

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**INSTITUTO DE QUÍMICA**

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)**

Lucas Bonfim Marques

**Modelagem celular *in vitro* da Doença de Huntington com ácido 3-nitropropiónico e ácido quinolínico e avaliação das funções neuroprotetoras da adenosina**

Versão corrigida da dissertação

SÃO PAULO

Data de Depósito na SPG:

20/05/2022

Lucas Bonfim Marques

**Modelagem celular *in vitro* da Doença de Huntington com ácido 3-nitropropilônico e ácido quinolínico e avaliação das funções neuroprotetoras da adenosina**

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências (Bioquímica)

Orientador: Prof. Alexander Henning Ulrich

SÃO PAULO

2022

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, 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

M357m	Marques, Lucas Bonfim Modelagem celular in vitro da Doença de Huntington com ácido 3-nitropropiónico e ácido quinolínico e avaliação das funções neuroprotetoras da adenosina / Lucas Bonfim Marques. - São Paulo, 2022. 110 p.
	Dissertação (mestrado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Bioquímica. Orientador: Ulrich, Henning
	1. Doença de Huntington. 2. excitotoxicidade. 3. ácido quinolínico. 4. ácido 3-nitropropiónico. 5. adenosina. I. T. II. Ulrich, Henning, orientador.

"Modelagem celular in vitro da Doença de Huntington com ácido 3-nitropropiónico e ácido quinolínico e avaliação das funções neuroprotetoras da adenosina"

**LUCAS BONFIM MARQUES**

Dissertação de Mestrado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências obtido no Programa Ciências Biológicas (Bioquímica) - Área de Concentração: Bioquímica.

---

**Prof. Dr. Alexander Henning Ulrich**  
(Orientador e Presidente)

**APROVADO(A) POR:**

---

**Prof. Dr. Alexandre Bruni Cardoso**  
IQ - USP

---

**Prof. Dr. Roberto de Pasquale**  
ICB - USP

---

**Profa. Dra. Fabíola Mara Ribeiro**  
UFMG

**SÃO PAULO**  
21 de junho de 2022

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao prof. dr. Alexander Henning Ulrich por me aceitar e orientar como aluno de mestrado pelo Programa de Pós-Graduação do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química (IQ) da Universidade de São Paulo (USP), onde trabalha tornando possível projetos da natureza desta dissertação – tendo sido uma honra acessar a sua ‘ciência’ e um enobrecimento reconhecer os seus critérios –; à dra. Talita Glaser pelas basilares assistências técnico-científicas, assim como pelo cunho moralizante posto em minha carreira acadêmica; ao corpo técnico-laboratorial e -administrativo do Departamento de Bioquímica do IQ da USP pela excelência no desenvolvimento dos seus ofícios; aos colegas de trabalho do Laboratório de Neurociência pelas partes que lhes devo; às instituições de fomento Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) por financiarem minha estadia na cidade de São Paulo e as atividades de prática laboratorial; ao prof. dr. Rodrigo Ribeiro Resende por me acreditar sua confiança – fruto do simples convívio nos campos de batalhas – ao me conceder a sua indicação; à profa. dra. Elaine Maria de Souza Fagundes pelos seus ensinamentos atemporais – hoje, como nunca, pedras de torque em meu espírito –; aos meus demais professores formais e substanciais; à minha família não-tradicional brasileira – expressão de Amor –; aos meus companheiros leais cujo tempo me permite chamá-los de amigos; aos Deuses – fontes inesgotáveis de sabedoria e inspiração –; e aos bravos guerreiros militantes do Bem, do Belo e da Verdade, minhas saudações.

“Vou aprender a ler pra ensinar meus camaradas”

Roberto Mendes, Massemba

## RESUMO

Marques, L. B. **Modelagem celular *in vitro* da Doença de Huntington com ácido 3-nitropropiónico e ácido quinolínico e avaliação das funções neuroprotetoras da adenosina.** 2022. 110p. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A Doença de Huntington (Huntington's disease - HD) trata-se de uma patologia neurodegenerativa hereditária caracteriza por meio da expressão das proteínas huntingtinas mutantes (mHtt), das mortes dos neurônios espinhais médios (*medium spiny neurons* – MSNs) GABAérgicos D2-positivos do *striatum* e da hipercinesia. Uma hipótese se refere à função das mHtts de potencializarem os efeitos excitotóxicos das estimulações dos receptores de NMDA (NMDAR) por meio da inibição da succinato desidrogenase, resultando em desequilíbrio das  $[Ca^{2+}]_i$ , estresse oxidativo e apoptose. A adenosina – agonista dos receptores purinérgicos P1 – tem sido descrita por conta das suas funções neuroprotetoras e neuromodulatórias. Assim, estabelecemos dois modelos *in vitro* da HD fundamentados nas neurodiferenciações das linhagens murinas de célula-tronco embrionárias E14-TG2a e progenitoras neurais do hipocampo HT-22; seguidas pelos tratamentos com ácido quinolínico (QA) – agonista seletivo dos NMDARs –, na ausência e na presença do ácido 3-nitropropiónico (3-NP) – inibidor irreversível da succinato desidrogenase. Estes modelos foram utilizados nas avaliações das funções neuroprotetoras da adenosina. Os neurônios pós-mitóticos das culturas de E14-TG2a diferenciadas foram caracterizados conforme os MSNs GABAérgicos do *striatum*; enquanto os neurônios HT-22 diferenciados foram caracterizados de modo inespecífico. Metodologia: imunofluorescência (microscopia e citometria); PCR em tempo real; análise das variações dos potenciais das membranas plasmáticas e das variações transientes das  $[Ca^{2+}]_i$  por microfluorimetria; e quantificações das reduções do AlamarBlue® (% de sobrevivência celular) e das atividades extracelulares de LDH (U/L) (necrose) por espectrometria. Avaliamos a capacidade do 3-NP de potencializar os efeitos excitotóxicos do QA comparando dois grupos de neurônios HT-22 diferenciados: QA 8mM ( $EC_{50}$ ) (controle); e 3-NP 5mM/QA 8mM. Avaliaremos o potencial neuroprotetor da adenosina comparando quatro grupos de neurônios HT-22 diferenciados: QA 8mM; adenosina 250 $\mu$ M/QA 8mM; 3-NP 5mM/QA 8mM; 3-NP 5mM/adenosina 250 $\mu$ M/QA 8mM. Os neurônios pós-mitóticos derivados das E14TG2a foram classificados como MSNs

GABAérgicos do *striatum* integrantes de uma cultura neuronal heterogênea semelhante às conexões nigroestriatais, corticoestriatais, *striatonigral* e *striatopallidal*. Os neurônios HT-22 diferenciados perfaziam uma cultura neuronal heterogênea, não totalmente madura, composta por neurônios glutamatérgicos, dopaminérgicos, colinérgicos e GABAérgicos. Os neurônios HT-22 diferenciados 3-NP 5mM apresentaram menores % de sobrevivência celular após os tratamentos com QA 8mM por 24h ( $p < 0.05$ ); e maiores amplitudes das variações das  $[Ca^{2+}]_i$  dependentes do QA 8mM ( $p < 0.05$ ) (cinética – 6 minutos). Por outro lado, os neurônios HT-22 diferenciados pré-tratados com 3-NP 5mM apresentaram menores atividades extracelulares de LDH após o tratamento com QA 8mM por 24h – menor proporção de necrose. Os pré-tratamentos com adenosina 250 $\mu$ M indicaram uma tendência dos efeitos neuroprotetores ( $p > 0.05$ ) – maiores % de sobrevivência celular; menores atividades extracelulares de LDH; e menores amplitudes das variações transientes das  $[Ca^{2+}]_i$ . Em conjunto, nossos resultados indicam que a inibição da succinato desidrogenase potencializa os efeitos excitotóxicos dos NMDARs por meio da alteração das  $[Ca^{2+}]_i$  e, provavelmente, dos mecanismos de morte celular; enquanto a adenosina apenas tendeu à neuroproteção.

**Palavras-chave:** Doença de Huntington, MSNs GABAérgicos do *striatum*, excitotoxicidade, ácido quinolínico, ácido 3-nitropropiónico, adenosina.



## ABSTRACT

Marques, L. B. **In vitro cell modeling of Huntington's Disease with 3-nitropropionic acid and quinolinic acid and evaluation of the neuroprotective functions of adenosine.** 2022. 110p. Masters Thesis – Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Huntington's disease (HD) is a hereditary neurodegenerative pathology characterized by mutant huntingtin proteins (mHtt) expression, striatum D2-positive GABAergic medium spiny neurons (MSNs) cell death and hyperkinetic motor symptoms development. One hypothesis refers to the principle that mHtt potentiates the excitotoxic effects of NMDA receptor (NMDAR) stimulation by the inhibition of mitochondrial succinate dehydrogenase, resulting in  $[Ca^{2+}]_i$  imbalance, oxidative stress and apoptosis. Adenosine – P1 purinergic receptor agonist – is related to neuroprotective and neuromodulatory functions. Thus, we established two *in vitro* HD models based on the neurodifferentiation of murine embryonic stem cell lines E14-TG2a and hippocampal neuroprogenitor cell line HT-22 followed by treatment with quinolinic acid (QA) – selective agonist of NMDARs –, in the absence and in the presence of 3-nitropropionic acid (3-NP) – irreversible inhibitor of succinate dehydrogenase. These models were used to assess the neuroprotective functions of adenosine. Post-mitotic neurons from differentiated E14-TG2a cultures were characterized according to striatum's GABAergic MSNs; while the differentiated HT-22 neurons were characterized in a non-specific way. Methodology included immunofluorescence (microscopy and cytometry); real-time PCR; analysis of variations in the plasma membrane potentials and of transient variations in the  $[Ca^{2+}]_i$  by microfluorimetry; and quantification of AlamarBlue® reductions (% cell survival) and of extracellular LDH activity (U/L) (necrosis) by spectrometry. We evaluated the ability of 3-NP to potentiate the excitotoxic effects of QA by comparing two groups of differentiated HT-22 neurons: 8mM QA (control); and 5mM 3-NP/8mM QA. We evaluated the neuroprotective potential of adenosine comparing four groups of differentiated HT-22 neurons: QA 8mM; 250 $\mu$ M adenosine/8mM QA; 5mM 3-NP/8mM QA; 5mM 3-NP/250 $\mu$ M adenosine/8mM QA. Postmitotic neurons derived from E14TG2a were classified as striatum's GABAergic MSNs that are part of a heterogeneous neuronal culture similar to nigrostriatal, corticostriatal, striatonigral, and striatopallidal connections. Differentiated HT-22 neurons consisted of a heterogeneous neuronal culture and not fully mature glutamatergic,

dopaminergic, cholinergic and GABAergic neurons. Differentiated HT-22 neurons following 5mM 3-NP treatment showed lower % cell survival after treatments with 8mM QA for 24h ( $p < 0.05$ ); and higher amplitudes of the variations of  $[Ca^{2+}]_i$  induced by 8mM QA ( $p < 0.05$ ) (kinetics – 6 minutes). On the other hand, differentiated HT-22 neurons 5mM 3-NP showed lower extracellular LDH activities after treatment with 8mM QA for 24h – indicating a lower proportion of necrotic cells. Pretreatments with 250 $\mu$ M adenosine indicated a trend towards neuroprotective effects, such as higher percentages of cell survival; lower extracellular LDH activities; and lower amplitudes of transient variations of  $[Ca^{2+}]_i$ . Taken together, our results indicate that succinate dehydrogenase inhibition potentiated the excitotoxic effects of NMDARs by altering  $[Ca^{2+}]_i$  and, probably, cell death mechanisms, while adenosine only to neuroprotection.

**Keywords:** Huntington's disease, GABAergic striatal MSNs, excitotoxicity, quinolinic acid, 3-nitropropionic acid, adenosine.

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SIMBOLOS

$\text{Ca}^{2+}$  – cálcio

$[\text{Ca}^{2+}]_c$  – concentração citoplasmática de cálcio

$[\text{Ca}^{2+}]_i$  – concentração intracelular de cálcio

3-NP – ácido 3-nitropropiónico

ADO – adenosina difosfato

AMP – adenosina mono

AMPA –  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole proprionic acid

ANT – adenina nucleotídeo translocase

ATP – adenosina trifosfato

BDNF – brain derived neurotrophic fator

bFGF – basic fibroblast growth fator; fator de crescimento de fibroblasto básico

BGs – gânglios da base

BMP – bone morphogenetic protein

cAMP – cyclic adenosine monophosphate; monofosfato cíclico de adenosina

cDNA – DNA complementar

CGE – eminência ganglionar caudal

córtico-BGs – córtico-gânglio basais

Dir – Direta

dLGE – dorsal LGE

DMEN – Dulbecco's modified Eagle's medium; meio de Eagle Dulbecco-modificado

DNA – ácido deoxirribonucleico

EB – Corpos embrióides de células-tronco embrionárias

EC – effective concentration; concentração efetiva

ENK – encefalina

ER – Retículo endoplasmático

ESCs – Embryonic Stem Cells; células-tronco embrionárias

FBS – fetal bovine serum; soro fetal bovino

Fmax – fluorescência máxima

Fmin – fluorescência mínima

GAD – glutamato descarboxilase

GAPDH – gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

GLT – glutamate transporters

GPe – globus pallidus externo

GPi – globus pallidus interno

HD – Huntington's disease; Doença de Huntington

HpDr – Hiperdireta

Htt – proteína huntingtina

InDr – Indireta

iNMDAR – receptores NMDA ionotrópicos

IT15 – Interesting Transcript 15

IP3 – inositol-1,4,5-trifosfato

iPSCs – células-tronco pluripotentes induzidas

KA – kainate

KCl – cloreto de potássio

LDH – lactato desidrogenase

LIF – fator inibitório da leucemia

LGE – eminência ganglionar lateral

mESC – Mouse Embryonic Stem Cells; células-tronco embrionárias de camundongos

mHtt – proteína huntingtina mutante

mPTP – mitochondrial permeability transition pore; poro de permeabilidade transitória mitocondrial

MSNs – medium spiny neurons; neurônios espinhais médios

nNOS – óxido nítrico sintase

NMDA – N-methyl-D-aspartate

NMDAR – N-methyl-D-aspartate receptors

NOX-2 – NADPH oxidase-2

NPC – neural progenitor cells; células progenitoras neurais

OXPHOS – fosforilação oxidativa

PD – Parkinson disease; Doença de Parkinson

PDGF – Platelet-derived growth factor

PIP2 – fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato

PFA – paraformaldeído

PKA – proteína quinase A

PKC – proteína quinase C

PLC- $\beta$  – fosfolipase C- $\beta$

poliQ – poliglutamínica

ROS – espécies reativas de oxigênio

SN – substantia nigra

SNC – sistema nervoso central

STN – subthalamic nucleus; núcleo subtalâmico

SVZ – zona subventricular

TH – tirosina hidroxilase

TIM – inner-membrane transporter

TOM – outer-membrane transporter

QA – quinolinic acid; ácido quinolínico

UND – undifferentiated; não diferenciadas

UTP – uridina trifosfato

vLGE – ventral LGE

VZ – zona ventricular

WT – wild type

$\Delta\psi_m$  – potencial transmembrana mitocondrial

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Transcrição, tradução e modificações pós-traducionais das proteínas huntingtina.
- Figura 2** – Disposição dos MSNs GABAérgicos do corpo estriado (*striatum*) no circuito córtico-gânglio basal (córtico-BG).
- Figura 3** – Modelo das vias do controle da coordenação dos movimentos corporais voluntários por meio dos circuitos córtico-BGs.
- Figura 4** – Mecanismos patogênicos celulares na Doença de Huntington.
- Figura 5** – mHtt e disfunções mitocondriais nos MSNs GABAérgicos do *striatum*.
- Figura 6** – Estequiometria e disposição das subunidades GluN1/2 dos receptores glutamatérgicos de NMDA.
- Figura 7** – Receptores purinérgicos.
- Figura 8** – Autorregulação do sistema de sinalização purinérgico e neuromodulação.
- Figura 9** – Etapas do método *five stage* de diferenciação das mESCs E14TG2a em neurônios pós-mitóticos.
- Figura 10** – Caracterização por imunofluorescência dos neurônios pós-mitóticos adquiridos por meio do método *five stage* de neurodiferenciação das mESCs E14TG2a.
- Figura 11** – Os neurônios pós-mitóticos são capazes de despolarizar a membrana plasmática.
- Figura 12** – Medidas de  $\Delta[Ca^{2+}]$  por microfluorimetria.
- Figura 13** – Análise dos mRNAs por meio do método da PCR em tempo real.
- Figura 14** – Análise de biomarcadores neurais por imunofluorescência e leitura em citômetro de fluxo.
- Figura 15** – Avaliação da propriedade do 3-NP de potencializar os efeitos excitotóxicos do QA 8mM em neurônios HT-22 diferenciados.
- Figura 16** – Avaliação do efeito neuroprotetor da adenosina 250 $\mu$ M em neurônios HT-22 diferenciados (controle e 3-NP) tratados com QA 8mM por 24h.

**Figura 17** – Efeito do 3-NP e da adenosina 250 $\mu$ M na liberação de LDH induzida por meio do tratamento dos neurônios HT-22 diferenciados com o agonista QA 8mM.

**Figura 18** – Avaliação dos efeitos do 3-NP 5mM e da adenosina 250 $\mu$ M nas médias das amplitudes máximas das variações transientes da  $[Ca^{2+}]_i$  apresentadas pelos neurônios HT-22 diferenciados e tratados com QA 8mM.

**Figura 19** – Gráficos representativos das determinações das variações transientes das  $[Ca^{2+}]_i$  em culturas de neurônios HT-22 diferenciados.



## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	16
1.1. BASES TEÓRICAS.....	16
1.1.1. Fundamentos da Doença de Huntington (Huntington's disease – HD) .....	16
1.1.2. Neuroembriologia dos neurônios GABAérgicos do <i>Striatum</i> .....	20
1.1.3. Neuroanatomia dos gânglios da base (BGs) .....	21
1.1.4. Neurofisiologia do sistema de circuitos córtico-BGs do controle da coordenação dos movimentos corporais voluntários .....	22
1.1.5. Neurobiologia dos MSNs GABAérgicos do <i>striatum</i> .....	26
1.1.6. Patogenia celular na HD & Excitotoxicidade.....	26
1.1.7. Neurofarmacologia dos MSNs GABAérgicos do <i>striatum</i> .....	35
1.1.7.1. Sistema glutamatérgico.....	35
1.1.7.2. Sistema dopaminérgico .....	36
1.1.7.3. Sistema purinérgico & HD .....	37
1.2. BASES EXPERIMENTAIS.....	46
1.2.1. Modelagem <i>in vitro</i> da HD & Adenosina como alternativa farmacoterapêutica....	46
1.2.2. Protocolo <i>five stage</i> de neurodiferenciação das mESCs em MSNs GABAérgicos do <i>Striatum</i> 48	
1.2.3. Caracterização dos MSNs GABAérgicos do <i>striatum</i> .....	51
2. OBJETIVOS EXPECÍFICOS.....	54
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	56

3.1. Cultivo Celular e Neurodiferenciação .....	56
3.1.1. Células-tronco embrionárias murinas ES-E14TG2a.....	56
3.1.2. HT-22 (Mouse Hippocampal Neuronal Cell Line).....	57
3.2. Caracterização dos neurônios pós-mitóticos.....	57
3.2.1. Microscopia confocal .....	57
3.2.2. Extração de RNA total, síntese de cDNA e PCR em tempo real .....	58
3.2.3. Análise dos potenciais de ação .....	60
3.2.4. Citometria de fluxo .....	60
3.2.5. Ensaio farmacológico.....	61
3.3. Ensaio farmacológico .....	62
3.3.1. Ensaio de citotoxicidade.....	62
3.3.1.1. AlamarBlue® Assay .....	62
3.3.1.2. Determinação das atividades extracelulares de lactato desidrogenase (LDH)....	63
3.3.2. Determinação das variações transientes das $[Ca^{2+}]_i$ por microfluorimetria .....	63
3.4. Análises estatísticas .....	64
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	65
4.1. Caracterização dos MSNs GABAérgicos do <i>striatum</i> .....	65
4.2. Caracterização dos neurônios HT-22 diferenciados .....	71
4.3. Ensaio farmacológico .....	74
5. CONCLUSÕES .....	87

<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>90</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>106</b>
<b>SÚMULA CURRICULAR.....</b>	<b>107</b>

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. BASES TEÓRICAS

### 1.1.1. Fundamentos da Doença de Huntington (Huntington's disease – HD)

A Doença de Huntington (Huntington's disease - HD) é uma patologia neurodegenerativa progressiva de herança autossômica dominante cuja etiologia se refere às poli-inserções do códon CAG no primeiro exon do gene IT15 (Interesting Transcript 15) do cromossomo 4 (4p63) responsável por codificar a proteína huntingtina (Htt) (Figura 1) (Pandey e Rajamma, 2018; Bates *et al.*, 2015; McColgan e Tabrizi, 2017; André *et al.*, 2010). O número de poli-inserções do códon CAG determina a quantidade de resíduos de glutamina na região N-terminal (cauda poliglutamínica - poliQ). O número de resíduos de glutamina na cauda poliQ determina a caracterização das proteínas Htt entre selvagens (*wild type* - WT) e mutantes (mHtt). As proteínas Htt selvagens apresentam caudas poli-Q N-terminais polimórficas com sequências de 6-35 resíduos de glutamina. As proteínas mHtt apresentam caudas poliQ N-terminais com números superiores a 40 unidades de glutamina - cauda poliQ alongada (Bates *et al.*, 2015; Walling *et al.*, 1998; Perez-de La Cruz e Santamaria, 2007; Cisbani e Cicchetti, 2012; Pandey e Rajamma, 2018). Indivíduos que não herdaram a mutação expressam apenas proteínas Htt, enquanto indivíduos que herdaram a mutação expressam tanto Htt como mHtt - haja vista o efeito letal do *knockout* do gene HTT (Sepers e Raymond, 2014; Pandey e Rajamma, 2018). Embora as proteínas Htt e mHtt sejam expressas em todas as células do organismo, os neurônios piramidais corticais glutamatérgicos e os neurônios espinhais médios (*medium spiny neurons* - MSNs) GABAérgicos do *striatum* são os mais afetados pelos efeitos citotóxicos da mHtt (Walling *et al.*, 1998; Tong *et al.*, 2011; Sepers e Raymond, 2014; Girling e Wang, 2016).

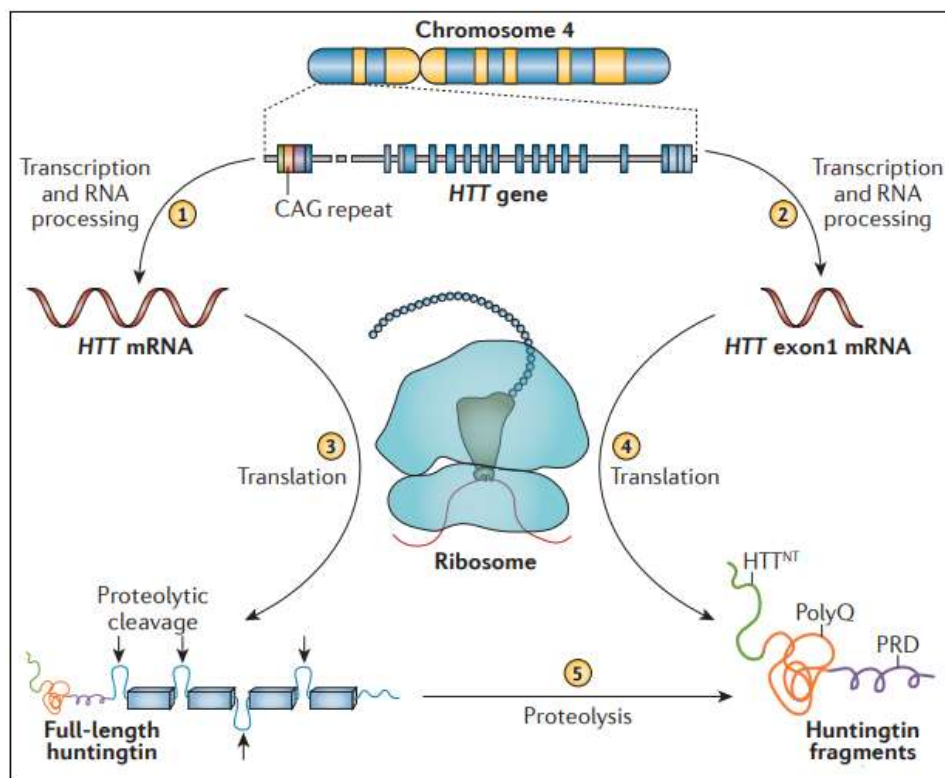


Figura 1. Transcrição, tradução e modificações pós-traducionais das proteínas huntingtina. A expressão do gene *HTT* pode transcrever um mRNA relativo à *Htt* (1) ou mRNAs contendo regiões do exon 1 com aumento do número de repetições do códon CAG referentes às proteínas huntingtina mutantes (*mHtt*) (2). As traduções dos mRNAs produzem proteínas *Htt* ainda não processadas (3) e *mHtts* contendo regiões poliglutamínicas (poliQ) expandidas (4). Os processamentos finais das proteínas *Htt* e *mHtt* ocorrem, principalmente, por meio das clivagens proteolíticas (5). Modificado de Bates *et al.* (2015).

Os MSNs GABAérgicos do *striatum* constituem as conexões córtico-gânglio basais (córtico-BGs) corticoestriatais (Sepers e Raymond, 2014). As comunicações sinápticas corticoestriatais se fundamentam na neurotransmissão glutamatérgica por intermédio dos receptores de NMDA (*N-methyl-D-aspartate receptors* – NMDAR) cujo segundo-mensageiro é o  $\text{Ca}^{2+}$  (Bunner e Rebec, 2016; Shipp, 2017; Vyklicky *et al.*, 2014; Hansen *et al.*, 2018; Galvan *et al.*, 2012). A expressão de *mHtt* também resulta em alterações sinápticas correlacionadas às disfunções nos sistemas das sinalizações dopaminérgicas, canabíoides, colinérgicas, purinérgicas e por BDNF (Sepers e Raymond, 2014; Gianfriddo *et al.*, 2003; Popoli *et al.*, 2002; Chiu *et al.*, 2015; Ferrante *et al.*, 2010; Díaz-Hernandez *et al.*, 2009). Os MSNs GABAérgicos D2-positivos do *striatum* - integrante da via indireta do circuito córtico-BG – são os principais a sofrerem neurodegeneração na HD (Sepers e Raymond, 2014).

A semiologia da HD objetiva correlacionar os processos neurodegenerativos localizados nas conexões corticoestriatais ao desenvolvimento dos sinais e sintomas de cognitivos, motores, psíquicos e psiquiátricos (Shepherd, 2013; Sepers e Raymond, 2014; Rangel-Barajas e Rebec, 2016). Além disso, a HD não possui cura e os tratamentos medicamentosos se fundamentam no quadro clínico sintomatológico (Bates et al., 2015; Labbadia e Morimoto, 2013; Sepers e Raymond, 2014; McColgan e Tabrizi, 2017; Pandey e Rajamma, 2018). Dentre os sintomas, os movimentos corporais hipercinéticos caracterizam a ‘Coreia de Huntington’ (André *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2013). Assim sendo, abordaremos o circuito córtico-gânglio basal (córtico-BG) em detalhes, pois se refere a um dos circuitos neuronais constituídos por meio dos MSNs GABAérgicos D2-positivos do *striatum* – responsáveis pelas funções inibitórias do controle da coordenação dos movimentos corporais voluntários.

O controle da coordenação dos movimentos corporais voluntários funciona por meio das diversas conexões sinápticas do circuito córtico-BG (Lanciego *et al.*, 2012; Shipp, 2017). Os circuitos córtico-BGs são constituídos por neurônios do córtex cerebral e por neurônios da secção dorsal dos gânglios da base (BGs) (DeLong e Thomas, 2007; Lanciego *et al.*, 2012; Shipp, 2017). O circuito córtico-BG se inicia a partir das eferências dos neurônios piramidais corticais glutamatérgicos. Estas eferências corticais glutamatérgicas, no sentido dos neurônios glutamatérgicos do núcleo subtalâmico (*subthalamic nucleus* - STN), constituem as conexões córtico-subtalâmicas (*cortico-subthalamic nucleus connection*); enquanto no sentido dos MSNs GABAérgicos do *striatum*, constituem as conexões sinápticas corticoestriatais (Sano *et al.*, 2013; Lanciego *et al.*, 2012; Huerta-Ocampo *et al.*, 2014; Ploktin e Goldberg, 2018).

As conexões corticoestriatais são formadas por uma de duas classes de MSNs GABAérgicos do *striatum* caracterizadas conforme os padrões previstos de expressão molecular (Figura 2) (Sano *et al.*, 2013; Shipp, 2017; Ploktin e Goldberg, 2018). Estas conexões corticoestriatais constituem uma das vias do sistema de controle da coordenação dos movimentos corporais voluntários ('direta' e 'indireta') (Sano *et al.*, 2013; Lanciego *et al.*, 2012; Shipp, 2017; Ploktin e Goldberg, 2018). Os MSNs GABAérgicos D1-positivos constituem as conexões corticoestriatais da via direta cuja função é estimular os movimentos corporais voluntários (Lanciego *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2015; Ploktin e Goldberg, 2018); enquanto os MSNs GABAérgicos D2-positivos constituem as conexões corticoestriatais da via indireta cuja função é

inibir os movimentos corporais voluntários (Lanciego *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2015; Ploktin e Goldberg, 2018). Por outro lado, as conexões córtico-subtalâmicas constituem a via hiperdireta cuja função é inibir os movimentos corporais voluntários (Lanciego *et al.*, 2012). O predomínio das atividades da via direta resulta no aumento da frequência dos movimentos corporais (hipercinesia) (ex.: HD) (Ploktin e Goldberg, 2018). Em contrapartida, os predomínios das atividades associadas às vias indireta e hiperdireta resultam em diminuição das frequências dos movimentos corporais voluntários (hipocinesia) (ex.: *Parkinson disease* – PD) (Ploktin e Goldberg, 2018). Deste modo, a neurodegeneração dos MSNs GABAérgicos D2-positivos do *striatum* fundamenta as explicações a respeito das manifestações dos sintomas motores hiperkinéticos característicos da coreia de Huntington (André *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2013).

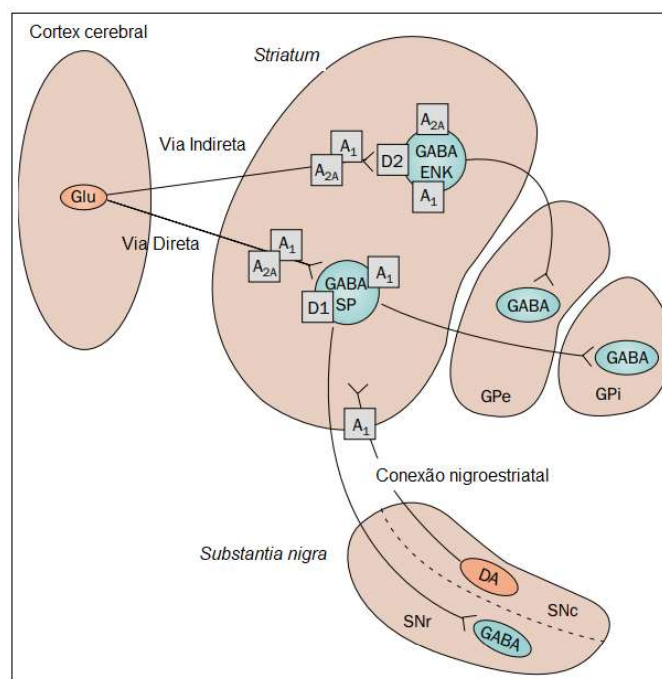


Figura 2. Disposição dos MSNs GABAérgicos do corpo estriado (*striatum*) no circuito córtico-gânglio basal (córtico-BG). A figura representa um segmento do circuito córtico-BG referentes às vias do controle da coordenação motora. Os neurônios piramidais glutamatérgicos do córtex se projetam no sentido do *striatum* formando as conexões corticoestriatais. Os neurônios piramidais corticais glutamatérgicos expressam receptores purinérgicos A<sub>1</sub> e A<sub>2A</sub> em seus terminais sinápticos. Os MSNs GABAérgicos do *striatum* integrantes da via direta do controle da coordenação motora – circuito *striatonigral* – expressam, além de GABA, receptores A<sub>1</sub>, D1 e substância P (SP). Os MSNs GABAérgicos do *striatum* integrantes da via indireta do controle da coordenação motora – circuito *striatopallidal* – expressam, além de GABA, receptores A<sub>2A</sub>, A<sub>1</sub>, D2 e encefalina (ENK). A figura também representa os circuitos nigroestriatal e estriatonigral – projeções dos neurônios dopaminérgicos da *substantia nigra pars compacta* (SNc) no

sentido dos MSNs GABAérgicos do *striatum* e projeções dos MSNs GABAérgicos do *striatum* no sentido dos neurônios dopaminérgicos da SNc, respectivamente. Os MSNs GABAérgicos do *striatum* integrantes da via indireta encontram-se preponderantemente neurodegenerados na HD. Modificado de Blum *et al.* (2003).

### **1.1.2. Neuroembriologia dos neurônios GABAérgicos do *Striatum***

Segundo Geater (2014), células-tronco (*stem cells*) são células indiferenciadas que se multiplicam indefinidamente. As células filhas podem manter-se no estágio indiferenciado, conservando as propriedades proliferativas das células precursoras; ou, mediante influências de vias de sinalização específicas, diferenciar-se em demais subtipos de células progenitoras – algumas poderão adquirir e preservar-se em estágios de diferenciação intermediários (células-tronco adultas - *adult stem cells*) que são caracterizadas pela propriedade de multipotência (diferente das primeiras que poderão ser totipotentes ou pluripotentes). Multipotência é a capacidade de diferenciar-se em vários subtipos de células maduras, conforme o tecido onde se localizam. Pluripotência é a capacidade de diferenciar-se em qualquer célula do desenvolvimento embrionário, exceto do tecido extraembrionário (ex.: placenta). Quando as células-tronco pluripotentes são denominadas "células-tronco embrionárias" (*Embryonic Stem Cells* - ESCs) quando obtidas a partir do isolamento da massa interna do embrião em desenvolvimento (blastocisto) (Fraichard, A. *et al.*, 1995; Hancock, 2000; Geater, C., 2014; Martello e Smith, 2014; Strubing, C. *et al.*, 1995). Em síntese, células-tronco apresentam dois possíveis destinos: células filhas com potenciais de desenvolvimento e proliferação semelhantes às da linhagem precursora; e células filhas especializadas para a diferenciação (Martello e Smith, 2014).

Cronologicamente, as ESCs, quando reimplantadas na massa interna do blastocisto, iniciam o processo de diferenciação a partir da formação da ectoderme primitiva que, por sua vez, originará, através do processo de gastrulação, os três folhetos embrionários: ectoderme, mesoderme e endoderme (Rathjen *et al.*, 1999). Adiante, a neuroectoderme se forma a partir da ectoderme e mediante as influências da mesoderme (Rathjen *et al.*, 1999). Assim, a origem embrionária dos neurônios espinhosos médios (*medium spiny neurons* - MSNs) do corpo estriado (*striatum*) ocorre por meio de um rito conhecido: neuroindução das células da ectoderme e formação da neuroectoderme; neurulação e conseqüente formação do tubo neural; padronização do eixo longitudinal Ântero-Posterior, dobramento e subdivisão em quatro estruturas anatômicas, duas anteriores (telencéfalo e diencéfalo – formadas a partir do prosencéfalo) e duas posteriores (mesencéfalo e rombencéfalo) (Evans, A. E. *et al.*, 2012; Geater, C., 2014).



O telencéfalo é subdividido em *pallium* e subpallium (Evans, A. E. et al., 2012; Geater, C., 2014). A partir do *pallium* se origina o neocortex; enquanto a partir do *subpallium* se origina o corpo estriado, o globo palido, o bulbo olfatório e alguns neurônios do córtex. O *subpallium*, após uma rápida migração de neurônios pós-mitóticos, se subdivide em três subestruturas anatômicas denominadas eminência ganglionar lateral (LGE), eminência ganglionar medial (MGE) e eminência ganglionar caudal (CGE) (Evans, A. E. et al., 2012; Geater, C., 2014). A LGE será o sítio epigênico do *caudate* e do *putamen*; assim como o local necessário à manifestação de duas outras subdivisões, as quais são denominadas dorsal LGE (dLGE) e ventral LGE (vLGE), conforme o padrão de expressão genica regional (Evans, A. E. et al., 2012). Existem duas zonas proliferativas denominada "zona ventricular (VZ)" e "zona subventricular (SVZ)" no interior do neuroepitélio circundado pelo telencéfalo. A região VZ é o sítio epigênico dos interneurônios GABAérgicos (secretadores de  $\gamma$ -aminobutyric acid - GABA), a partir da qual estas células migram no sentido das localizações anatômicas onde são observados nos cérebros de animais maduros (Geater, C., 2014). Os MSNs constituem cerca de 90% do LGE (Geater, C., 2014).

As subestruturas dos gânglios da base (*basal ganglia*, BG) denominadas núcleo caudado, putamen e núcleo accumbens constituem a superestrutura 'corpo estriado' (*striatum*) (Geater, C., 2014). O *striatum* desenvolve funções correlacionadas ao controle da coordenação motora primária, assim como às vias das emoções e da cognição (Evans, A. E. et al., 2012). O *striatum* apresenta 95% de sua superfície constituída por meio dos MSNs GABAérgicos (Sepers e Raymond, 2014; Geater, C., 2014). Os MSNs GABAérgicos são as células mais afetadas na HD (Bates, B. et al., 2013).

