA KD, FIGUEROA CD; WORTHY K. (1992) **Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases.** *Pharmac. Rev.* 44:1-80.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR6023: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

- BHoola KD, ELSON CJ, DIEPPE PA. (1992). **Kinins-key mediators in inflammatory arthritis?** Br J Rheumatol. 31: 509-518.
- BIANCO F, FUMAGALLI M, PRAVETTONI E, D'AMBROSI N, VOLONTE C, MATTEOLI M, ABBRACCHIO MP, VERDERIO C. (2005). **Pathophysiological roles of extracellular nucleotides in glial cells: differential expression of purinergic receptors in resting and activated microglia.** Brain Res. Rev.144-156.
- BJÖRKGREN I, LISHKO PV. (2016) **Purinergic signaling in testes revealed.** JGP. 148: 207-211.
- BLANDINI F, NAPPI G, TASSORELLI C, MARTIGNONI E. (2000). **Functional changes of the basal ganglia circuitry in Parkinson's disease.** P. Neurobiology. 62: 63-88.
- BLUM DTS, LAMBENG N, NISSOU M, BENABID AL, SADOUL R, VERNA JM. (2001). **Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease.** P. Neurobiology. 65: 135-172.
- BOARDER MR; HOURANI SMO. (1998). **The regulation of vascular function by P2 receptors: multiple sites and multiple receptors.** Trends Pharmacol. Sci. 19: 99–107.
- BOVENZI V, SAVARD M, MORIN J, CUERRIER CM, GRANDBOIS M, GOBEIL FJR (2010) **Bradykinin protects against brain microvascular endothelial cell death induced by pathophysiological stimuli.** J Cell Physiol 222:168-176.
- BREESE GR; TRAYLOR TD. (1971). **Depletion of brain noradrenaline and dopamine by 6-hydroxydopamine.** British journal of pharmacology. 42: 88-99.
- BURNSTOCK G. (1986). **The changing face of autonomic neurotransmission.** Acta Physiol Scand. 126, 67-91.
- BURNSTOCK G, CAMPBELL G, SATCHELL D, SMYTHE A. (1970). **Evidence that adenosine triphosphate or related nucleotide is the transmitter substance release by non-adrenergic inhibitory nerves in the gut.** Br J Pharmacol. 40: 668-688.
- BURNSTOCK G; KNIGHT GE. (2004). **Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems.** Int. Rev. Cytol. 240: 301–304.
- BURNSTOCK G. (2006). **Historical review: ATP as a neurotransmitter.** Trends Pharmacol. Sci. 27: 166–176.
- BURNSTOCK, G. (2007) **Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission.** Physiol. Rev. 87: 659–797.
- CAETANO AL, DONG-CRESTE KE, AMARAL FA, MMONTEIRO-SILVA KC, PESQUEIRO JB, ARAUJO MS, MONTOR WR, VIEL TA, BUCK HS (2015). **Kinin B2 receptor can play a neuroprotective role in Alzheimer's disease.** Neuropeptides. 53: 51-62.
- CHEN J, XU K, PETZER J, STAAL R, XU Y, BEILSTEIN M, SONSALLA P, CASTAGNOLI K, CASTAGNOLI N, SCHWARZSCHILD M (2001) **Neuroprotection by caffeine and A2A adenosine receptor inactivation in a model of Parkinson's disease.** J Neuroscience 21:1–6.
- CHEN W, XU B, XIAO A, LIU L, FANG X, LIU R, TURLOVA E, BARSZCZYK A, ZHONG X, SUN CLF, BRITTO LRG, FENG Z-P, SUN H-S. (2015). **TRPM7 inhibitor carvacrol protects brain from neonatal hypoxic-ischemic injury.** Mol. Brain. 8:11, 1-13.

CHEN WL, BARSZCZYK A, TURVOVA E, DEURLOO M, LIU B, YANG BB, RUTKA JT, FENG ZP, SUN HS (2015b). **Inhibition of TRPM7 by carvacrol suppresses glioblastoma cell proliferation, migration and invasion.** *Oncotarget* 6:16321-16340.

CLAPHAM DE. (2003). **TRP channels as cellular sensors.** *Nature* 426: 517-524.

CODDOU C, YAN Z, OBSIL T, HUIDOBRO-TORO JP, STOJILKOVIC SS. (2011). **Activation and regulation of purinergic P2X receptor channels.** *Pharmacol Rev.*1;63:641–683.

COMPAN V, ULMANN L, STELMASHENKO O, CHEMIN J, CHAUMONT S, RASSENDREN F. (2012). **P2X2 and P2X5 subunits define a new heteromeric receptor with P2X7-like properties.** *J Neurosci* 32: 4284–4296.

COOK NL, HEUVEL CVD, VINK R (2009), **Characterisation of TRPM channel mRNA levels in Parkinson disease.** In: The 12th Int .Magnesium Symp. *Magnesium Res.* 22:188-189.

COTRINA ML, LIN JH, LOPEZ-GARCIA JC et al (2000) **ATP-mediated glia signaling.** *J Neurosci* 20:2835–2844.

COULL J. (2005). **BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain.** *Nature.* 1017-1021.

DADON D, MINKE B (2010), **Cellular functions of transient receptor potential channels.** *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 42: 1430-1445.

DECKER AR, McNEILL MS, LAMBERT AM, OVERTON JD, CHEN YC, LORCA RA, JOHNSON NA, BROCKERHOFF SE, MOHAPATRA DP, MACARTHUR H, PANULA P, MASINO MA, RUNNELS LW, CORNELL RA (2014), **Abnormal differentiation of dopaminergic neurons in zebrafish *trpm7* mutant larvae impairs development of the motor pattern.** *Dev. Biol.* 386: 428-439.

DELMAS P, WANAVERBECQ N, ABOGADIE FC, MISTRY M, BROWN DA (2002). **Signaling microdomains define the specificity of receptor-mediated InsP3 pathways in neurons.** *Neuron* 14: 209-220.

DEUMENS R, BLOKLAND A, PRICKAERTS J. (2002). **Modeling Parkinson's disease in rats: an evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway.** *Exp. Neurology.* 175, 303-317.

DEMEUSE P, PENNER R, FLEIG A (2006), **TRPM7 channel is regulated by magnesium nucleotides via its kinase domain.** *J. Gen. Physiol.* 127: 421-434.

DESAI BN, KRAPIVINSKY G, NAVARRO B, KRAPIVINSKY L, CARTER BC, FEBVAY S, DELLING M, SEVESTRE H, RAMSEY IS, MANASIAN Y, CLAPHAM DE. (2012). **Cleavage of TRPM7 releases the kinase domain from the ion channel and regulates its participation in Fas-induced apoptosis.** *Dev. Cell* 22, 6: 1149-1162.

DRURY AN, SZENT-GYORGYI A. (1929). **The physiological activity of adenine compounds with special reference to their action upon the mammalian heart.** *J Physiol.* 68:213-237.

FERRARI D, PIZZIRANI C, ADINOLFI E, FORCHAP S, SITTA B, TURCHET L, et al. (2004). **The antibiotic polymyxin B modulates P2X7 receptor function.** *J Immunol* 173:4652–4660.

FERRARI D, PIZZIRANI C, ADINOLFI E, LEMOLI RM, CURTI A, IDZKO M, et al. (2006). **The P2X7 receptor: a key player in IL-1 processing and release.** *J Immunol* 176:3877–3883.

FERRER I. (2009). **Early involvement of the cerebral cortex in Parkinson's disease: convergence of multiple metabolic defects.** P.Neurobiology 88: 89-103.

FERREIRA APO, RODRIGUES FS, DELLA-PACE ID, MOTA BC, OLIVEIRA SM, GEWEHR CCV, BOBONSKI F, OLIVEIRA CV, BRUM JS, OLIVEIRA MS, FURIAN AF, BARROS CSL, SANTOS ARS, FERREIRA J, FIGHERA MR, ROYES LFF. (2013). **HOE-140, an antagonist of B2 receptor, protects against memory deficits and brain damage induced by moderate lateral fluid percussion injury in mice.** Psychopharmacology. 1-14.