### 1.1.3. Neuroanatomia dos gânglios da base (BGs)

Os gânglios da base (BGs) são constituídos por um conjunto de estruturas anatômicas subcorticais interligadas (Lanciego *et al.*, 2012; Haber, 2016). Estas estruturas são subclassificadas conforme as regiões em torno do eixo longitudinal do sistema nervoso central (SNC). Na secção dorsal encontra-se *neostriatum* (caudate e putamen), *globus pallidus* (externo, GPe; e interno, GPi), *substantia nigra* (SN) e *subthalamic nucleus* (STN); enquanto na secção ventral encontra-se núcleo accumbens e tubérculo olfatório. A secção ventral foi correlacionada aos mecanismos de recompensa e reforço (áreas límbicas); a secção central à cognição; e a secção dorsal ao controle da coordenação motora.

#### 1.1.4. Neurofisiologia do sistema de circuitos córtico-BGs do controle da coordenação dos movimentos corporais voluntários

Os neurônios do córtex motor atuam em conjunto com os neurônios da secção dorsal a fim de coordenar os movimentos corporais voluntários selecionados por meio dos processos cognitivos e emocionais (Shipp, 2017; Ploktin e Goldberg, 2018). Estas conexões sinápticas constituem um sistema de circuitos genericamente conhecidos como córtico-BGs, os quais apresentam funções correlacionadas ao controle da coordenação dos movimentos corporais voluntários (Ploktin e Goldberg, 2018). Os neurônios piramidais glutamatérgicos do córtex motor apresentam sítios eferentes em neurônios do *striatum* e do *subthalamic nucleus* (STN) (Sano *et al.*, 2013; Huerta-Ocampo *et al.*, 2014; Ploktin e Goldberg, 2018). O sistema de circuitos córtico-BGs correlacionados às funções motoras é constituído por três vias conhecidas como direta, indireta e hiperdireta (Figura 3) (Sano *et al.*, 2013; Shipp, 2017).

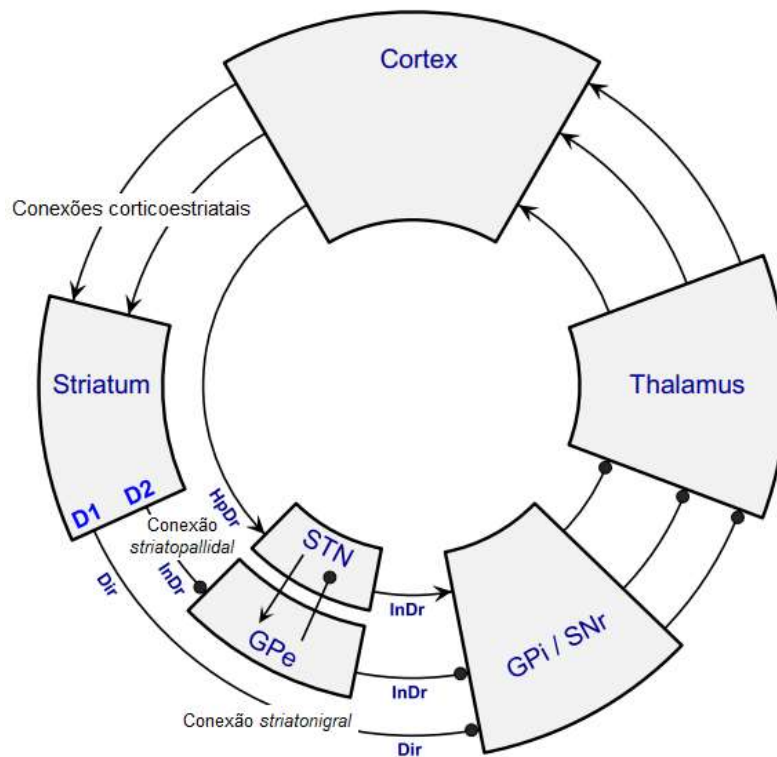


Figura 3. Modelo das vias do controle da coordenação dos movimentos corporais voluntários por meio dos circuitos córtico-BGs. Estes três *loops* representam as vias hiperdireta (HpDr), indireta (InDr) e direta (Dir). Anatomicamente, as vias se distinguem apenas nos segmentos localizados anteriormente ao GPi/SNr. As vias direta e indireta são integradas pelos MSNs GABAérgicos do *striatum*. Os MSNs GABAérgicos do *striatum* integrantes da via direta expressam receptores D1, enquanto os MSNs GABAérgicos do *striatum* integrantes da via indireta expressam

receptores D2. Por meio da via hiperdireta, a partir dos neurônios piramidais corticais glutamatérgicos, a excitação dos neurônios glutamatérgicos do núcleo subtalâmico (STN) promove a estimulação excitatória dos neurônios GABAérgicos (inibitórios) do GPi/SNr. Por meio da via indireta, a excitação dos MSNs GABAérgicos D2-positivos do *striatum* resulta na inibição dos neurônios GABAérgicos do GPe, os quais deixam de inibir os neurônios do STN, promovendo a excitação dos neurônios do GPi/SNr. Por meio da via direta, a excitação dos MSNs GABAérgicos D2-positivos do *striatum* resulta na inibição dos neurônios do GPi/SNr. A estimulação dos neurônios do GPi/SNr promove a inibição dos neurônios glutamatérgicos do tálamo, o que resulta na desestimulação dos neurônios corticais e, conseqüentemente, em hipocinesia – mecanismos de *feedback* negativo. Por outro lado, a inibição dos neurônios do GPi/SNr resulta em desinibição dos neurônios glutamatérgicos do tálamo e, conseqüentemente, estimulação dos neurônios corticais e produção de hipercinesia – mecanismos de *feedback* positivo. Modificado de Shipp (2017).

As vias direta e indireta se iniciam a partir dos neurônios piramidais corticais glutamatérgicos que se projetam no sentido dos MSNs GABAérgicos do *striatum* (Lanciego *et al.*, 2012; Huerta-Ocampo *et al.*, 2014; Ploktin e Goldberg, 2018). Estes neurônios se conectam por meio das conexões sinápticas córtico-BGs corticoestriatais (Shipp, 2017). As conexões corticoestriatais são consideradas os primeiros sítios de resistência da série de circuitos cortico-BGs correlacionados às funções de coordenação dos movimentos corporais voluntários (Sano, H. *et al.*, 2013; Ploktin e Goldberg, 2018). Os MSNs GABAérgicos do *striatum* são as principais células receptoras das informações neurais direcionadas aos BGs (Lanciego *et al.*, 2012). Eles apresentam elevada densidade dendrítica e integram *inputs* advindos do córtex, do tálamo e do tronco-cerebral. Quando estimulados pelo neurotransmissor excitatório glutamato, os MSNs GABAérgicos secretam o neurotransmissor inibitório GABA (aminoácido gamma-amino butírico, GABA) em seus terminais sinápticos. (Ploktin e Goldberg, 2018). Em cérebro de roedores, o *striatum* é a principal unidade de processamento dos BGs, sendo aproximadamente 90% de sua massa constituída pelos MSNs GABAérgico (Lanciego *et al.*, 2012; Ploktin e Goldberg, 2018; Chen *et al.*, 2013).

A via direta se inicia a partir dos MSNs GABAérgicos do *striatum* que se projetam monosinápticamente no sentido dos neurônios GABAérgicos do GPi (Lanciego *et al.*, 2012; Huerta-Ocampo *et al.*, 2014; Ploktin e Goldberg, 2018). Além disso, os MSNs GABAérgicos da via direta também apresentam eferências no sentido dos neurônios GABAérgicos e dopaminérgicos da SNr (circuito *striatonigral*). Quando os neurônios GABAérgicos do GPi/SNr são inibidos por meio dos estímulos advindos dos MSNs GABAérgicos do *striatum*, os primeiros deixam de secretar o aminoácido GABA em seus terminais sinápticos aferentes aos neurônios

piramidais talâmicos glutamatérgicos, o que resulta na desinibição deste último. Deste modo, neurônios piramidais talâmicos glutamatérgicos retomam a secreção de um excesso de glutamato em seus terminais sinápticos localizados em conexões tálamo-corticais. O estímulo excitatório do aminoácido neurotransmissor glutamato sobre os neurônios piramidais corticais resulta em aumento da liberação de glutamato nas fendas sinápticas das conexões corticoestriatais. A reestimulação dos MSNs GABAérgicos do *striatum* da via direta representa um mecanismo de *feedback positivo* (Lanciego *et al.*, 2012; Ploktin e Goldberg, 2018). O desfecho neurofisiológico da via direta é a facilitação dos movimentos corporais (Freeze *et al.*, 2013) (Lanciego *et al.*, 2012) (Ploktin e Goldberg, 2018).

A via indireta é constituída por MSNs GABAérgicos do *striatum* que apresentam *outputs* em neurônios GABAérgicos do GPe (circuito *Striatopallidal*) (Lanciego *et al.*, 2012; Huerta-Ocampo *et al.*, 2014; Ploktin e Goldberg, 2018). Os neurônios GABAérgicos do GPe apresentam conexões sinápticas inibitórias sobre os neurônios subtalâmicos glutamatérgicos. Desta forma, a estimulação dos MSNs GABAérgicos do *striatum* promove a inibição dos neurônios GABAérgicos do GPe. Neurônios GABAérgicos do GPe, quando inibidos, deixam de inibir os neurônios glutamatérgicos subtalâmicos (*subthalamic nucleus* - STN). Neurônios glutamatérgicos subtalâmicos, desinibidos, retomam a liberação de glutamato em seus terminais sinápticos aferentes aos neurônios GABAérgicos do GPi/SNr. A estimulação excitatória dos neurônios GABAérgicos do GPi/SNr resulta em aumento da secreção (ou liberação) de GABA em seus terminais sinápticos aferentes aos neurônios piramidais talâmicos glutamatérgicos. A inibição dos neurônios piramidais talâmicos glutamatérgicos resulta em diminuição da liberação de glutamato nas fendas sinápticas das conexões tálamo-corticais. Por consequência, os neurônios piramidais corticais glutamatérgicos, não estimulados, diminuem a liberação de glutamato em seus terminais sinápticos aferentes às conexões corticoestriatais. Deste modo, a diminuição dos estímulos corticais por meio da ativação dos MSNs GABAérgicos do *striatum* da via indireta trata-se de um mecanismo de *feedback negativo* (Lanciego *et al.*, 2012; Shipp, 2017; Ploktin e Goldberg, 2018). O desfecho será a redução da atividade motora voluntária (movimentos hipocinéticos) (Freeze *et al.*, 2013; Lanciego *et al.*, 2012; Shipp, 2017; Ploktin e Goldberg, 2018).

A via hiperdireta (*hyperdirect pathway*) se inicia a partir dos neurônios piramidais corticais glutamatérgicos aferentes aos neurônios glutamatérgicos do STN (Sano, H. *et al.*, 2013). Desta

forma, os neurônios piramidais corticais glutamatérgico liberam o aminoácido glutamato em terminações nervosas aferentes aos neurônios glutamatérgicos do STN. Quando estimulados, os neurônios glutamatérgicos do STN aumentam a liberação de glutamato em suas terminações nervosas aferentes aos neurônios GABAérgicos do núcleo motor do GPi/SNr (Sano, H. et al., 2013). A estimulação dos neurônios GABAérgicos do núcleo motor do GPi/SNr resulta no aumento da liberação do neurotransmissor inibitório GABA nas conexões sinápticas estriado-talâmicas. A inibição dos neurônios piramidais talâmicos glutamatérgicos pelos neurônios GABAérgicos do GPi/SNr provoca uma diminuição da liberação do aminoácido glutamato nas conexões sinápticas tálamo-corticais (Sano, H. et al., 2013; Shipp, 2017). Deste modo, a inibição (ou desestimulação) dos neurônios piramidais corticais glutamatérgicos configura um mecanismo de *feedback negativo*. O desfecho será a diminuição da atividade motora (hipocinesia) (Sano, H. et al., 2013; Shipp, 2017).

Outro circuito capaz de influenciar as funções de controle da coordenação dos movimentos corporais voluntários é o nigroestriatal (Flores-Barrera *et al.*, 2011; Lanciego *et al.*, 2012; Ploktin e Goldberg, 2018). As conexões nigroestriatais são constituídas por meio dos contatos sinápticos entre os neurônios dopaminérgicos da SNc e seus eferentes MSNs GABAérgico do *striatum* da via direta e indireta. A estimulação dos neurônios dopaminérgicos da SNc pode resultar em ativação dos receptores D1 expressos em MSNs GABAérgicos da via direta, o que produz um aumento da atividade da via direta por meio do aumento da liberação de GABA em células do GPi. Por outro lado, a ativação dos receptores D2 expressos em MSNs GABAérgicos da via indireta inibe a liberação de GABA em seus terminais pré-sinápticos, o que resulta em uma diminuição da atividade da via indireta. Este mecanismo de neuromodulação permite aumentar a atividade da via direta e diminuir a atividade da via indireta. O desfecho será a inibição da liberação de GABA nas terminações nervosas dos neurônios GABAérgicos do GPi/SNr aferentes aos neurônios glutamatérgicos do tálamo. Deste modo, a estimulação dopaminérgica resulta em um aumento da atividade corporal voluntária, pois diminui o número de *inputs* inibitórios dos BGs em neurônios glutamatérgicos excitatórios do tálamo, aumentando, conseqüentemente, os números de *inputs* excitatórios nos neurônios piramidais corticais glutamatérgicos (Lanciego *et al.*, 2012).

Desta forma, a HD configura o quadro clínico de hiperkinesia, pois trata-se de uma consequência da perda dos MSNs GABAérgicos D2-positivos (via indireta). Este mecanismo é

explicado por meio das funções inibitórias persistentes dos MSNs GABAérgicos D1-positivos da via direta sobre os neurônios GABAérgicos do GPi/SNr cujas diminuições dos *outputs* permitem uma ativação constante dos neurônios corticais motores pelos neurônios glutamatérgicos talâmicos. Por outro lado, na PD, os movimentos corporais diminuídos (hipocinesia) trata-se de um reflexo da perda dos neurônios dopaminérgicos SNc, o que resulta em um aumento da atividade inibitória dos neurônios GABAérgicos do GPi/SNr e, conseqüentemente, diminuição da ativação motora por meio do aumento da inibição dos neurônios do tálamo e do córtex motor. Este desfecho é explicado por meio da diminuição da atividade da via direta e por meio do aumento da atividade da via indireta.

#### **1.1.5. Neurobiologia dos MSNs GABAérgicos do *striatum***

Duas classes de MSNs GABAérgicos do *striatum* foram descritas, conforme as propriedades imunocitoquímicas, conexões/vias de integração e funções neurofisiológicas: MSNs que co-expressam GABA, substância P e receptores de dopamina D1 - apresentam eferências em neurônios GABAérgicos do GPi/SNr (circuito *striatonigral* - via direta) e se correlacionam às funções hipercinéticas; e MSNs que co-expressam GABA, encefalina, receptores purinérgicos A<sub>2A</sub> e receptores de dopamina D2 - apresentam eferências em neurônios GABAérgicos do GPe (circuito *striatopallidal* - via indireta) e se correlacionam às funções hipocinéticas (Lanciego *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2013; Shepherd, G. M. G., 2013; Shipp, 2017; Rangel-Barajas e Rebec, 2016; Ploktin e Goldberg, 2018; Amita, H. et al., 2019). Em pacientes da HD, os MSN GABAérgico D2-positivo são os principais a sofrerem neurodegeneração (Reiner et al., 1988; Shepherd, 2013; Rangel-Barajas e Rebec, 2016; Amita et al., 2019).

#### **1.1.6. Patogenia celular na HD & Excitotoxicidade**

As conexões corticoestriatais permitem o estabelecimento das sinápses entre os neurônios piramidais corticais glutamatérgicos e os MSNs GABAérgicos do *striatum*, as quais são intermediadas pelos receptores glutamatérgicos de NMDA cujo segundo-mensageiro é o Ca<sup>2+</sup> (Galvan *et al.*, 2012; Vyklicky *et al.*, 2014; Bunner e Rebec, 2016; Shipp, 2017; Hansen *et al.*, 2018). Na HD, os MSNs GABAérgicos do *striatum* D2R-positivos são os primeiros a sofrerem neurodegeneração (Goodliffe *et al.*, 2018). As proteínas mHtt apresentam propriedades citotóxicas determinadas a partir de fatores como a perda das funções da Htt, dificuldade de depuração da mHtt, formação de agregados proteicos (citoplasmáticos e nucleares), predisposição

ao estresse oxidativo, disfunções nos sistemas de transcrição e das deficiências nos sistemas autofágicos (Figura 4) (Walling et al., 1998; Tong et al., 2011; Sepers e Raymond, 2014; Bates *et al.* 2015; Girling e Wang, 2016; Pandey e Rajamma, 2018). Em vista disso, a predominância de MSNs GABAérgicos D2-positivos neurodegenerados é explicada a partir da validação de uma das duas hipóteses teóricas que se referem à vulnerabilidade aos efeitos deletérios dos fenômenos excitotóxicos glutamato-dependentes (H1) e à sensibilidade aos efeitos citotóxicos da mHtt (H2); assim como a partir de uma terceira hipótese (H3) referente à potencialização dos fenômenos excitotóxicos glutamato-dependentes por meio dos efeitos citotóxicos da mHtt (Zeron *et al.*, 2004; Sepers e Raymond, 2014; André *et al.*, 2010; Kalani *et al.*, 2018). Neste sentido, as principais hipóteses teóricas a respeito das causas das mortes preferenciais dos MSNs GABAérgicos do *striatum* versam a respeito das capacidades das proteínas mHtt de potencializarem os efeitos excitotóxicos dos aumentos das  $[Ca^{2+}]_i$  dependentes dos influxos de  $Ca^{2+}$  extracelular através dos receptores de NMDA ionotrópicos (iNMDARs) extrasinápticos (Paoletti *et al.*, 2008; Milnerwood *et al.*, 2010; Fan *et al.*, 2012; Milnerwood *et al.*, 2012; Sepers e Raymond, 2014; Girling e Wang, 2016).

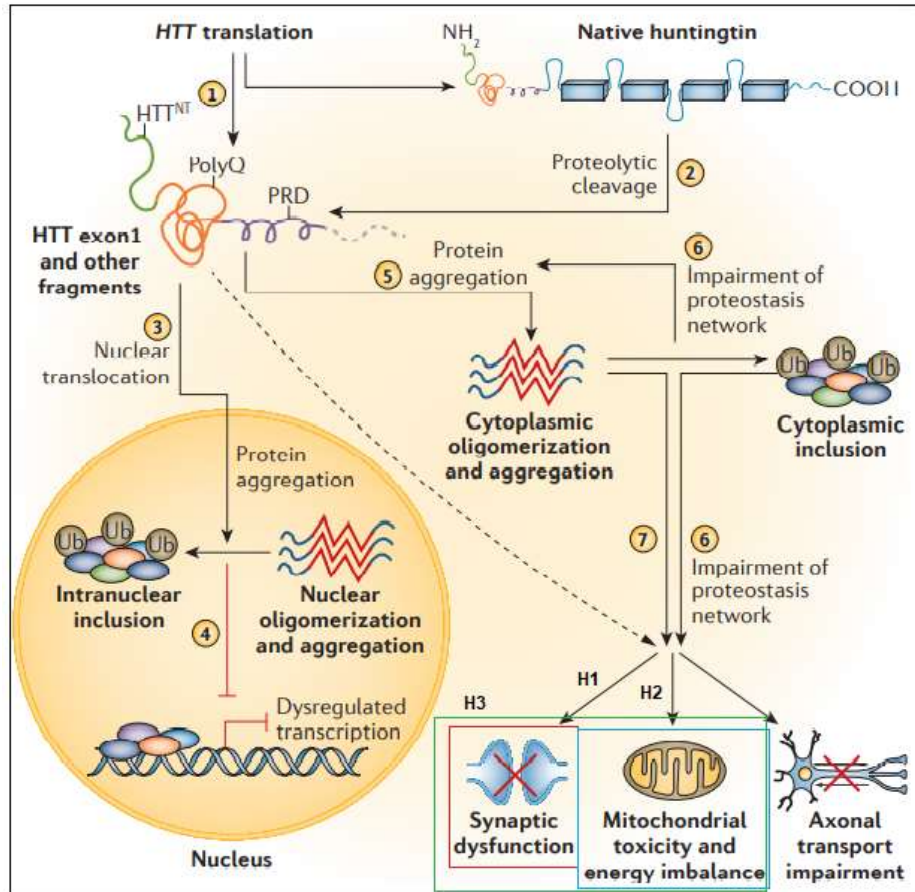


Figura 4. Mecanismos patogênicos celulares na Doença de Huntington. (1) Transcrição do gene HTT e produção da proteína huntingtina de tamanho completo (*full-length huntingtin protein*) – antes de sofrer modificação pós-traducional. O comprimento da região poli-Q varia conforme o número de repetições do códon CAG no exon 1 do gene HTT. (2) Clivagem das proteínas huntingtinas de tamanho completo por proteólise – produção de fragmentos protéicos. (3) Entrada dos fragmentos protéicos no núcleo da célula. (4) Formação de inclusões de fragmentos protéicos, e resultante desregulação transcripcional. (5) Fragmentos das proteínas huntingtina formam agregados citoplasmáticos. (6) A agregação das proteínas huntingtina aumenta por meio das disfunções nos sistemas proteostáticos, resultando nas disfunções celulares. (7) As proteínas huntingtina mutantes resultam em disfunções celulares adicionais, incluindo as disfunções sinápticas, toxicidade mitocondrial e diminuição da taxa de transporte axonal. Demos ênfase aos mecanismos associados às disfunções sinápticas (quadro em vermelho) e às toxicidades mitocondriais (quadro em azul), pois se correlacionam, respectivamente, à hipótese teórica ‘H1’ referente à vulnerabilidade aos fenômenos excitotóxicos glutamato-dependentes e à hipótese teórica ‘H2’ referente à sensibilidade aos efeitos citotóxicos das proteínas mHtt – inibição do complexo mitocondrial II (succinato desidrogenase). O quadro em verde refere-se à hipótese teórica ‘H3’ relativa aos efeitos citotóxicos sinérgicos entre as estimulações dos receptores glutamatérgicos de NMDA e as inibições dos complexos mitocondriais II pelas mHtts. Modificado de Bates *et al.* (2015).



A excitotoxicidade conceitua-se como um evento neurotóxico secundário caracterizado por meio de um rápido influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular seguido pelos aumentos exacerbados das concentrações citoplasmáticas de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]_c$ ), os quais resultam na ativação de uma série de cascatas de sinalização correlacionadas à morte celular (Tehse e Taghibiglou, 2018). Outro conceito se fundamenta nas características dos fenômenos excitotóxicos que se resultam dos efeitos citotóxicos das estimulações farmacológicas dos receptores excitatórios cujos mecanismos de transdução do sinal promovem a despolarização das membranas plasmáticas celulares a partir do aumento das concentrações citoplasmáticas do segundo-mensageiro  $\text{Ca}^{2+}$  (Dong *et al.*, 2009; Stanika *et al.*, 2012).

As duas principais hipóteses teóricas de mecanismo excitotóxico são denominadas “calcium loading” e “source specificity” (Stanika *et al.*, 2012). Estas hipóteses objetivam correlacionar os aumentos excessivos das  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  às mortes neuronais. A hipótese “calcium loading” correlaciona os aumentos dos níveis citoplasmáticos de  $\text{Ca}^{2+}$  de modo diretamente proporcional às mortes neuronais. A hipótese “source specificity” correlaciona os aumentos das variações transientes das  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  de modo diretamente proporcional às porcentagens (%) de neurônios mortos em função das crescentes concentrações dos fármacos agonistas dos NMDARs.

Discussões a respeito das causas eficientes às mortes neuronais por excitotoxicidade convergem em hipóteses que objetivam compreender os aumentos universais das  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  e as estimulações necessárias dos  $\text{iNMDARs}$  (Stanika *et al.*, 2012; Minnella *et al.*, 2018). Assim, o  $\text{Ca}^{2+}$  trata-se de um intermediário comum aos fenômenos excitotóxicos – sendo uma causa material, universal e necessária à excitotoxicidade (Tymianski *et al.*, 1993; Duchon, 2012). O glutamato, por sua vez, representa uma causa eficiente, necessária, porém, não universal à excitotoxicidade – haja vista a existência dos fenômenos excitotóxicos glutamato-independentes (Tehse e Taghibiglou, 2018).

Os fenômenos excitotóxicos foram caracterizados por meio das variações transientes das  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , sendo os seus perfis bifásicos de aumento das  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  correlacionados às morte neuronais devido à excitotoxicidade (Tymianski *et al.*, 1993; Abramov *et al.*, 2008). A primeira fase de aumento das  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  se constitui a partir de uma rápida variação transiente das  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  que decai em minutos, e se fundamenta no influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular. A segunda fase representa um comportamento de manutenção das  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  aumentadas, caracterizado por sustentabilidade e

irreversibilidade, sendo correlacionado de modo diretamente proporcional às iminentes mortes celulares programadas (apoptose). Embora a segunda fase dos fenômenos excitotóxicos seja considerada um indício de morte neuronal; a primeira fase, correlacionada aos influxos transmembrana, trata-se de uma função prévia, universal e necessária à morte celular devido à excitotoxicidade.

Na literatura científica, o glutamato é o principal estímulo inicial descrito de forma correlacionada à excitotoxicidade (Tehse e Taghibiglou, 2018). Da mesma forma, na HD, a excitotoxicidade se correlaciona à estimulação dos NMDARs e a fatores como: liberação acentuada do glutamato; recaptção defeituosa do glutamato; aumento da sensibilidade dos receptores glutamatérgicos; e disfunções nos mecanismos de transdução de sinal (Sepers e Raymond, 2014; Girling e Wang, 2016). Assim, o sistema de sinalização glutamatérgico representa um modelo clássico, efetivo e útil aos estudos de desenvolvimento dos fenômenos excitotóxicos por meio da adição de altas concentrações de um fármaco (ex.: o neurotransmissor glutamato) capaz de estimular de modo excessivo os NMDARs (ionotrópicos), resultando no aumento exacerbado das  $[Ca^{2+}]_i$  (Abramov *et al.*, 2008; Martins *et al.*, 2012; Stanika *et al.*, 2012; Rivero-Segura *et al.*, 2017; Minnella *et al.*, 2018; Park *et al.*, 2019; Krasil'nikova *et al.*, 2019). A adição dos agonistas dos receptores glutamatérgicos em altas concentrações pode resultar na despolarização súbita das membranas plasmáticas neurais, enquanto promovem estados contínuos de despolarização das membranas plasmáticas quanto adicionados em baixas concentrações de modo crônico (Dong *et al.*, 2009; Rueda *et al.*, 2016).

As funções neurotóxicas que correlacionam os aumentos das  $[Ca^{2+}]_i$  às porcentagens (%) de sobrevida neuronal auxiliam na compreensão das vias de influxo de  $Ca^{2+}$ , das dinâmicas de variação transiente das  $[Ca^{2+}]_i$  e das funções cronológicas (cinética) dos aumentos das  $[Ca^{2+}]_i$  (Tymianski *et al.*, 1993; Minnella *et al.*, 2018). A apoptose é frequentemente avaliada quando se estuda a excitotoxicidade induzida por meio da ativação dos  $i$ NMDARs em cultura de neurônios (Martins *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2016; Rivero-Segura *et al.*, 2017; Ding *et al.*, 2018; Park *et al.*, 2019; Krasil'nikova *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2007). Entretanto, existem controvérsias em relação aos mecanismos de morte celular correlacionados à excitotoxicidade desenvolvida por meio das diferentes excitotoxinas (Allen *et al.*, 1999; Lentile *et al.*, 2001). Os fenômenos excitotóxicos glutamato-dependentes podem resultar em morte celular por apoptose ou necrose (Lentile *et al.*,

2001; Liu *et al.*, 2007; Pei *et al.*, 2014; Rivero-Segura *et al.*, 2017). Contudo, alguns autores argumentam a favor de que as estimulações dos receptores NMDA acima dos limites necessários à sobrevivência neuronal resultam em produção de espécies reativas, influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  e morte celular por necroptose (Xu *et al.*, 2007; Zhu *et al.*, 2011). Por outro lado, trabalhos correlacionando a HD à autofagia apresentam inconsistências (Baldo *et al.*, 2013); embora a indução de mecanismos autofágicos seja considerada uma alternativa terapêutica (Ravikumar *et al.*, 2004).

Apesar das diferenças entre as hipóteses de causa eficiente à excitotoxicidade (“calcium loading” e “source specificity”), nota-se um consenso em torno das hipóteses referentes à causa formal, as quais se fundamentam no princípio de que os aumentos exacerbados das  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  suplantam os sistemas de manutenção dos níveis homeostáticos das  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , resultando nos desequilíbrios entre as  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (Duchen, 2012; Stanika *et al.*, 2012; Ghezzi *et al.*, 2017). Desta forma, os desequilíbrios entre as  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  tratam-se de uma consequência da incapacidade dos sistemas de tamponamento do  $\text{Ca}^{2+}$  suportarem os aumentos excessivos das  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Portanto, as vulnerabilidades neuronais à excitotoxicidade podem ser explicadas por meio da perda dos mecanismos de controle dos estados homeostáticos das  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , resultando nos aumentos excessivos das  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  e, conseqüentemente, nos efeitos deletérios dos fenômenos excitotóxicos, assim como no desfecho morte celular.

Conforme descrito, os aumentos das  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  performam um fator que compõe as leis fundamentais dos princípios de causa-efeito dos fenômenos excitotóxicos. Assim, os efeitos deletérios da excitotoxicidade que se correlacionam de modo diretamente proporcional aos aumentos das  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  incluem: acumulação mitocondrial de  $\text{Ca}^{2+}$ ; disfunções mitocondriais; produção de espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species*, ROS); regulação positiva da óxido nítrico sintase (nNOS *up regulation*); produção de radicais livres; despolarização da membrana mitocondrial; ativação do poro de permeabilidade transitória nas membranas mitocondriais; estresse do retículo endoplasmático; e liberação de enzimas lisossomais (Stanika *et al.*, 2012; Ghezzi *et al.*, 2017; Minnella *et al.*, 2018; Angelova *et al.*, 2019). Os aumentos das  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  dependentes dos  $i$ NMDARs também resultam em efeitos deletérios característicos da excitotoxicidade, porém, apresentam a particularidade de aumentarem a produção do radical superóxido a partir da ativação da NADPH oxidase-2 (NOX-2) (Rueda *et al.*, 2016; Stanika *et al.*, 2012; Minnella *et al.*, 2018; Angelova *et al.*, 2019).

As mitocôndrias desempenham funções importantes no metabolismo energético celular, na regulação das concentrações citoplasmáticas de cálcio livre, no controle dos estados de estresse oxidativo e nos mecanismos associados à sobrevivência e à morte celular (Dong *et al.*, 2009; Kalani *et al.*, 2018). Assim, a excitotoxicidade ocorre por meio da estimulação excessiva dos receptores glutamatérgicos, do desequilíbrio das concentrações intracelulares de cálcio e do desenvolvimento das disfunções mitocondriais. (Duchen, 2012). Com efeito, disfunções no sistema de sinalização glutamatérgico, de regulação das  $[Ca^{2+}]_i$ ; e nos mecanismos diretamente correlacionados às funções fisiológicas das mitocôndrias promovem, consecutivamente, o aumento das concentrações intracelulares de cálcio livre, a excitotoxicidade e a morte celular (Paoletti *et al.*, 2008; Milnerwood *et al.*, 2010; Rueda *et al.*, 2015; Rueda *et al.*, 2016; Ghezzi *et al.*, 2017). Este rito se ratifica por meio dos resultados adquiridos a partir das pesquisas citopatológicas da HD, onde nota-se correlações diretamente proporcionais entre os fenômenos excitotóxicos glutamato-dependentes, as formações dos poros de permeabilidade transitória mitocondriais (*mitochondrial permeability transition pore*, mPTP) e as morte celulares (Duchen, 2012; Kalani *et al.*, 2018).

A expressão das mHtt nos MSNs GABAérgicos do *striatum* resulta em disfunções metabólicas que são explicadas a partir das baixas expressões das subunidades do complexo mitocondrial II (succinato desidrogenase), as quais culminam na diminuição da eficiência catalítica entre os complexos mitocondriais II e III da cadeia de transporte de elétrons e no comprometimento das viabilidades celulares (Figura 5) (Oliveira, 2010; Ferreira *et al.*, 2010; Quintanilla *et al.*, 2016; Blum *et al.*, 2018). De modo análogo, o tratamento de neurônios pós-mitóticos com o ácido 3-nitropropiónico (3-NP) - um inibidor irreversível do complexo mitocondrial II - também resulta em comprometimento do metabolismo energético, anoxia química, produção de espécies reativas, neurodegeneração seletiva aos MSNs GABAérgicos do *striatum* D2-positivos, assim como nos comportamentos característicos dos animais modelos da HD (Vis *et al.*, 1999; Leventhal *et al.*, 2000; Milakovic *et al.*, 2006; Karanian *et al.*, 2006; Gupta e Deshpande, 2008; Herrera-Mundo e Sitges, 2010; Túnez *et al.*, 2010; Gao *et al.*, 2015; Blum *et al.*, 2018; Ahmed *et al.*, 2020; Cabral-Costas e Kowaltowski, 2020). Além disso, os tratamentos das culturas de fatia de tecido neural e das linhagens de células neurais e não-neurais com 3-NP promove a morte celular programada (apoptose) devido às disfunções mitocondriais correlacionadas à perda do potencial transmembrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ) e à produção das

espécies reativas de oxigênio (Pang e Geddes, 1997; Colle *et al.*, 2012; Al-Sabahi *et al.*, 2014; Kang *et al.*, 2018; Wei *et al.*, 2019; Ahmed *et al.*, 2020). Assim, as inibições do complexo mitocondrial II por meio das expressões das proteínas mHtt ou dos tratamentos com 3-NP resultam nos aumentos da sensibilidade dos MSNs GABAérgicos do *striatum* aos fenômenos excitotóxicos dependentes das estimulações dos receptores de NMDA (Zeron *et al.*, 2004; Gao *et al.*, 2015; Milakovic *et al.*, 2006). Pensando nisso, na Figura 5, focalizamos o complexo mitocondrial II (quadro em vermelho), pois trata-se do sítio de inibição do 3-NP necessário à configuração do nosso modelo de citotoxicidade bioquímica da HD; e os receptores de NMDA (quadro em azul), pois trata-se do sítio de atuação do agonista QA necessário ao nosso modelo de citotoxicidade neurofarmacológica da HD. Desta forma, o tratamento dos neurônios diferenciados com QA objetivou a avaliação da hipótese ‘H1’; o tratamento com 3NP objetivou a avaliação da hipótese ‘H2’; e o tratamento com QA e 3-NP objetivou a avaliação da hipótese ‘H3’.

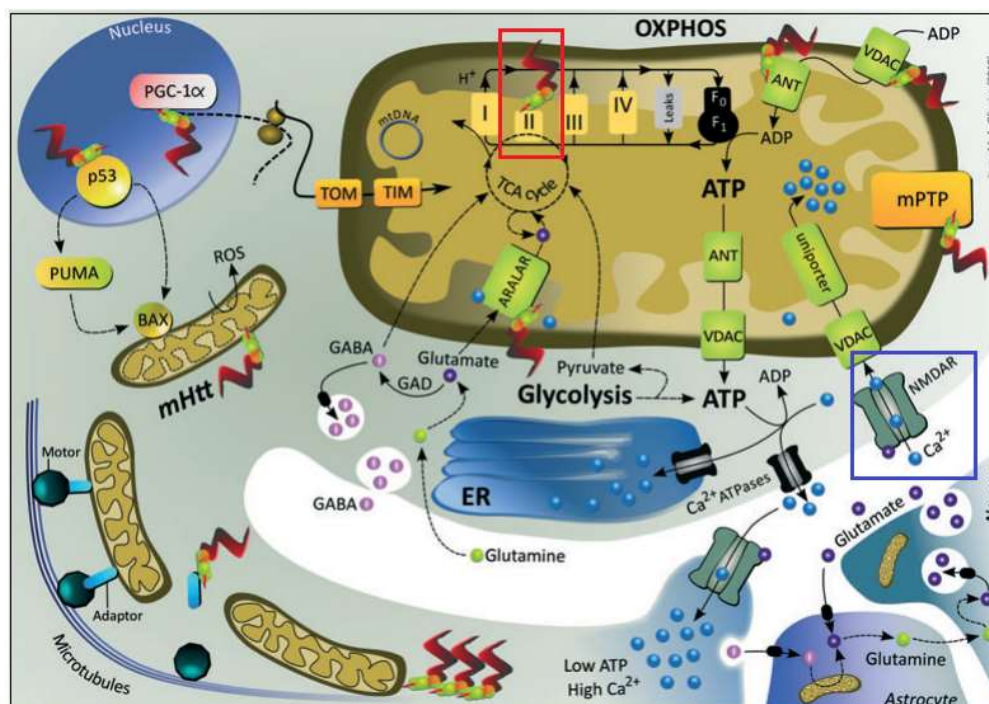


Figura 5. mHtt e disfunções mitocondriais nos MSNs GABAérgicos do *striatum*. A imagem representa os eventos intracelulares que ocorrem nos MSNs GABAérgicos do *striatum* conforme as alterações causadas por meio da expressão da mHtt (proteína vermelha contendo a região poliglutaminica – poliQ – em verde) e de acordo com o contexto das comunicações sinápticas envolvendo os neurônios glutamatérgicos pré-sinápticos (neurônio) – conexões corticoestriatais – e os astrócitos adjacentes (astrocyte). Na parte superior à esquerda, nota-se as desregulações transcricionais nucleares envolvendo as vias p53 e PGC-1 $\alpha$ , assim como o transporte de proteínas mitocondriais

codificadas no núcleo celular por meio dos transportadores TOM (*outer-membrane transporter*) e TIM (*inner-membrane transporter*). Na parte superior à direita, nota-se que a mHtt inibe o complexo mitocondrial II da cadeia de transporte de elétrons e fosforilação oxidativa (OXPHOS) e interage diretamente com as proteínas e complexos protéicos adenina nucleotídeo translocase (ANT), canal iônico dependente de voltagem, mPTP e aralar. No centro, nota-se que o ATP produzido a partir da via glicolítica e da OXPHOS é utilizado como fonte de energia necessária à via não-mitocondrial de tamponamento de  $\text{Ca}^{2+}$  localizada no retículo endoplasmático (ER) e mediada pela  $\text{Ca}^{+}$ -ATPase. Na direita, nota-se o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  através dos NMDARs glutamato-dependentes e via mitocondrial de tamponamento do  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático – *uniporter*. Na parte inferior esquerda, nota-se que a mHtt impede o tráfico das mitocôndrias no sentido dos sítios de necessidade de ATP e de tamponamento de  $\text{Ca}^{2+}$ . GAD (*glutamic acid decarboxylase*) converte glutamato (esferas em roxo) em GABA (esferas em rosa). Ciclo do ácido tricarbóxico (TCA, *tricarboxylic acid cycle*). Os mecanismos propostos ainda não foram completamente elucidados. O quadro em vermelho representa o sítio de inibição do ácido 3-nitropropiónico (3-NP), enquanto o quadro em azul representa o sítio de atuação do agonista ácido quinolínico (QA). Modificado de Oliveira (2010).