FIELDS RD, BURNSTOCK G (2006) **Purinergic signalling in neuroglia interactions.** Nat Rev Neurosci 7:423–436.

FLEIG A, CHUBANOV V (2014). **TRPM7.** Handb. Exp. Pharmacol. 222: 521-546.

FLEIG A, PENNER R (2004), **The TRPM ion channel subfamily: molecular, biophysical and functional features.** Trends. Pharmacol. Sci. 25: 633-639.

FONFRIA E, MURDOCK PR, CUSDION FS, BENHAM CD, KELSELL RE, McNULTY S. (2006). **Tissue distribution profiles of the human TRPM cation channel family.** J Receptors and Signal Transduction, 26:159-178.

FRANKE H, ILLES P. (2006). **Involvement of P2 receptors in the growth and survival of neurons in the CNS.** Pharmacol Ther. 109, 297- 324.

GESSI S, MERIGHI S, SACCHETTO V, SIMIONI C, BOREA PA. (2011). **Adenosine receptors and cancer.** Biochim Biophys Acta. 1808:1400- 1412.

GIBB WR; LEES AJ. (1988). **The relevance of the Lewy body to the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease.** J. neurology, neurosurgery, and psychiatry 51: 745-752.

GLAJCHA EK, FLEMING SM, SURMEIER J, OSTENA P. (2012). **Sensorimotor assessment of the unilateral 6-hydroxydopamine mouse model of Parkinson's disease.** Behavioural Brain Res. 230: 309–316.

GROSCHNER K, ROSKER C, LUKAS M. (2004). **Role of TRP channels in oxidative stress.** Nov. Found Symp. 258: 222-230.

HERNANDES MS, SANTOS GD, CAFÉ-MENDES CC, LIMA LS, SCAVONE C, MUNHOZ CD, BRITTO LR. (2013). **Microglial cells are involved in the susceptibility of NADPHoxidase knockout mice to 6-hydroxy-dopamine-induced neurodegeneration.** PLoS One 8: e75532.

HERNANDES MS, CAFÉ-MENDES CC, BRITTO LRG. (2014). **NAPH oxidase and the degeneration of dopaminergic neurons in Parkinson mice.** Oxid. Med. and Cell. Longev. 1-13.

HOLTON P. (1959). **The liberation of adenosine triphosphate on antidromic stimulation of sensory nerves.** J Physiol. 145, 494-504.

JEON BS, JACKSON-LEWIS V, BURKE RE. (1995). **6-Hydroxydopamine lesion of the rat substantia nigra: time course and morphology of cell death.** Neurodegeneration: J. neurodegen. Disor., neuroprotection, and neuroregeneration. 4, 131-137.

JEONG SY, SHIN SY, KIM HS, BAE CD, UHM DY, PARK MK, CHUNG S. (2006). **Regulation of magnesium-inhibited cation current by action cytoskeleton rearrangement.** Biochem. Biophys. Res. Commun. 339 (3), 810-815.

KARIYA K, YAMAUCHI A, SASAKI T. (1985) **Regional distribution and characterization of kinin in the CNS of the rat.** J. Neurochem. 44, 1892-1897.

KARIYA K, YAMAUCHI A, HATTORI S, TSUDA Y, OKADA Y. (1982b) **The disappearance rate of intraventricular bradykinin in the brain of the conscious rat.** Biophys. Res. Commun. 107, 1461-1466.

KHAKH BS, GITTERMANN D, COCKAYNE DA, JONES A. (2003). **A ATP modulation os excitatory synapses onto interneurons.** J Neurosci. 7425-7437.

KHOJA S, SHAH V, GARCIA D, ASATRYAN L, JAKOWEC MW, DAVIES DL (2016). **Role of purinergic P2X4 receptors in regulating striatal dopamine homeostasis and dependent behaviors.** J. Neurochemistry. 139: 134-148.

KÜGELGEN I & HARDEN TK. (2011). **Molecular pharmacology, physiology, and structure of the P2Y receptors.** Adv Pharmacol 61: 373–415.

LANGESLAG M, CLARK K, MOOLENAAR WH, VAN, LEEUWEN FN, JALINK K. (2007). **Activation of TRPM7 channels by phospholipase C-coupled receptor agonists.** J Biol. Chrm, 282 (1), 232-239.

LAMOTTE G, MORELLO R, LEBASNIER A, AGOSTINI D, BOUVARD G, SAYETTE VDL, DEFER GL. (2016). **Influence of educaton on cognitive performance and dopamine transporter binding in dementia with Lewy bodies.** Clinic. Neurol Neurosurgery; 146: 138-143.

LEONELLI M, BRITTO LR, CHAVES GP, TORRAO AS. (2005). **Developmental expression of cannabinoid receptors in the chick retinotectal system.** Brain Res Dev Brain Res; 156: 176-182.

LEONELLI M, MARTINS DO, KIHARA AH, BRITTO LR. (2009). **Ontogenetic expression of the vanilloid receptors TRPV1 and TRPV2 in the rat retina.** Int J Dev Neurosci; 27: 709-718.

LEONELLI M, MARTINS DO, BRITTO LR. (2010). **TRPV1 receptors are involved in protein nitration and Muller cell reaction in the acutely axotomized rat retina.** Exp Eye Res; 91: 755-768.

LEONELLI M, MARTINS DO, BRITTO LR. (2011). **TRPV1 receptors modulate retinal development.** Int J Dev Neurosci; 29: 405-413.

LI W-T, ZHANG S-Y, ZHOU Y-F, ZHANG B-F, LIANG Z-Q, LIU Y-H, WEI Y, LI C-K, MENG X-J, XIA M, DAN Y, SONG J-N. (2015). **Carvacrol Attenuates traumaic neuronal injury through store-operated Ca²⁺ entry-independent regulation of intracelular Ca²⁺ homeostasis.** Neurochemistry International. Not yet published.

LUMENTA DB, PLESNILA N, KLÄSNER B, BAETHMANN A, PRUNEAU D, SCHMID-ELSAESSER R, ZAUSINGER S. (2006) **Neuroprotective effects of a postischemic treatment with a bradykinin B2 receptor antagonist in a rat model of temporary focal cerebral ischemia.** Brain Res; 1069(1):227-234.

MATHIS SA, CRISCIMAGNA NL, LEEB-LUNDBERG LMF. (1996). **B1 and B2 kinin receptors mediate distinct patterns of intracelular Ca²⁺ signaling in single cultured vascular smooth muscle cells.** Mol. Pharmacol. 50: 128-139.

MARTINS AH, ALVES JM, TRUJILLO CA, SCHWINDT TT, BAMABÉ GF, MOTTA FL, GUIMARAES AO, CASARINI DE, MELLO LE, PESQUERO JB, ULRICH H. (2008) **Kinin-B2**

receptor expression and activity during differentiation of embryonic rat neurospheres. Cytometry A. 73:361- 368.

MARTINS AH, ALVES JM, PEREZ D, CARRASCO M, TORRES-RIVERA W, ETEROVIC VA, FERCHMIN PA, ULRICH H. (2012) **Kinin-B2 receptor mediated neuroprotection after NMDA excitotoxicity is reversed in the presence of kinin-B1 receptor agonists.** Plos One. (7): 1-6.

MEREDITH GE, SONSALLA PK, CHESSELET MF. (2008). **Animal models of Parkinson's disease progression.** Acta neuropathologica. 115, 385-398.

MILLER BA, ZHANG W. (2011). **TRP channels as mediators of oxidative stress.** Adv. Exp. Med. Biol. 704: 531-544.

MINKE B. (2006). **TRP channels and Ca²⁺ signaling.** Cell Calcium; 40: 261-275.

MONTELL C, BIMBAUMER L, FLOCKERZI V, BINDELS RJ, BRUFORD EA, CATERINA MJ, et al. (2002). **A unified nomenclature for the superfamily of TRP cation channels.** Mol Cell; 9: 229-231.