Os mecanismos das proteínas mHtt que se correlacionam ao aumento da sensibilidade dos MSNs GABAérgicos do *striatum* diante da elevação da  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  fundamentam-se na inibição do complexo mitocondrial II, a qual resulta em: aumento da permeabilidade das membranas mitocondriais; diminuição do potencial da membrana mitocondrial ( $\Delta\psi$ ); diminuição do estado respiratório 3; diminuição da capacidade mitocondrial de captar o  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático; despolarização das membranas mitocondriais após um aumento da  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ ; formação do Poro de Permeabilidade Transitória mitocondrial (mPTP); e no desenvolvimento de apoptose ou necrose (Brustovetsky *et al.*, 2003; Milakovic *et al.*, 2006). Por outro lado, sabemos que as aferências glutamatérgicas e dopaminérgicas são fatores correlacionados à predisposição ao estresse oxidativo (Brustovetsky *et al.*, 2003); que as estimulações glutamatérgicas excessivas e os aumentos exacerbados das concentrações citoplasmáticas de cálcio livre induzem as formações dos mPTPs (Brustovetsky *et al.*, 2003; Abramov *et al.*, 2008; Duchon, 2012; Rueda *et al.*, 2016); que a inibição do mPTP, na presença da mHtt, impede a diminuição das capacidades de captação mitocondrial de cálcio livre citoplasmático (Milakovic *et al.*, 2006); e que os tratamentos com antagonistas dos NMDARs inibem o desenvolvimento de lesões no *striatum* resultantes das administrações sistêmicas do 3-NP (Sepers e Raymond, 2014). Em conjunto, tais observações justificariam a utilização dos antagonistas dos receptores NMDA na HD, entretanto, observou-se efeitos colaterais correlacionados às influências dos NMDARs nos mecanismos associados à viabilidade celular e à plasticidade neural (Zeron *et al.*, 2001; Milnerwood *et al.*, 2010; Girling e Wang, 2016).

### 1.1.7. Neurofarmacologia dos MSNs GABAérgicos do *striatum*

#### 1.1.7.1. Sistema glutamatérgico

O glutamato é um neurotransmissor excitatório do SNC cujos receptores podem ser metabotrópicos ou ionotrópicos (Niciu *et al.*, 2012; Girling e Wang, 2016). A sinalização sináptica glutamatérgica funciona retransmitindo informações entre os terminais nervosos pré-sinápticos e os dendritos pós-sinápticos (Niciu *et al.*, 2012). Os receptores metabotrópicos podem ativar ou inibir os seus sistemas de segundo-mensageiro por meio das interações com as suas respectivas proteínas-G cognatas, e não dependem do influxo de cátions (Niciu *et al.*, 2012). Os receptores glutamatérgicos ionotrópicos são canais iônicos que permitem o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Na}^{+}$  (Figura 6) (Niciu *et al.*, 2012). Os canais iônicos dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos sofrem alterações conformacionais e se abrem após a ligação de agonistas (Niciu *et al.*, 2012). Existem três classes de receptores glutamatérgicos ionotrópicos, as quais são nomeadas segundo a seletividade por agonistas, tais como *N-methyl-Daspartate* (NMDA),  *$\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole proprionic acid* (AMPA) e *kainate* (KA) (Niciu *et al.*, 2012). Os receptores glutamatérgicos ionotrópicos são constituídos por um complexo tetramérico de subunidades homoméricas ou heteroméricas (Niciu *et al.*, 2012). Os receptores de NMDA podem ser constituídos pelas subunidades NR1, NR2A-D e NR3A-B (Niciu *et al.*, 2012). As ativações dos receptores de NMDA necessitam das ligações com moléculas co-agonistas (ex.: glutamato e glicina) (Niciu *et al.*, 2012). As funções farmacológicas dos receptores de NMDA podem apresentar propriedades neuroprotetoras e neurotóxicas, conforme a ativação diferencial dos receptores sinápticos e extrasinápticos, respectivamente (Niciu *et al.*, 2012). As estimulações excessivas dos receptores de NMDA extrasinápticos induzem a ativação das vias intracelulares correlacionadas à morte celular programada (apoptose), enquanto as estimulações dos receptores de NMDA sinápticos promovem a ativação das vias intracelulares correlacionadas à sobrevivência celular (Niciu *et al.*, 2012). Neste sentido, alguns autores argumentam dissertam sobre a necessidade da estimulação simultânea dos receptores de NMDA sinápticos e extrasinápticos a fim de se efetivar a morte neuronal (Zhou *et al.*, 2013).

As conexões corticoestriatais dos circuitos córtico-BGs permitem as comunicações sinápticas entre os neurônios piramidais corticais glutamatérgicos (pré-sinápticos; excitatórios) e os MSNs GABAérgicos do *striatum* (pós-sinápticos; inibitórios) (Sano *et al.*, 2013; Lanciego *et*

*al.*, 2012; Huerta-Ocampo *et al.*, 2014; Ploktin e Goldberg, 2018). As comunicações sinápticas entre os neurônios corticoestriatais ocorrem a partir da liberação de glutamato por meio dos terminais pré-sinápticos dos neurônios piramidais corticais glutamatérgicos e do desenvolvimento dos mecanismos de transdução do sinal através dos receptores de NMDA (Galvan *et al.*, 2012; Bunner e Rebec, 2016; Vyklicky *et al.*, 2014; Hansen *et al.*, 2018). Os MSNs GABAérgicos do *striatum* realizam a síntese citoplasmática de ácido gamma amino butirico (GABA), o qual será liberado por meio dos seus terminais sinápticos após a estimulação dos receptores de NMDA (Chen *et al.*, 2013). A liberação de GABA também sofre influências dos estímulos advindos dos neurônios que integram circuitos colaterais (Chen *et al.*, 2013).

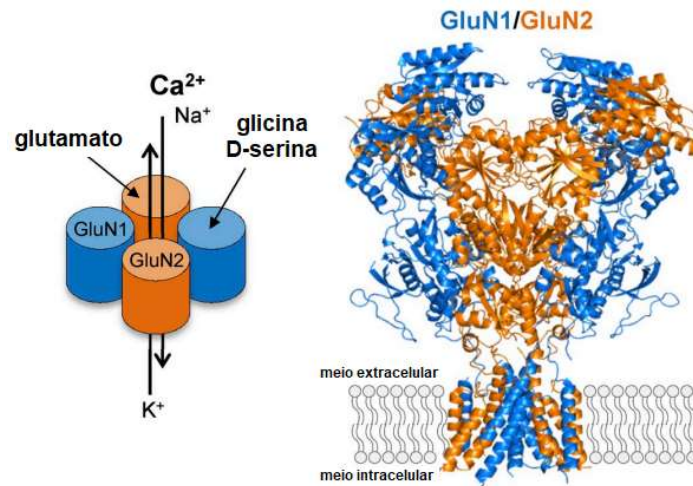


Figura 6. Estequiometria e disposição das subunidades GluN1/2 dos receptores glutamatérgicos de NMDA. A estrutura cristalográfica demonstra que as subunidades GluN1 e GluN2 se associam de modo alternado e formam heterotetrâmeros. Os receptores de NMDA são ativados pela ligação conjunta de duas moléculas de glicina às subunidades GluN1 e de duas moléculas de glutamato às subunidades GluN2. A ativação dos receptores de NMDA resulta na abertura de um canal iônico central permeável a cátions. Modificado de Hansen *et al.* (2018).

### 1.1.7.2. Sistema dopaminérgico

Um outro sistema neuromodulatório expressos no SNC de vertebrados é o dopaminérgico (Pivonello *et al.*, 2007; Perreault *et al.*, 2014). Os receptores dopaminérgicos pertencem à classe dos receptores sete domínios transmembrana acoplados à proteína G cujo principal ligante endógeno é o neurotransmissor dopamina. Os receptores dopaminérgicos são subclassificados em cinco subtipos (D1-D5). Por meio das projeções nigroestriatais, neurônios dopaminérgicos da SNc realizam contatos sinápticos cujos mecanismos de sinalização diferem entre os MSNs



GABAérgicos do *striatum*, conforme a expressão dos receptores D1-like e D2-like. Os MSNs GABAérgicos da via direta do controle da coordenação motora expressam os receptores D1-like. Os receptores D1-like são excitatórios, pois apresentam-se tipicamente acoplados a Gs/olf. Por outro lado, os MSNs GABAérgicos da via indireta expressam os receptores D2-like, os quais são inibitórios, pois encontram-se acoplados a Gi/o. A expressão molecular diferencial dos receptores de dopamina explica os resultados experimentais de aumento da atividade motora por meio do tratamento com fármacos dopaminérgicos, o que justifica a hipótese de que a estimulação dos MSNs GABAérgicos D1-positivos da via direta e a inibição dos MSNs GABAérgicos D2-positivos favorece a execução dos movimentos corporais voluntários.

### 1.1.7.3. Sistema purinérgico & HD

As funções farmacológicas do sistema de sinalização purinérgica, tais como a coneurotransmissão, puderam ser comprovadas a partir das clonagens dos seus receptores (Burnstock, 2014). No sistema nervoso central (SNC), os receptores purinérgicos funcionam de modo associado aos receptores colinérgicos, GABAérgicos, glutamatérgicos e dopaminérgicos (North, 1996; Dubyak e El-Moatassim, 1993; Cheffer *et al.*, 2018). As purinas – agonistas endógenos dos receptores purinérgicos – apresentam efeitos sinérgicos com os fatores de crescimento, diferenciação e proliferação neuronal – inclusive em células do *striatum* (Burnstock, 2014). Assim sendo, as pesquisas a respeito das funções farmacológicas neuromodulatórias dos receptores purinérgicos fazem-se úteis e necessárias, pois se trata de um sistema de sinalização passível e promissor às investidas farmacoterapêuticas em diferentes contextos das mais variadas doenças do SNC (Burnstock, 2008; Cheffer *et al.*, 2018).

Os receptores do sistema de sinalização purinérgica se dividem em duas famílias denominadas P1 e P2 (Figura 7) (Dubyak e El-Moatassim, 1993; North, 1996; Burnstock, 1997; King e Townsend-Nicholson, 2000; Abbracchio *et al.*, 2008; Burnstock, 2014; Fredholm, 2014; Burnstock, 2018). Estes receptores se distinguem a partir das características estruturais, bioquímicas e farmacológicas (Glaser *et al.*, 2013; Burnstock, 2018; Cheffer *et al.*, 2018). Na Doença de Huntington, as funções dos receptores P1 são mais compreendidas do que as funções dos receptores P2.

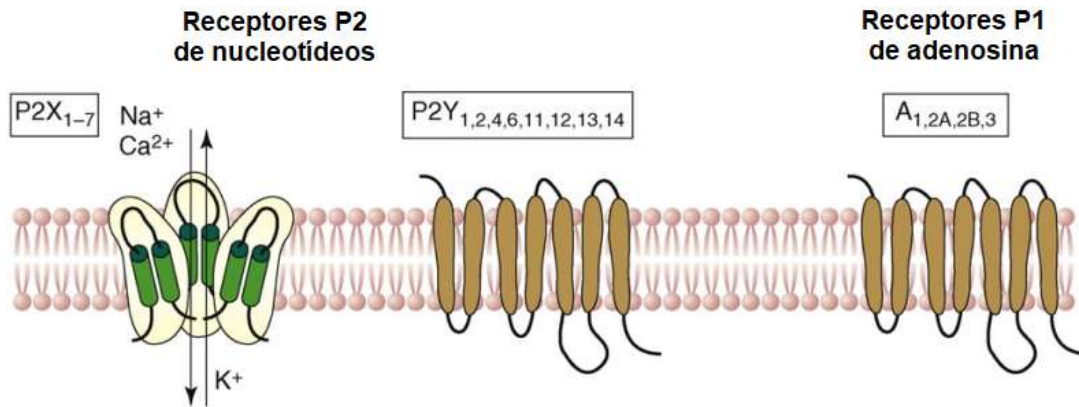


Figura 7. Receptores purinérgicos. Os receptores purinérgicos se dividem em duas famílias denominadas P1 e P2. Os receptores P1 são receptores sete domínios transmembrana acoplados às diferentes famílias de proteína G ( $G_i$ ,  $G_o$  e  $G_s$ ) – metabotrópicos. Os receptores P1 são relativamente seletivos à adenosina e foram classificados em quatro subtipos ( $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$  e  $A_3$ ). Os receptores P2 se classificam em dois subtipos denominados P2X e P2Y. Estes receptores apresentam seletividades relativas aos diferentes nucleotídeos purínicos e pirimidínicos (ex.: ATP, ADP e UTP). Os receptores P2X são canais iônicos dependentes de ligante (ionotrópicos). Estes receptores se constituem por meio das interações entre trimeros formados por subunidades homodiméricas ou heterodiméricas. Os subtipos descritos foram denominados conforme a nomenclatura de P2X1-7. Os receptores P2Y são do tipo sete domínios transmembrana acoplados à proteína G. Estes receptores foram classificados conforme os subtipos P2Y 1, 2, 4, 6, 11, 13 e 14. Modificado de Abbracchio *et al.* (2008).

Os receptores P1 foram classificados em quatro subtipos ( $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$  e  $A_3$ ); apresentam seletividade relativa à adenosina; e são inibidos pelas metilxantinas (ex.: cafeína) (Abbracchio *et al.*, 2008; Glaser *et al.*, 2013; Burnstock, 2018; Cheffer *et al.*, 2018). Os receptores  $A_1$ ,  $A_{2A}$  e  $A_3$  são mais sensíveis à ligação da adenosina quando comparamos as suas afinidades em relação àquela dos receptores  $A_{2B}$  (Cheffer *et al.*, 2018). Os receptores P1 são metabotrópicos do tipo sete domínios transmembrana acoplados às diversas famílias de proteínas G (*G protein-coupled receptor*) ( $G_i$ ,  $G_o$  e  $G_s$ ), assim como à adenilato ciclase (Abbracchio *et al.*, 2008; Glaser *et al.*, 2013; Burnstock, 2018; Cheffer *et al.*, 2018; Tescarollo *et al.*, 2020; Garcia-Gil *et al.*, 2021). Os receptores  $A_1$  e  $A_3$  se acoplam às proteínas  $G_{1/o}$ , o que resulta na diminuição das atividades da adenilato ciclase e, portanto, nas baixas produções de cAMP. Os receptores  $A_{2A}$  e  $A_{2B}$  se acoplam às proteínas  $G_s$ , resultando nos aumentos das atividades da adenilato ciclase por meio dos mecanismos de transdução do sinal dependentes das proteínas quinase A (PKA) e, portanto, no aumento da produção de cAMP, no recrutamento dos canais de  $Ca^{2+}$  (excitatórios) e nas suas posteriores aberturas (Kovács *et al.*, 2013; Mouro *et al.*, 2018; Tescarollo *et al.*, 2020; Garcia-Gil

*et al.*, 2021). Além disso, os receptores A<sub>1</sub> e A<sub>3</sub> apresentam funções de regulação das atividades das fosfolipases C-β (PLC-β) (Glaser *et al.*, 2013; Kovács *et al.*, 2013; Cheffer *et al.*, 2018; Tescarollo *et al.*, 2020). A ativação das PLC-β resulta nas clivagens dos fosfolipídios de membrana fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato em diacilglicerol e Inositol-1,4,5-trifosfato (IP3); o IP3, por sua vez, se difunde até o retículo endoplasmático rugoso, ativa os receptores de IP3 e estimula a liberação de Ca<sup>2+</sup> (Glaser *et al.*, 2013).

Os receptores P2 se classificam em dois subtipos denominados P2X e P2Y; sendo relativamente seletivos aos nucleotídeos purínicos e pirimidínicos (ex.: ATP, ADP e UTP) (Abbracchio *et al.*, 2008; Glaser *et al.*, 2013; Burnstock, 2018; Cheffer *et al.*, 2018). Os receptores P2X são canais iônicos (ionotrópicos) dependentes de ligante (*ligand-gated ion channel receptors*); preferencialmente seletivos ao ATP; os quais apresentam motivos de ligação às proteínas quinases. Quando ativados, os receptores P2X promovem um aumento rápido das condutâncias dos íons Ca<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> através das membranas plasmáticas. Estes receptores se constituem por meio das interações entre trímeros de subunidades homodiméricas ou heterodiméricas, sendo os subtipos descritos denominados conforme a nomenclatura P2X1-7 (Burnstock, 2018; Cheffer *et al.*, 2018). Os receptores P2Y, por sua vez, são metabotrópicos (*G protein-coupled receptor*); os quais, quando ativados, mobilizam Ca<sup>2+</sup> intracelular. Os receptores P2Y se subclassificam nos subtipos P2Y 1, 2, 4, 6, 11, 13 e 14 (Glaser *et al.*, 2013; Cheffer *et al.*, 2018).

As unidades nucleotídicas dos agonistas purinérgicos endógenos (ex.: ATP) podem ser clivadas em suas respectivas subunidades (ex.: ADP, AMP e adenosina) por meio das atividades catalíticas das enzimas da família das ectonucleotidases (Figura 8) (Burnstock, 1997; Burnstock, 2014; Roszek e Czarnicka, 2015; Koles *et al.*, 2016; Burnstock, 2018). As ectonucleotidases permitem o estabelecimento de um sistema autorregulatório fundamentado em um mecanismo de *feedback* negativo caracterizado por meio do intercâmbio entre as classes dos receptores purinérgicos P1 e P2 (Burnstock, 2014; Koles *et al.*, 2016). Neste sentido, as liberações pré-sinápticas do ATP promovem a estimulação dos receptores P2 pós-juncionais; a degradação do ATP por meio das ectonucleotidases da fenda sináptica resulta nas produções de ADP, AMP e adenosina; e a estimulação dos receptores P1 pré-juncionais por meio da adenosina inibe a liberação de ATP (Burnstock, 2014). Na ausência de danos celulares, o ATP é liberado na fenda

sináptica por meio dos mecanismos de difusão passiva através dos canais iônicos, de difusão facilitada através das proteínas transportadoras e de transporte ativo dependentes de  $\text{Ca}^{2+}$ , tais como a exocitose de vesículas de armazenamento através dos terminais sinápticos (Abbracchio *et al.*, 2008; Yegutkin, 2014; Roszek e Czarnecka, 2015). A acumulação de ATP em vesículas sinápticas se faz por intermédio das proteínas transportadoras de nucleotídeos (Abbracchio *et al.*, 2008). As atividades catalíticas das ectonucleotidases influenciam o tempo de meia-vida dos respectivos nucleotídeos na fenda sináptica, alterando os perfis cinéticos de estimulação e de dessensibilização dos receptores purinérgicos afetados (Abbracchio *et al.*, 2008; Cheffer *et al.*, 2018).