MONTELLI C. (2005). **The TRP Superfamily of Cation Channels.** Sci. STKE 2005 (272), re3. Cell Signaling Technology.

MOREAU ME, GARBACKI N, MOLINARO G, et al. (2005). **The kallikrein-kinin system: current and future pharmacological targets.** J Pharmacol Sci. 99: 36-38.

NEARY JT, RATHBONE MP, CATTABENI F, et al. (1996). **Trophic actions of extracellular nucleotides and nucleosides on glial and neuronal cells.** Trends Neurosci. 19, 13-18.

NICOLETTI NF, SÉNÉCAL J, SILVA VD, ROXO MR, FERREIRA NP, MORAIS RLT, PESQUERO JB, CAMPOS MM, COUTURE R, MORRONE FB (2016). **Primary Role for Kinin B1 and B2 Receptors in Glioma Proliferation.** Mol Neurobiol. DOI 10.1007/s12035-016-0265-9.

NORTH RA. (2002). **Molecular physiology of P2X receptors.** Physiol Rev.; 82: 1013–1067.

NORTH, R.A. and VERKHRATSKY, A. (2006) **Purinergic transmission in the central nervous system.** Pflugers Arch. 452, 479–485.

NUNEZ-VILLENA F, BECERRA A, ECHEVERRIA C, BRICENO N, PORRAS O, ARMISEN R, VARELA D, MONTORFANO I, SARMIENTO D, SIMON F. (2011). **Increased expression of the transient receptor potential melastatin 7 channel is critically involved in lipopolysaccharide-induced reactive oxygen species-mediated neuronal death.** Antioxid. Redox Signal. 15 (9), 2425-2438.

OBESO JA, RODRIGUEZ-OROZ MC, RODRIGUEZ M, LANCIEGO JL, ARTIEDA J, GONZALO N, OLANOW CW. (2000). **Pathophysiology of the basal ganglia in Parkinson's disease.** Trends in neurosciences 23: S8-19.

OBESO JA, RODRIGUEZ-OROZ MC, LANCIEGO JL, RODRIGUEZ DM. (2004). **How does Parkinson's disease begin? The role of compensatory mechanisms.** Trends in neurosciences 27; 125-127; author reply 127-128.

OH HG, CHUM YS, PARK CS, KIM TW, PARK MK, CHUNG S. (2015). **Regulation of basal autophagy by transient receptor potential melastatin 7 (TRPM7) channel.** Biochem. Biophys. Res. Commun. 463: 7-12.

OOSTEN RV; COOLS AR. (2002). **Differential effects of a small, unilateral, 6-hydroxydopamine-induced nigral lesion on behavior in high and low responders to novelty.** Exp. Neurology 173; 245-255.

PAXINOS G; FRANKLIN KBJ. (2001). **The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates 2nd edn** (San Diego, CA: Academic).

PEDERSEN SF, OWSIANIK G, NILIUS B. (2005). **TRP channels: an overview.** Cell Calcium; 38: 233-252.

PERRY DC; SNYDER SH. (1984). **Identification of bradykinin in mammalian brain.** J. Neurochem. 43, 1072- 1080.

PESQUERO JB, BADER M. (1998) **Molecular biology of the kallikrein-kinin system: from structure to function.** Braz J Med Biol Res. 31:1197-1203.

PURISAI MG, McCORMACK AL, CUMINE S, LI J, ISLA MZ, DI MONTE DA. (2007). **Microglial activation as a priming event leading to paraquat-induced dopaminergic cell degeneration.** Neurobiol. Dis. 25, 392-400.

RAMSEY IS, DELLING M, CLAPHAM DE. (2006). **An introduction to TRP channels.** Annu Rev Physiol; 68: 619-647.

RAO G, FISCH L, SRINIVASAN S, D'AMICO F, OKADA T, EATON C, ROBBINS C. (2003). **Does this patient have Parkinson disease?** Jama 289: 347-353.