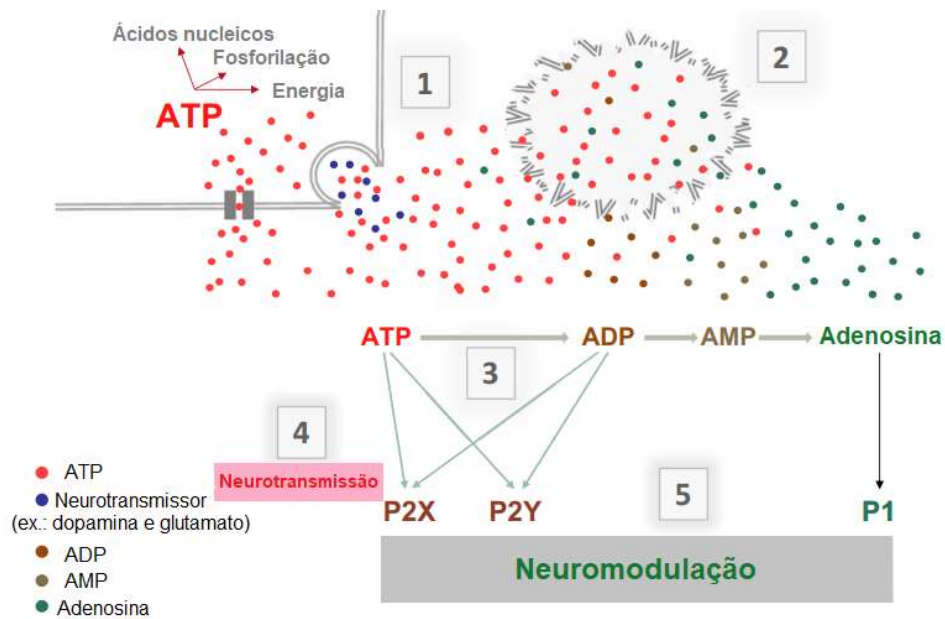


Figura 8. Autorregulação do sistema de sinalização purinérgico e neuromodulação. 1 – O ATP é liberado no espaço extracelular por meio do transporte passivo através dos canais iônicos, do transporte ativo por meio dos transportadores de membrana plasmática, assim como por meio do transporte vesicular. 2 – A liberação espontânea de moléculas purínicas ocorre nos casos de danificação celular ou de morte celular. 3 – As ectoenzimas (ex.: ectonucleotidases) realizam a hidrólise dos nucleotídeos extracelulares (ex.: ATP). O ATP, por exemplo, apresenta diferentes seletividades relativas aos receptores P2X e P2Y. As produções de ADP, AMP e adenosina a partir do precursor ATP por meio das atividades catalíticas das ectonucleotidases resulta na diminuição gradual das estimulações dos receptores P2, assim como no aumento gradual das estimulações dos receptores P1 – seletivos à adenosina. 4 – Os receptores P2X (ionotrópicos) e P2Y (metabotrópicos) – pós-sinápticos – medeiam respostas sinápticas rápidas e lentas, respectivamente. 5 – As moléculas purínicas extracelulares ativam os receptores P2X e P2Y; e a adenosina estimula os receptores P1. Os receptores purinérgicos, conforme as funções de cada subtipo, modulam diversos sistemas de neurotransmissão (ex.: dopamina e glutamato). Modificado de Koles *et al.* (2016).

Outros mecanismos de regulação das concentrações de moléculas purínicas nas fendas sinápticas incluem as proteínas transportadoras de nucleotídeos e as enzimas adenosina quinase e adenosina desaminase (Sandau *et al.*, 2016; Garcia-Gil *et al.*, 2021). A adenosina quinase se encontra predominantemente expressa nos astrócitos, sendo a superexpressão correlacionada à epilepsia, enquanto o aumento das concentrações de adenosina se apresenta como alternativa terapêutica (Sandau *et al.*, 2016).

Os receptores P1 apresentam estratégias regulatórias envolvendo processos de internalização pós-ativação, os quais são desencadeados a partir das reações de fosforilação catalisadas por meio das proteínas quinases acopladas à proteína G (Klaasse *et al.*, 2008). Estes receptores apresentam distintos perfis cinéticos de dessensibilização e de internalização quando expostos às moléculas agonistas (Klaasse *et al.*, 2008). Os receptores A<sub>1</sub> apresentam um perfil cinético lento de dessensibilização (meia-vida determinada em horas), pois não são prontamente fosforilados. Os receptores A<sub>2A</sub> e A<sub>2B</sub> apresentam perfis cinéticos rápidos (meia-vida inferior à 1h). Os receptores A<sub>3</sub> apresentam perfis cinéticos ainda mais rápidos (meia-vida de poucos minutos).

A adenosina se comporta como um neuromodulador, pois controla o fluxo de informação entre os neurônios; e não como um neurotransmissor, os quais transferem uma informação propriamente dita (Cunha, 2005). Neste sentido, as funções neuromodulatórias da adenosina regulam a liberação dos neurotransmissores, assim como estabelecerem as interações entre os receptores de adenosina com outros receptores ou transportadores (Ribeiro e Sebastião, 2010). Desta forma, as neuromodulações pré-sinápticas alteram os perfis de liberação de um dado neurotransmissor, enquanto as neuromodulações pós-sinápticas influenciam os efeitos deste neurotransmissor (Ribeiro e Sebastião, 2010). As principais atividades neuromodulatórias da adenosina se fundamentam nas funções dos receptores A<sub>1</sub> e A<sub>2A</sub> (Cunha, 2005). Assim, os mecanismos de neuromodulação intermediados pela adenosina variam conforme as especificidades das conexões sinápticas e os subtipos dos receptores purinérgicos; sendo os receptores A<sub>1</sub> do hipocampo correlacionados à inibição da transmissão sináptica, enquanto os receptores A<sub>2A</sub> da mesma área cerebral se correlacionam às liberações de alguns neurotransmissores ou neuromoduladores produzindo um *fine-tune* das atividades neuronais (Ribeiro e Sebastião, 2010).

Os receptores A<sub>1</sub> se encontram expressos no cérebro de modo difuso e em grandes proporções em regiões tais como córtex cerebral, cerebelo, hipocampo corno dorsal e medula espinhal (Fredholm, 1997; Cunha, 2004; Ribeiro e Sebastião, 2010). Os receptores A<sub>2A</sub>, embora também sejam notados em todo o cérebro, apresentam um perfil de expressão mais restrito quando comparados aos receptores A<sub>1</sub>, predominando em neurônios do *striatum* (Fredholm, 1997; Chiu *et al.*, 2015). Os receptores A<sub>2A</sub> também se encontram expressos em pequenas proporções no hipocampo, onde funcionam como moduladores (Mouro *et al.*, 2018). Os receptores A<sub>2A</sub> são expressos principalmente por neurônios GABAérgicos do circuito *striatopallidal* e do bulbo olfatório (Ribeiro e Sebastião, 2010).

Em conexões sinápticas glutamatérgicas, os receptores A<sub>1</sub> apresentam funções neuromodulatórias pré-sinápticas e pós-sinápticas (Rombo *et al.*, 2016). Neste sentido, os receptores A<sub>1</sub> inibem a liberação de alguns neurotransmissores; e alteram as condutâncias pós-sinápticas, incluindo às correntes de influxos de Ca<sup>2+</sup> através dos receptores de NMDA expressos em neurônios do hipocampo (Mouro *et al.* 2018). Ainda nos circuitos do hipocampo, a adenosina também apresenta funções neuromodulatórias cujos efeitos se correlacionam às estimulações dos receptores A<sub>1</sub> pré-sinápticos, os quais inibem as correntes pós-sinápticas evocadas por meio das ativações dos receptores GABA<sub>A</sub>, resultando no aumento da excitabilidade dos neurônios piramidais, assim como dos interneurônios (Rombo *et al.*, 2016). Por outro lado, por meio dos receptores A<sub>2A</sub> expressos em neurônios do *striatum*, a adenosina influencia os mecanismos de morte celular e de plasticidade neuronal (Mouro *et al.*, 2018). Os receptores A<sub>2A</sub> também apresentam funções de neuromodulação do sistema glutamatérgico do hipocampo, as quais se correlacionam aos mecanismos de facilitação das correntes pós-sinápticas através dos receptores de NMDA sinápticos – correlacionados, positivamente, aos mecanismos de plasticidade neuronal – e à liberação pré-sináptica do glutamato – correlacionada à potencialização da excitotoxicidade (Mouro *et al.*, 2018). Entretanto, os receptores A<sub>2A</sub> também já foram correlacionados aos mecanismos de facilitação das ações pós-sinápticas do BDNF e de aumento das liberações pré-sinápticas de GABA (Mouro *et al.*, 2018).

No contexto dos transtornos psiquiátricos, os receptores A<sub>1</sub> e A<sub>2A</sub> parecem controlar a plasticidade sináptica e a liberação dos neurotransmissores glutamato, dopamina e GABA (Cheffer *et al.*, 2018). No controle motor, o bloqueio dos receptores de adenosina por meio da cafeína

influência as atividades motoras que se correlacionam aos mecanismos de neurotransmissão dos MSNs integrantes das vias direta (*striatonigral pathway*) e indireta (*striatopallidal pathway*) do circuito córtico-BG, responsável pelo controle da coordenação motora (Fisone *et al.*, 2007).

Por se tratar de um dos principais temas deste trabalho, enfatizamos as informações contidas na literatura científica que se referem às propriedades neuroprotetoras/neurotóxicas dos fármacos agonistas/antagonistas dos receptores purinérgicos; assim como aquelas relativas aos sintomas motores correlacionados às neurodegenerações dos MSNs GABAérgicos do *striatum* analisadas por meio dos modelos murinos da HD. A adenosina foi o fármaco de escolha às avaliações dos potenciais terapêuticos dos agonistas dos receptores P1, pois se trata de uma molécula bastante descrita na literatura científica. As funções neuroprotetoras dos nucleosídeos purínicos se correlacionam às ativações dos receptores purinérgicos e aos seus respectivos mecanismos de sinalização intracelular (Ribeiro *et al.*, 2016).

A adenosina foi correlacionada aos mecanismos de inibição da liberação do glutamato (Jeon *et al.*, 2011). A inibição da liberação pré-sináptica de glutamato se deve à ativação dos receptores A<sub>1</sub> (Fredholm, 1997; Ribeiro *et al.*, 2016; Mouro *et al.*, 2018). Este efeito promove uma diminuição da excitotoxicidade, o que explica a propriedade neuroprotetora da adenosina (Ribeiro *et al.*, 2016).

A ativação dos receptores A<sub>1</sub> resulta em neuroproteção frente aos aumentos das concentrações de Ca<sup>2+</sup> resultantes das estimulações dos receptores excitatórios (Fredholm, 1997). Os efeitos neuroprotetores da adenosina foram explicados a partir das funções dos receptores A<sub>1</sub> tais como a inibição das elevações das [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> por meio do bloqueio direto dos canais de Ca<sup>2+</sup>, a inibição da liberação de neurotransmissores excitatórios e o aumento da condutância das membranas neuronais aos íons K<sup>+</sup>, o que resulta em hiperpolarização e, conseqüentemente, na diminuição do influxo de Ca<sup>2+</sup> através dos NMDARs (Mouro *et al.*, 2018; Tescarollo *et al.*, 2020). A hiperpolarização das membranas neuronais contribui para a manutenção do bloqueio dos receptores NMDA pelo Mg<sup>2+</sup> (Ribeiro *et al.*, 2016). Por outro lado, a inibição dos receptores A<sub>1</sub> foi correlacionada à facilitação das correntes excitatórias pós-sináptica mediadas pelos NMDARs, sendo esta função mimetizada por meio do tratamento com cafeína (Martins *et al.*, 2020). Este efeito foi explicado por meio do mecanismo que correlaciona a liberação de glutamato pré-sináptico à inibição dos receptores A<sub>1</sub> (Mouro *et al.*, 2018).

Em síntese, no contexto da excitotoxicidade, a propriedade neuroprotetora dos agonistas dos receptores A<sub>1</sub> se deve à diminuição da liberação pré-sináptica de glutamato e à hiperpolarização das membranas dos neurônios pós-sinápticos (Fredholm, 1997; Cunha, 2005; Ribeiro *et al.*, 2016; Tescarollo *et al.*, 2020). Contudo, vale-se mencionar que a propriedade neuroprotetora da adenosina foi correlacionada às funções dos receptores A<sub>1</sub> em tipos celulares e contextos patológicos específicos (Lee *et al.*, 2004).

A estimulação dos receptores A<sub>1</sub> também promove neuroproteção diante dos efeitos citotóxicos correlacionados às consequências metabólicas da isquemia (Fredholm, 1997). Neste caso, a ativação dos receptores A<sub>1</sub> resulta em neuroproteção por meio da diminuição do metabolismo celular (Cunha, 2005; Moreira-de-Sá *et al.*, 2021).

Por outro lado, agonistas dos receptores A<sub>2A</sub> foram correlacionados à liberação de glutamato e, conseqüentemente, à estimulação dos NMDARs, sendo este efeito revertido pela cafeína; enquanto os antagonistas dos receptores A<sub>2A</sub> apresentaram efeitos neuroprotetores frente aos fenômenos excitotóxicos (Fredholm, 1997; Pedata *et al.*, 2014; Ribeiro *et al.*, 2016; Martins *et al.*, 2020; Moreira-de-Sá *et al.*, 2021). Com efeito, a ativação dos receptores A<sub>2A</sub> pré-sinápticos induz a liberação de glutamato e facilita o desenvolvimento das correntes pós-sinápticas produzidas por meio dos receptores NMDA sinápticos (Mouro *et al.*, 2018). Estes efeitos também se devem à inibição das correntes inibitórias pós-sinápticas produzidas por meio da ativação dos receptores GABA<sub>A</sub> (Rombo *et al.*, 2016). Neste sentido, a ativação dos receptores A<sub>2A</sub> potencializam a excitotoxicidade (Sebastião, 2022). Além disso, as ativações dos receptores A<sub>2A</sub> foram correlacionadas às funções de plasticidade neural do sistema de sinalização purinérgico (Moreira-de-Sá *et al.*, 2021).

Alguns autores descrevem a interação entre receptores A<sub>2A</sub> e os receptores D2 que são expressos em neurônios do *striatum* (Glaser *et al.*, 2020; Garcia-Gil *et al.*, 2021). Estes complexos heteroméricos apresentam funções integradoras dos sinais individuais de inibição e excitação relativos aos receptores dopaminérgicos D2 e purinérgicos A<sub>2A</sub>, respectivamente. Esta função se concretiza de modo dependente da produção de cAMP a partir da ativação da enzima adenilato ciclase. Neste caso, a adenosina apresenta o potencial de diminuir a afinidade dos receptores D2 pela dopamina (Glaser *et al.*, 2020).



Os efeitos neuroprotetores da adenosina também foram correlacionados aos mecanismos de produção do BDNF (*brain derived neurotrophic factor* - BDNF) (Jeon *et al.*, 2011; Ribeiro *et al.*, 2016; Miranda-Lourenço *et al.*, 2020). O BDNF é uma molécula da família das neurotrofinas cujas funções se correlacionam ao neurodesenvolvimento, à neurodiferenciação, à neuroplasticidade e à neuroproteção (Jeon *et al.*, 2011; Ahmed *et al.*, 2020). A produção de BDNF apresenta efeito neuroprotetor inclusive na presença do 3-NP (Ahmed *et al.*, 2020). A propriedade da adenosina de influenciar positivamente a produção do BDNF foi correlacionada à ativação dos receptores purinérgicos A<sub>2A</sub> (Jeon *et al.*, 2011; Ribeiro *et al.*, 2015; Sandau *et al.*, 2016; Mouro *et al.*, 2018; Miranda-Lourenço *et al.*, 2020).

Um modelo murino fisiológico da HD se fundamenta no tratamento (injeção) destes animais com ácido quinolínico (QA), um agonista dos receptores glutamatérgicos NMDA. A infusão de QA no cérebro dos animais murinos permite a mimetização dos sintomas motores característicos da HD (mesmo na ausência da mHtt) - haja vista o potencial do QA de provocar a neurodegeneração dos MSNs GABAérgicos do *striatum* integrantes da via indireta dos circuitos córtico BGs (Sepers e Raymond, 2014; Gianfriddo *et al.*, 2003). Nestes animais, os receptores A<sub>2A</sub> parecem controlar os níveis de glutamato nas sinapses corticoestriatais por influência nos mecanismos de *outflow* via transportadores de glutamato (*glutamate transporters* - GLT); sendo as exposições aos antagonistas dos receptores A<sub>2A</sub> procedimentos promotores dos antagônicos desfechos observados nos modelos murinos da HD, a depender dos fenótipos destes animais (Popoli *et al.*, 2002; Gianfriddo *et al.*, 2003; Pintor *et al.*, 2004; Ferrante *et al.*, 2010).

Popoli *et al.* (2002) concluíram que os modelos animais murinos tratados com QA não mimetizam os sintomas motores característicos da HD quando pré-tratados com um antagonista dos receptores purinérgicos A<sub>2A</sub>. Da mesma forma, Gianfriddo *et al.* (2003) demonstraram que um antagonista dos receptores A<sub>2A</sub> protegeu os MSNs do *striatum* contra os efeitos excitotóxicos do QA; e correlacionaram este desfecho à inibição do efluxo de glutamato a partir das células da glia.

Por outro lado, Ferrante *et al.* (2010) demonstraram que a exposição crônica de camundongos mutantes e selvagens (*wild type* - WT) a um agonista dos receptores A<sub>2A</sub> resultou em uma modulação genótipo-dependente dos perfis de expressão das subunidades dos NMDARs, além de que os camundongos modelo transgênico da HD apresentaram um abrandamento dos

sintomas da HD dependentes das estimulações dos NMDARs quando pré-tratados com um agonista dos receptores A<sub>2A</sub>. Por sua vez, Chiu *et al.* (2015) demonstraram que o tratamento dos camundongos R6/2 (modelo transgênico da HD) com um agonista dos receptores A<sub>2A</sub> promove uma melhora dos sintomas da HD.