REAL CC, FERREIRA AFB, CHAVES-KIRSTEN GP, TORRÃO AS, PIRES RS, BRITTO LRG. (2013). **BDNF Receptor blockade hinders the beneficial effects of exercise in a rat model of parkinson's disease.** In press.

RODI D, COUTURE R, ONGALI B, SIMONATO M. (2005). **Targeting kinin receptors for the treatment of neurological diseases.** Current Pharmaceutical Design. 11: 1313-1326.

RODRIGUES RJ, ALMEIDA T, RICHARDSON PJ, OLIVEIRA CR, CUNHA RA. (2005). **Dual presynaptic control by ATP of glutamate release via facilitatory P2X1, P2X2/3, and P2X3 and inhibitory P2Y1, P2Y2, and/or P2Y4 receptors in the rat hippocampus.** J. Neurosci. 6286-6295.

RUBERG M, SCHERMAN D, JAVOY-AGID F. (1995). **Agid, Dopamine denervation, age of onset, and Parkinson's disease.** Neurology 45: 392.

RUBIO ME; SOTO F. (2001). **Distinct localisation of P2X receptors at excitatory postsynaptic specializations.** J Neurosci. 641-653.

SANTANGELO G, PISCOPO F, BARONE P, VITALE C. (2017). **Personality in Parkinson's disease: Clinical, behavioural and cognitive correlates.** J Neurological Sciences. 374: 17-25.

SAYRE LM, PERRY G, SMITH MA. (2008). **Oxidative stress and neurotoxicity.** Chemical research in toxicology 21:172-188.

SHELL MJ; IRVINE RF. (2006). **Calcium-triggered exit of F-actin and IP3 3-kinase A from dendritic spines is rapid and reversible.** European J. Neuroscience. V. 24: 2491-2503.

SCHENK U, FRASCOLI M, PROIETTI M, GEFFERS R, TRAGGIAI E, BUER J, et al. (2011). **ATP inhibits the generation and function of regulatory T cells through the activation of purinergic P2X receptors.** Sci Signal 4: ra12.

SCHOBER A. (2004). **Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP.** Cell Tissue Res. 318: 215-224.

SMITH JAM, WEBB C, HOLFORD J, BURGESS GM. (1995). **Signal transduction pathways for B1 and B2 bradykinin receptors in bovine pulmonary artery endothelial cell.** Mol. Pharmacol. 47: 525-534.

SMITH GA, HEUER A, DUNNETT SB, LANE EL. (2012). **Unilateral nigrostriatal 6-hydroxydopamine lesions in mice II: predicting L-dopa-induced dyskinesia.** Behav Brain Res. 1: 281-92.

STOTT SRW; BARKER RA. (2013). **Time course of dopamine neuron loss and glial response in the 6-OHDA striatal mouse model of Parkinson's disease.** European J. of Neuroscience. 1-15.

SPITZER NC, ROOT CM, BORODINSKY LN. (2004). **Orchestrating neuronal differentiation: patterns of Ca²⁺ spikes specify transmitter choice.** Trends Neurosci 27:415–421.

SU J, CUI M, TANG Y, ZHOU H, LIU L, DONG Q. (2009). **Blockade of bradykinin B2 receptor more effectively reduces postischemic blood-brain barrier disruption and cytokines release than B1 receptor inhibition.** Bioch. Biophys Research Communicat. 388: 205-211.

SUKUMARAN P, SCHAAR A, SUN Y, SINGH BB. (2016). **Functional role of TRP channels in modulating ER stress and autophagy.** Cell Calcium S 0143-4160: 30015-X.

SUN HS, JACKSON MF, MARTIN LJ, JANSEN K, TEVES L, CUI H, KIYONAKA S, MORI Y, JONES M, FORDER JP, GOLDE TE, ORSER BA, MACDONALD JF, TYMIANSKI M. (2009). **Suppression of hippocampal TRPM7 protein prevents delayed neuronal death in brain ischemia.** Nat. Neurosci. 12 : 1300-1307.