Em um modelo *in vitro* da HD, Chiu *et al.* (2015) observaram que as proteínas mHtt favorecem o desequilíbrio entre as concentrações homeostáticas do Ca<sup>2+</sup>, a excitotoxicidade, disfunções do sistema ubiquitina-proteassoma, desregulações transcricionais, anormalidades mitocondriais e o estresse oxidativo. Estes autores também comprovaram as relações entre as células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs) oriundas de pacientes com HD (mHtt -/+ ) e diferenciadas em neurônios GABAérgicos em vista da suscetibilidade aos danos no DNA que se devem aos tratamentos com espécies reativas de oxigênio; sendo estes danos atenuados por meio do tratamento com um agonista dos receptores A<sub>2A</sub> de modo a diminuir a proporção de células apoptóticas - quando comparadas às células controles.

## **1.2. BASES EXPERIMENTAIS**

### **1.2.1. Modelagem *in vitro* da HD & Adenosina como alternativa farmacoterapêutica**

As hipóteses teóricas sobre a citopatologia da HD objetivam explicar as causas das preponderantes neurodegenerações dos MSNs GABAérgicos D2-positivos (McColgan e Tabrizi, 2017). As principais hipóteses objetivam correlacionar os desfechos das mortes celulares dos neurônios pós-mitóticos GABAérgicos às duas variáveis independentes não mutuamente excludentes, estimulação dos receptores de NMDA e inibição do complexo mitocondrial II. Uma primeira hipótese (H1) se refere à sensibilidade dos MSNs GABAérgicos do *striatum* aos efeitos citotóxicos das proteínas mHtt (Zeron *et al.*, 2001; Ravikumar *et al.*, 2004; Pandey e Rajamma, 2018; Sepers e Raymond, 2014; Girling e Wang, 2016). Uma segunda hipótese (H2) se refere à vulnerabilidade dos MSNs GABAérgicos do *striatum* aos fenômenos excitotóxicos desencadeados a partir das estimulações dos receptores de NMDA (Zeron *et al.*, 2001; Brustovetsky *et al.*, 2003; Sepers e Raymond, 2014; Girling e Wang, 2016). Uma terceira hipótese (H3) considera as duas hipóteses anteriores a fim de inferir a respeito da propriedade dos efeitos citotóxicos das proteínas mHtt de potencializarem os efeitos deletérios dos fenômenos excitotóxicos glutamato-dependentes (Paoletti *et al.*, 2008; Brustovetsky *et al.*, 2003; Milnerwood *et al.*, 2010; Fan *et al.*, 2012;

Milnerwood *et al.*, 2012; Sepers e Raymond, 2014; Girling e Wang, 2016). Neste sentido, por último, vislumbra-se uma quarta hipótese (H4) cujo objetivo é explicar a sensibilidade dos MSNs GABAérgicos do *striatum* que expressam as mHtt às elevações das  $[Ca^{2+}]_i$  glutamato-dependentes partindo-se dos efeitos citotóxicos das proteínas mHtt que se correlacionam ao aumento do estresse oxidativo e ao favorecimento da despolarização das membranas mitocondriais, findando em apoptose por via intrínseca (ou mitocondrial) (Duchen, 2012; Brustovetsky *et al.*, 2003; Kalani *et al.*, 2018). Neste sentido, fazem-se, também, úteis e necessárias as pesquisas científicas sobre as funções neuroprotetoras/neurotóxicas de fármacos neuromoduladores diante dos fenômenos excitotóxicos glutamato-dependentes.

Objetivando testar as hipóteses teóricas supracitadas (H1, H2 e H3), estabelecemos dois modelos *in vitro* da HD. O primeiro modelo consistiu na neurodiferenciação das células-tronco embrionárias de camundongo (mESCs) E14-TG2a por meio do método *five stage* de Okabe *et al.* (1996); o segundo, na neurodiferenciação das células da linhagem de neurônios do hipocampo de camundongos HT-22 por meio da incubação com o reagente N2. Em seguida, ambas culturas neuronais derivadas foram submetidas aos procedimentos de caracterização. Os neurônios adquiridos a partir das mESCs foram caracterizados conforme as propriedades (mofológicas, eletrofisiológicas, moleculares, imunocitoquímicas e farmacológicas) dos MSNs GABAérgicos do *striatum*; enquanto os neurônios HT-22 diferenciados foram caracterizados de maneira geral e inespecífica. Posteriormente, as culturas de neurônios diferenciados foram submetidas às análises das funções neurotóxicas dos tratamentos com ácido quinolínico (QA) – agonista seletivo dos receptores NMDA –, na ausência e na presença do ácido 3-nitropropiónico (3-NP) – inibidor irreversível da succinato desidrogenase (complexo mitocondrial II). Estes modelos *in vitro* da HD também serviram às avaliações das funções neuroprotetoras da adenosina – o agonista endógeno dos receptores purinérgicos P1 – diante dos fenômenos excitotóxicos desenvolvidos a partir das estimulações dos receptores de NMDAR, tanto na ausência como na presença do 3-NP. Desta forma, objetivamos a compreensão das funções de causa-efeito relativas aos fatores correlacionados à morte celular dos MSNs GABAérgicos D2-positivos do *striatum* por excitotoxicidade, assim como as relações referentes às funções neuroprotetoras da adenosina diante dos fenômenos excitotóxicos. Contudo, em relação aos resultados dos ensaios farmacológicos, apresentaremos apenas os dados referentes às culturas dos neurônios HT-22 diferenciados.

Em síntese, objetivamos testar as hipóteses teóricas descritas (H1, H2 e H3) a partir das análises de algumas funções referentes aos fatores considerados de predisposição à morte dos MSNs GABAérgicos do *striatum* observadas em modelos da HD (ex.: efeitos citotóxicos da mHtt; efeitos deletérios dos fenômenos excitotóxicos glutamato-dependentes; e efeito citotóxico sinérgico entre os efeitos citotóxicos das proteínas mHtt e os efeitos deletérios dos fenômenos excitotóxicos glutamato-dependentes); assim como as hipóteses relativas aos mecanismos das mortes celulares (ex.: apoptose e necrose) induzidas por meio da estimulação dos receptores de NMDA, na ausência e na presença da inibição do complexo mitocondrial II (succinato desidrogenase). Desta forma, objetivamos, também, a compreensão dos eventos associados ao contexto das sinapses corticoestriatais, notados quando se manifesta os sintomas motores hipercinéticos característicos da “coreia de Huntington”. As funções de causalidade (causa-efeito) analisadas se fundamentaram nas correlações previstas entre as estimulações dos receptores de NMDA com concentrações crescentes do agonista QA e os desenvolvimentos dos fenômenos excitotóxicos glutamato-dependentes. As análises se fundamentaram nos ensaios de determinação das variações transientes das  $[Ca^{2+}]_i$  e dos percentuais (%) de viabilidade celular. O QA foi selecionado como fármaco agonista glutamatérgico, pois apresenta um potencial excitatório elevado; *clearance* sináptico reduzido; seletividade aos NMDARs constituídos pelas subunidades NR2A e o NR2B; especificidade relativa aos MSNs GABAérgicos do *striatum* que expressam substância P e receptores dopaminérgicos D2; efetividade em baixas concentrações em neurônios do *striatum* e do hipocampo; capacidade de aumentar a liberação de glutamato na fenda sináptica; e capacidade de diminuir a recaptção de glutamato na fenda sináptica (Lugo-Huitron *et al.*, 2013). O tratamento com 3-NP objetivou mimetizar os efeitos citotóxicos das proteínas mHtt que se correlacionam à inibição do complexo mitocondrial II. A adição intermediária de adenosina objetivou a compreensão dos potenciais neuroprotetores/neurotóxicos dos receptores purinérgicos P1 frente aos fenômenos excitotóxicos glutamato-dependentes.

### **1.2.2. Protocolo *five stage* de neurodiferenciação das mESCs em MSNs GABAérgicos do *Striatum***

Os MSNs GABAérgicos do *striatum* foram obtidos por meio da submissão da linhagem de células-tronco embrionárias de camundongo (*Mouse Embryonic Stem Cells* – mESCs) E14tg2a ao método *five stage* de Okabe et al. (1996). Okabe et al. (1996) foram os primeiros a publicar o método *five stage* de neurodiferenciação das células-tronco embrionárias de camundongos (*Mouse*

*Embryonic Stem Cells* – mESCs) em neurônios pós-mitóticos GABAérgicos. Este trabalho se tornou um clássico, pois demonstrou como diferentes moléculas influenciam a seletividade, a proliferação e a diferenciação celular quando adicionadas aos meios de cultura; além de descreverem as etapas necessárias ao neurodesenvolvimento do SNC, assim como a maneira de mimetizá-las e acompanhá-las *in vitro*.

O método *five stage* de neurodiferenciação das mESCs consiste em cinco etapas de procedimentos técnicos (Figura 9), as quais são realizadas entre seguintes seis fases de diferenciação celular: fase inicial blastocística - representada pelas mESCs (propriedade de autorenovação e pluripotência semelhante às células da massa interna do blastocisto embrionário - podem se diferenciar em células da endoderme, mesoderme e ectoderme); fase de gastrulação - produção dos três folhetos embrionários por meio da formação dos corpos embrióides (*Embryoid Bodies*, EBs); fase de seleção das células precursoras neurais (*Neural Progenitor Cells*, NPCs) derivadas dos EBs - seleção das células neuroepiteliais; fase de proliferação das NPCs na presença de bFGF - expansão de células nestina-positivas (neuroepiteliais); fase de diferenciação das NPCs em linhagens neuronais (neurônios pós-mitóticos) após a retirada do bFGF - diferenciação das células nestina-positivas; e fase de maturação neuronal - caracterizada pela expressão de macromoléculas específicas, manutenção de propriedades eletrofisiológicas e responsividade farmacológica neuroespecífica.

A neurodiferenciação das mESCs se iniciam a partir da retirada do fator de inibição da leucemia (*leukemia inhibitory factor* - LIF) do meio de cultura (Okabe *et al.*, 1996; Shin *et al.*, 2012; Smukler *et al.*, 2006). As mESCs cultivadas na ausência de LIF se tornam EBs quando mantidas em um ambiente livre de superfície de aderência (etapa 1). Esta etapa nos permite mimetizar o embrião em desenvolvimento, pois viabiliza a formação dos três folhetos embrionários (Smukler *et al.*, 2006). Posteriormente, as células são submetidas às seguintes etapas: seleção clonal - seleção das células precursoras neuroepiteliais (ou NPCs) provindas da neuroectoderme (etapa 2); proliferação seletiva das NPCs por meio da adição do bFGF (etapa 3); cessamento da proliferação e início da diferenciação neuronal (produção de neurônios pós-mitóticos) após a retirada do FGF (etapa 4); e maturação dos neurônios pós-mitóticos excitatórios (neurônios glutamatérgicos) e inibitórios (MSNs GABAérgicos) (etapa 5).

Após a retirada do bFGF, o mecanismo por meio do qual os neurônios pós-mitóticos se tornam GABAérgicos é incerto. A título de conhecimento, citaremos as hipóteses relativas à neurodiferenciação GABAérgica: o FGF (fibroblast growth factors) interfere na especificação neural por meio da indução da diferenciação das células ectodermais em células neuroectodermais a partir da restrição (modulação negativa) dos mecanismos de promoção da diferenciação das células ectodermais em células epidermais diante do fator BMP (*bone morphogenetic protein*) (Wilson *et al.*, 2001; Patthey e Gunhaga, 2014); a neurodiferenciação ocorre por meio de um mecanismo do tipo '*default*', o qual, na ausência de estímulos externos, permite que as células-tronco embrionárias se tornem células neurais primitivas (Smukler *et al.*, 2006). Contudo, na ausência do FGF, as células neurais possuem sobrevivência limitada e baixa capacidade proliferativa (Smukler *et al.*, 2006). Assim, o FGF permite que as células precursoras neurais, presentes nas organizações morfológicas denominadas 'rosetas', se estabeleçam após a retirada do LIF (Ying *et al.*, 2003). Além disso, sabemos que o FGF bloqueia a via de sinalização do PDGF (*Platelet-derived growth factor*), a qual é responsável por induzir a diferenciação das células precursoras neurais em células da glia (oligodendrócitos e astrócitos) (Strubing *et al.*, 1995). Deste modo, utilizamos o bFGF como agente mitógeno, considerando que as células precursoras neurais se diferenciariam em neurônios pós-mitóticos GABAérgicos maduros (funcionais) apenas após a sua retirada; e como um fator que aumenta a seletividade do protocolo *five stage* para neurônios pós-mitóticos GABAérgicos.

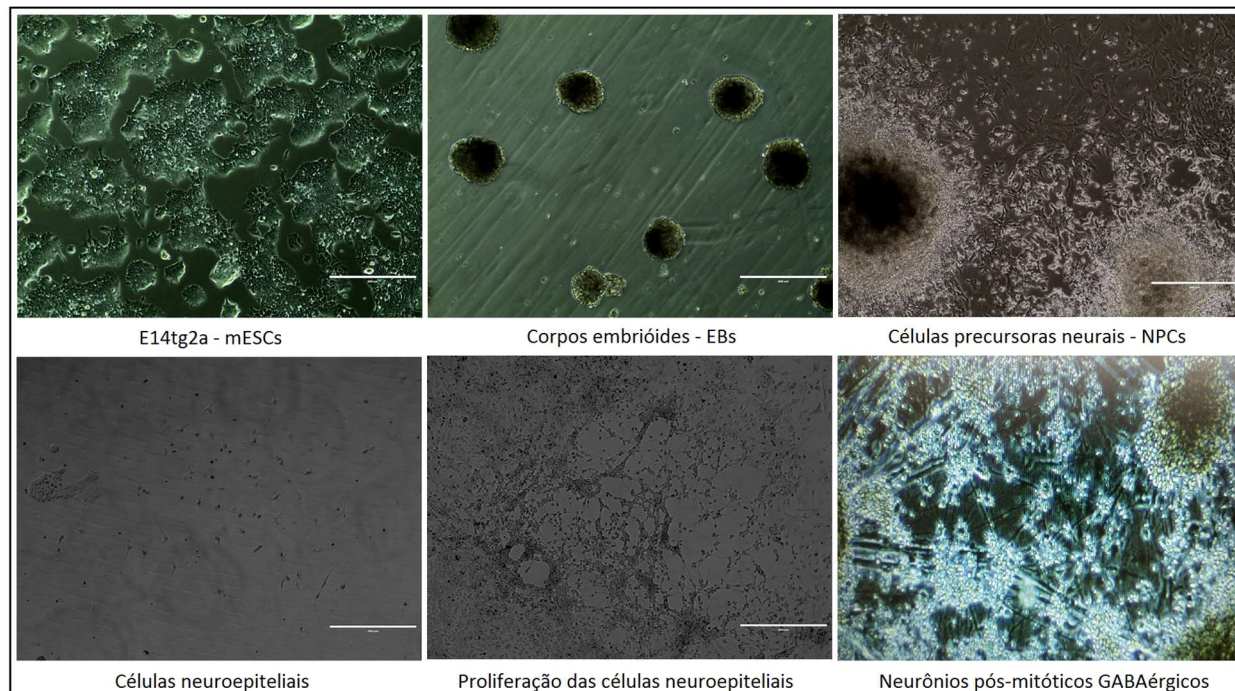


Figura 9. Etapas do método *five stage* de diferenciação das mESCs E14TG2a em neurônios pós-mitóticos. Diferenciação de células precursoras neurais a partir de células-tronco embrionárias (mESCs p/ EBs); seleção neural (EBs p/ NPCs); proliferação das células precursoras neurais na presença de bFGF; diferenciação das células precursoras neurais em linhagens neuronais (neurônios pós-mitóticos); e maturação neuronal.

### 1.2.3. Caracterização dos MSNs GABAérgicos do *striatum*

Práticas comuns e necessárias à caracterização das células neurais incluem as descrições das propriedades morfológicas, neuroquímicas e eletrofisiológicas (Tepper, J. *et al.*, 2008). Segundo Okabe *et al.* (1996), neurônios pós-mitóticos devem atender aos seguintes critérios: desenvolvimento de estruturas especializadas tais como dendritos e axônios; compartimentalização de proteínas do citoesqueleto em regiões celulares específicas; expressão de uma variedade de neurotransmissores, receptores específicos e canais iônicos; formação de conexões sinápticas; e possibilidade de ativar vias de sinalização *downstream* que seja iniciadas pela estimulação dos receptores plasmáticos de glutamato. Shin *et al.* (2012), por sua vez, defendem a necessidade de que os neurônios pós-mitóticos derivados das mESCs por meio do método *five stage* não devem apresentar apenas uma aparência característica dos MSNs GABAérgicos do *striatum*, mas que também devem demonstrar a posse das propriedades neurofisiológicas que lhes caracterizam como neurônios maduros.

Desta forma, um procedimento padrão necessário à caracterização dos MSNs GABAérgicos do *striatum* deve respeitar critérios como: corpos celulares em formato oval (Shin *et al.*, 2012); reações imunocitoquímicas anti-GAD67-positiva (Glutamato descarboxilase), anti-DARP-32-positiva (fosfoproteína dopamina-/cAMP-regulada) e anti-TUJ1-positiva ( $\beta$ -3-tubulina) (Shin *et al.*, 2012); capacidade de despolarizar a membrana plasmática e desenvolver potenciais de ação (Okabe *et al.*, 1996); e resposta farmacológica positiva para os estímulos com agonistas de receptores de NMDA (Okabe *et al.*, 1996).

Assim, objetivando avançar nos procedimentos de caracterização dos neurônios pós-mitóticos obtidos por meio do método *five stage*, analisamos as características universais e necessárias relativas aos MSNs GABAérgicos do *striatum* que integram as vias direta e indireta dos circuitos córtico-BGs referentes ao controle da coordenação motora, selecionando aquelas mais relevantes a fim de torná-las marcadores úteis à caracterização destas subclasses de neurônios, conforme as suas especificidades. Neste sentido, incluímos as características dos diferentes MSNs GABAérgicos do *striatum* constituintes das distintas conexões corticoestriatais integrantes das vias direta ou indireta. As propriedades selecionadas se referem aos padrões de expressão molecular e aos perfis das respostas farmacológicas.

Dentre as propriedades relativas à expressão molecular, incluímos: marcação dos neurônios glutamatérgicos - objetiva avaliar a heterogeneidade da cultura dos neurônios pós-mitóticos obtidos por meio do método *five stage* (a mistura de neurônios glutamatérgicos e GABAérgicos nos possibilita interpretar a cultura celular como semelhante às conexões corticoestriatais); marcação dos neurônios GABAérgicos do *striatum* com os anticorpos anti-encefalina, anti-A<sub>2A</sub>Rs e anti-D2Rs - objetiva avaliar a presença de neurônios pós-mitóticos semelhantes aos MSNs GABAérgicos do *striatum* integrantes da via indireta do circuito córtico-BG; e a marcação dos neurônios GABAérgicos do *striatum* com os anticorpos anti-substância P e anti-D1Rs - objetiva avaliar a presença de neurônios pós-mitóticos semelhantes aos MSNs GABAérgicos do *striatum* integrantes da via direta do circuito córtico-BG. Os padrões de expressão molecular nos permitem inferir sobre a especificidade imunocitoquímica dos MSNs GABAérgicos; entretanto, não nos possibilita fundamentar explicações neurofisiológicas. Uma alternativa de resolução desta questão trata-se da caracterização dos perfis das respostas farmacológicas dos neurônios pós-mitóticos adquiridos por meio do método *five stage*, pois os



distintos MSNs GABAérgicos do *striatum* (via direta ou indireta) apresentam perfis farmacológicos específicos (efeitos) frente às diferentes moléculas neuroativas (ex.: neurotransmissores, coneurotransmissores e neuromoduladores).