SUN Y, SUKUMARAN P, SCHAAR A, SINGH BB. (2015). **TRPM7 and its role in neurodegenerative diseases.** Channels 9: 253-261.

SURPRENANT A; NORTH RA. (2009). **Signaling at purinergic P2X receptor.** Annu Rev Physiol. 333-359.

TAKADA Y, NUMATA T, MORI Y. (2013). **Targeting TRPs in neurodegenerative disorders.** Curr. Top. Med. Chem. 13: 332-334.

TEIVE HA. (2006). **Neuroproteção: fatos, mitos e quimeras.** In: ANDRADE LAF, BARBOSA RE, CARDOSO F, TEIVE HAG. **Doença de Parkinson: estratégias atuais de tratamento.** 2. Ed. São Paulo: Segmento Farma, 17-35.

TORRES-RIVERA W, PÉREZ D, PARK KY, CARRASCO M, PLATT MO, ETEROVIC VA, FERCHMIN PA, ULRICH H, MARTINS AH. (2013) **Kinin-B2 receptor exerted neuroprotection after diisopropyfluorophosphate-induced neuronal damage.** Neuroscience, 247: 273-279.

TRUJILLO CA, NEGRAES PD, SCHWINDT TT, LAMEU C, CARROMEU C, MUOTRI AR, PESQUERO JB, CERQUEIRA DM, PILLAT MM, SOUZA HDN, TURAÇA LT, ABREU JG, ULRICH H. (2012). **Kinin-B2 Receptor Activity Determines the Differentiation Fate of Neural Stem Cells.** J. Biol Chemistry V. 287: 53. 44046–44061.

ULRICH H, ABBRACCHIO MP, BURNSTOCK G. (2012). **Extrinsic Purinergic Regulation of Neural Stem/Progenitor Cells: Implications for CNS Development and Repair.** Stem Cell Reviews and Reports. 755-767.

- UNGERSTEDT U. (1968). **6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons**. European J. pharmacology. 5, 107-110.
- VENKATACHALAM K; MONTELLI C. (2007). **TRP channels**. Annu Rev Biochem; 76: 387-417.
- VERMA S, QUILLINAN N, YANG YF, NAKAYAMA S, CHENG J, KELLEY MH, HERSON PS. (2012). **TRPM2 channel activation following in vitro ischemia contributes to male hippocampal cell death**. Neurosci. Lett. 530: 41-46.
- VIEL TA; BUCK HS. (2011). **Kallikrein-kinin system mediated inflammation in Alzheimer's disease *in vivo***. Current Alzheimer Research. 8: 59-66.
- WEBB M, McINTRYRE P, PHILLIPS E. (1994). **B1 and B2 bradykinin receptors encoded by distinct mRNAs**. J. Neurochem. 62, 1247-1253.
- YU H, ZHANG ZL, CHEN J, PEI A, HUA F, QIAN X, HE J, LIU CF, XU X. (2012). **Carvacrol, a food-additive, provides neuroprotection on focal cerebral ischemia/reperfusion injury in mice**. PLoS One 7: e33584.
- YUAHASI KK, DEMASI MA, TAMAJUSUKU AS, LENZ G, SOGAYAR MC, FORNAZARI M, LAMEU C, NASCIMENTO IC, GLASER T, SCHIWINDT TT, et. al. (2012). **Regulation of neurogenesis and gliogenesis of retinoic acid-induced P19 embryonal carcinoma cell by P2X2 and P2X7 receptors studied by RNA interference**. Int J Dev Neurosci. 91-97.
- ZIMMERMANN H. (1996). **Biochemistry, localization and functional roles of ecto-nucleotidases in the nervous system**. Prog Neurobiol 49:589-618.
- ZHANG HQ, ZHOU L, ZHANG X, BAI J, SHI G. (2012). **Ginsenoside-Rd attenuates TRPM7 and ASIC1a but promotes ASIC2a expression in rats after focal cerebral ischemia**. Neurol Sci: Off J Ital Neurol Soc Ital Soc Clin Neurophysiol. 33: 1125-1131.