As propriedades farmacológicas analisadas foram: responsividade à estimulação glutamatérgica - haja vista as aferências glutamatérgicas advindas dos neurônios piramidais corticais glutamatérgicos (Sano *et al.*, 2013; Lanciego *et al.*, 2012; Huerta-Ocampo *et al.*, 2014; Ploktin e Goldberg, 2018); responsividade à estimulação dopaminérgica (inibição ou excitação) - haja vista que os MSNs GABAérgicos do *striatum* integrantes da via direta apresentam respostas excitatórias, enquanto aqueles integrantes da via indireta apresentam respostas inibitórias (Pivonello *et al.*, 2007; Perreault *et al.*, 2014); potencial neuroprotetor e neurotóxico da adenosina (agonista de receptores A<sub>2A</sub>) frente aos estímulos excitotóxicos do glutamato - em vista das nossas discussões a respeito da que os MSNs GABAérgicos do *striatum* (via direta) devem ser protegidos dos efeitos excitotóxicos do glutamato por meio do pré-tratamento com um agonista de receptores purinérgicos A<sub>2A</sub>.

## 2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Estabelecer o modelo *in vitro* dos MSNs GABAérgicos do *striatum* a partir da neurodiferenciação das células-tronco embrionárias de camundongo (*mouse embryonic stem cells* - mESCs) ES-E14TG2a, conforme o método *five stage* de Okabe *et al.* (1996).

Estabelecer o modelo *in vitro* dos neurônios HT-22 diferenciados responsivos às estimulações glutamatérgicas (ex.: receptores NMDA) a partir da neurodiferenciação das células de linhagem neural do hipocampo HT22, conforme Liu *et al.* (2009) e Zhao *et al.* (2012) - este modelo foi necessário à padronização dos ensaios farmacológicos posteriormente realizados nos MSNs GABAérgicos do *striatum* obtidos por meio do método *five stage*.

Analisar as características morfológicas, imunocitoquímicas, moleculares, eletrofisiológicas e farmacológicas dos MSNs GABAérgicos do *striatum* obtidos por meio do método *five stage*, conforme Okabe *et al.* (1996) e Shin *et al.* (2012).

Analisar as características imunocitoquímicas, moleculares, e farmacológicas dos MSNs GABAérgicos do *striatum* obtidos por meio do método *five stage* e compará-las aos perfis determinados a partir da avaliação das propriedades específicas dos MSNs GABAérgicos do *striatum* integrantes das vias direta e indireta do controle da coordenação motora.

Desenvolver e padronizar um modelo *in vitro* (celular) da HD fundamentado no pré-tratamento dos neurônios pós-mitóticos GABAérgicos com 3-NP seguido pelo tratamento com QA.

Analisar as funções de causa-efeito entre as concentrações do agonista dos receptores NMDA ácido quinolínico (QA) (variável independente) e as variações transientes das  $[Ca^{2+}]_c$  (variável dependente), na ausência e na presença do 3-NP; e mediante o pré-tratamento com adenosina.

Avaliar os perfis das funções de variação transiente das  $[Ca^{2+}]_c$  em termos dos fenômenos excitotóxicos desenvolvidos a partir das aplicações do QA, na ausência e na presença do 3-NP; e mediante o pré-tratamento com adenosina.

Analisar as funções de causa-efeito entre as concentrações de QA e as atividades metabólicas celulares mensuradas por meio do ensaio de oxido-redução alamarBlue®, na ausência e na presença do 3-NP; e mediante o pré-tratamento com adenosina.

Analisar as funções de causa-efeito entre as concentrações de QA e as atividades de lactato desidrogenase extracelular mensuradas por meio do *kit* LDH Liquiform, na ausência e na presença do 3-NP; e mediante o pré-tratamento com adenosina.

Avaliar o efeito neuroprotetor da adenosina frente ao tratamento dos neurônios pós-mitóticos com o QA, na ausência e na presença do 3-NP, a partir dos resultados obtidos por meio dos métodos (ensaios) de análise da citotoxicidade alamarBlue® e LDH Liquiform.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Cultivo Celular e Neurodiferenciação

##### 3.1.1. Células-tronco embrionárias murinas ES-E14TG2a

As células-tronco embrionárias murinas ES-E14TG2a (ATCC® CRL-1821™) foram utilizadas como modelo de mESCs necessário ao método *five stage* de neurodiferenciação. As ES-E14TG2a foram cultivadas em DMEM *High glucose* suplementado com 15% de SFB (soro fetal bovino), 1% de aminoácidos não-essenciais, 2 mM de L-glutamina, 50 µg/mL de penicilina e estreptomicina, 2 mM de piruvato de sódio na presença de LIF (*leukemia inhibitory factor*) a 10<sup>3</sup> U ESGRO/LIF (Meio 1). A primeira etapa do método *five stage* promove a diferenciação das mESCs (estágio blastocístico) em corpos embrióides (*Embryoid Bodies*, EBs) (estágio de gastrulação). Nesta etapa, as ES-E14TG2a foram cultivadas em placas de petri livres de superfície de aderência utilizando Meio 1 ausente de LIF (Meio 2) por 4 dias. A segunda etapa do protocolo objetiva selecionar as células precursoras neurais nestina-positivas (*Neural Progenitor Cells*, NPCs). Os EBs foram transpostos para placas de poliestileno de baixa de aderência e cultivados em meio de cultura DMEM F-12 suplementado com insulina 5 µg/ml, apotransferrina 50 µg/ml, selenito de sódio 30 nM, fibronectina 5 µg/ml e L-glutamina 2 mM (Meio 3) por 7 dias. A terceira etapa do método *five stage* permite a proliferação das NPCs a partir da adição do bFGF. Nesta etapa, as NPCs foram cultivadas em meio de cultura DMEM F-12 suplementado com insulina 25 µg/ml, apotransferrina 50 µg/ml, selenito de sódio 30 nM, progesterona 20 nM, putrecina 100 µM, L-glutamina 2 mM, laminina 1 µg/ml e bFGF 10 ng/ml (Meio 4) por 4 dias. A quarta etapa proporciona a diferenciação das NPCs em neurônios pós-mitóticos a partir da retirada do bFGF. Os neurônios pós-mitóticos foram cultivados em meio de cultura Meio 4 ausente de bFGF (Meio 5) por 7 dias. A quinta etapa se consiste em um período de maturação neuronal. Estes neurônios pós-mitóticos foram cultivados em meio de cultura Neurobasal (Invitrogen, Carlsbad, CA) suplementado N2 e B27 (Meio 6) por 2-4 dias. Este período de maturação é fundamental para a expressão das macromoléculas que se correlacionam às funções eletrofisiológicas e farmacológicas. Em qualquer etapa do método *five stage*, os meios de cultura utilizados foram substituídos a cada dois dias.

### 3.1.2. HT-22 (Mouse Hippocampal Neuronal Cell Line)

As células HT22 foram mantidas em DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) suplementado com 10% FBS (*fetal bovine serum*) e diferenciadas em meio de cultura NeuroBasal (Invitrogen, Carlsbad, CA) suplementado com  $1 \times N2$  por 24–48 h, conforme descrito por Liu *et al.* (2009).

## 3.2. Caracterização dos neurônios pós-mitóticos

Os neurônios pós-mitóticos foram caracterizados segundo as propriedades dos MSNs GABAérgicos do *striatum* descritas por Okabe *et al.* (1996) e por Shin *et al.* (2012). Além destas, incluímos aquelas relativas às propriedades dos MSNs GABAérgicos do *striatum* constituintes das conexões corticoestriatais integrantes das vias direta e indireta do circuito córtico-BG. As características avaliadas se fundamentaram nas análises imunocitoquímicas, moleculares, eletrofisiológicas e farmacológicas.

### 3.2.1. Microscopia confocal

As análises das expressões moleculares foram realizadas utilizando-se das técnicas de marcação por imunocitoquímica, visualização em microscópio de fluorescência confocal, quantificação por citometria de tecido e análise por meio do software StataQuest - 6.0.115 (TissueGnostics). As células foram fixadas por meio da solução de paraformaldeído 4% em solução de tampão fosfato (phosphate-buffered saline - PBS) (pH 7.4) a temperatura ambiente por 20-30 minutos; lavadas três vezes com PBS 1X a 4°C; permeabilizadas com solução Triton X-100 0.1% em PBS 1X; e incubadas com solução Triton X-100 0.1% em PBS 1X contendo soro de cabra normalizado (ou com soro normal de asno - conforme a origem do anticorpo secundário) a 5% por 30 minutos. Em seguida, as células foram incubadas overnight com a solução de Triton X-100 0.1% e soro de cabra normalizado a 5% em PBS 1X contendo os anticorpos primários a 4°C mediante agitação. Os anticorpos primários analisados foram: mouse anti-GAD 65/67, 1:200 (ABCAM); goat anti-DARP 32, 1:50 (ABCAM); mouse anti-TUJ 1, 1:500 (SIGMA ALDRICH); rabbit anti-GFAP, 1:200 (ABCAM); rabbit anti-substância P, 1:100 (SIGMA ALDRICH); mouse anti-GABA, 1:100 (ABCAM); rabbit anti-Enk (encefalina), 1:400 (MERCK); mouse anti-A2AR, 1:150 (ABCAM); rabbit anti-D2R, 1:150 (ABCAM); mouse anti-HTT, 1:200 (ABCAM); e rabbit anti-NMDAR1, 1:150 (ABCAM). Posteriormente, as soluções contendo os anticorpos primários foram removidas; e as células foram lavadas três vezes com solução Triton X-100 0.1% em PBS

1X por 10 minutos. Finalmente, as células foram incubadas com a solução Triton X-100 0.1% em PBS 1X contendo anticorpos secundários conjugados com fluoróforos (Alexa 488, 555 ou 647; Goat ou donkey; FITC, TRITC, CY3 ou Cy5) em diluições de 1:500-1:1000 por 45 minutos, a temperatura ambiente, mediante agitação e protegidas da luz. As células foram, então, lavadas três vezes com solução Triton X-100 0.1% em PBS 1X por 10 minutos. Por último, as amostras foram incubadas com solução Triton X-100 0.1% em PBS 1X contendo o reagente DAPI a 300nM por 5-10 minutos; e lavadas uma vez com solução Triton X-100 0.1% em PBS 1X. Uma amostra 'controle negativo' foi acompanhada a partir da incubação com a solução tampão detergente sem a adição dos anticorpos primários, sendo caracterizada por meio da ausência de fluorescência. Por último, uma gota do meio de montagem Fluoromount G foi adicionada à cada amostra, seguido pela sobreposição de uma lamínula, e mantidas a 4 °C protegidas da luz até o momento das análises.

### **3.2.2. Extração de RNA total, síntese de cDNA e PCR em tempo real**

Para as análises de expressão dos mRNAs, selecionamos três grupos amostrais: ES-E14TG2a em estágio indiferenciado (*undifferentiated* - UND); ES-E14TG2a no estágio final da diferenciação (MSNs GABAérgicos do striatum - GABAN); e cérebros de camundongos (Brain) (controle positivo). Os mRNAs foram isolados a partir das amostras supracitadas que se encontravam em reagente Trizol, conforme as instruções do fabricante (Invitrogen). As quantificações dos materiais genéticos foram realizadas por meio das análises de absorvância a 260/280 nm utilizando o aparelho NanoDrop (Thermo Scientific). As integridades dos materiais genéticos foram avaliadas por meio da técnica de eletroforese em gel de agarose a 1%. Os RNAs totais foram tratados com RNase-free DNase (Ambion) e, posteriormente, 2 µg destas amostras foram utilizados para as sínteses dos cDNAs por meio das reações da superscript II RNase H-reverse transcriptase (Invitrogen), conforme as instruções do fabricante. As reações de síntese dos cDNAs foram constituídas por 1 µg de dNTP (10 mM), 2 µl de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 1 µl oligodT (50 ng/ml), 200 U transcriptase reversa, 40 U de inibidor de RNase e 2 µl de tampão (10x) a fim de completar um volume final de 20 µl. As reações foram incubadas a 20 °C por 10 minutos, 42 °C por 45 minutos, 95 °C por 5 minutos, e 4 °C por 10 minutos.

As quantificações dos materiais genéticos das amostras foram realizadas por meio do ensaio de PCR em tempo real. As reações foram constituídas por 1 µl de cDNA, 3 µl de primer

Forward e Reverse (Tabela 1) e 6 µl de SYBR®-Green Dye. O termociclador foi programado conforme as condições necessárias à amplificação, sendo um período inicial de desnaturação a 95 °C por 10 minutos; 40 ciclos compostos pelos intervalos de desnaturação a 95 °C por 30 segundos, anelamento e extensão a 60 °C por 45 segundos; e um período final de extensão (curva de dissociação) a 72 °C por 10 minutos. A PCR foi realizada com auxílio do equipamento termociclador ABI One Plus (Applied Biosystems). O SYBR®-Green Dye foi utilizado como tecnologia de detecção dos materiais genéticos amplificados. As reações foram realizadas em triplicata e nenhum amplicon foi detectado no controle negativo. A técnica do  $\Delta\Delta CT$  foi utilizada nas análises de quantificação relativa das expressões gênicas, conforme descrito por Pfaffl (2001). O gene da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) foi utilizado como controle interno (housekeeping) nas normalizações.

Os genes e seus respectivos conjuntos de primers (sequência forward, 5'-3'; sequência reverse, 3'-5') foram:

GAPDH	(TGCACCACCAACTGCTTAG; GGATGCAGGGATGATGTTC),	GFAP	(AAGAGTGGTATCGGTCCAAGTTTG; CAGTTGGCGGCGATAGTCAT),
S100 $\beta$	(GAGCAGGAAGTGGTGGACAA; CACTCCCCATCCCCATCTT),	TUJ1	(AGACCTACTGCATCGACAATGAAG; GCTCATGGTAGCAGACACAAGG),
Nestin	(GAGAGTCGCTTAGAGGTGCA; CCACTTCCAGACTCCGGGAC),	mGAD2	(CACCGAGCTGATGGCATCTT; GGGCGCAGGTTGGTAGTATT),
mDARP32	(CCAACCCCTGCCATGCTTT; TTGGGTCTCTTCGACTTTGGG),	mPENK	(GAGAGCACCAACAATGACGAA; TCTTCTGGTAGTCCATCCACC),
ecto-5'-nucleotidase/cd73	-	hsE5NT/CD73	-
GGGTACTTCCCCGCACGCAC),	AdoRA1	GGGTACTTCCCCGCACGCAC),	AdoRA1
(AGGTGTGGACATCGTGGTGGGA; GCAGGAAAGGGGTGGATGAA; CGCTGGTGCCCGATTCTTA),	AdoRA2A	(AGGTGTGGACATCGTGGTGGGA; GCAGGAAAGGGGTGGATGAA; CGCTGGTGCCCGATTCTTA),	AdoRA2A
(TCCTCACGCAGAGTTCCATC; TACCCGTCACCAAGCCATTG),	AdoRA2B	(TCCTCACGCAGAGTTCCATC; TACCCGTCACCAAGCCATTG),	AdoRA2B
(GGAACCGAGACTTCCGCTAC; GACTGAGAGTAGACTGCGCC),	AdoRA3	(GGAACCGAGACTTCCGCTAC; GACTGAGAGTAGACTGCGCC),	AdoRA3
(GAAGTAAGAACGGTGGCCCT; CCCTGCCTTCCCATTAACT),	mNMDAR1	(GAAGTAAGAACGGTGGCCCT; CCCTGCCTTCCCATTAACT),	mNMDAR1
(CTGCGACCCCAAGATTGTCAA; TATTGGCCTGGTTTACTGCCT),	mNMDAR2A	(CTGCGACCCCAAGATTGTCAA; TATTGGCCTGGTTTACTGCCT),	mNMDAR2A
(ACGTGACAGAACGCGAACTT; TCAGTGCGGTTTCATCAATAACG),	mAMPA-R1	(ACGTGACAGAACGCGAACTT; TCAGTGCGGTTTCATCAATAACG),	mAMPA-R1
(CAAGTTTTCCCGTTGACACATC; CGGCTGTATCCAAGACTCTCTG),	mAMPA-R2	(CAAGTTTTCCCGTTGACACATC; CGGCTGTATCCAAGACTCTCTG),	mAMPA-R2
(TTCTCCTGTTTTATGGGGACTGA; CTACCCGAAATGCACTGTATTCT),	mVGLUT1	(TTCTCCTGTTTTATGGGGACTGA; CTACCCGAAATGCACTGTATTCT),	mVGLUT1
(TTGTGGCTACCTCCACCCTAA; CAGCCGACTCCGTTCTAAGG),	mVGLUT2	(TTGTGGCTACCTCCACCCTAA; CAGCCGACTCCGTTCTAAGG),	mVGLUT2

(TGGAAAATCCCTCGGACAGAT; CATAGCGGAGCCTTCTTCTCA), mGlutamine synthetase (TGAACAAAGGCATCAAGCAAATG; CAGTCCAGGGTACGGGTCTT), TH (CCTTCCGTGTGTTTCAGTGC; TCAGCCAACATGGGTACGTG), mTac1 (AAGCGGGATGCTGATTCCCTC; TCTTTCGTAGTTCTGCATTGCG).

### 3.2.3. Análise dos potenciais de ação

As medidas de variação do potencial de membrana plasmática foram analisadas com auxílio do *kit* FLIPR® Membrane Potential Assay (Molecular Devices Corporation), conforme as instruções do fabricante. As análises microfluorimétricas foram realizadas por meio do instrumento *FlexStation 3 Multi-Mode Microplate Reader*. As variações das intensidades de fluorescência são proporcionais às variações dos potenciais de membrana plasmática. Neste ensaio, as membranas plasmáticas neurais foram despolarizadas por meio da adição de concentrações crescentes de cloreto de potássio (KCl).

### 3.2.4. Citometria de fluxo

Os neurônios HT-22 diferenciados foram desprendidos das placas de cultura com solução Tryple™ Express, suspensas em solução PBS 1X e centrifugadas a 1000g por 10min; suspendidas em solução fixadora de paraformaldeído a 4% e mantidas em gelo sob proteção da luz por 30min; lavadas com solução PBS 1X; incubadas com a solução de bloqueio contendo soro fetal bovino 2% e Triton 100X 0.1% em PBS 1X por 30min; e centrifugadas novamente. As células foram então incubadas com os anticorpos primários por 1h; e, posteriormente, incubadas com os anticorpos secundários Alexa Fluor 488 anti-rabbit e Alexa Fluor 647 anti-mouse (Life Technologies, 1:1000) por 45min. Uma amostra de células não incubada com os anticorpos foi considerada 'controle negativo'. As amostras foram analisadas com auxílio do citômetro de fluxo Attune (Life Technologies, CA). O Alexa Fluor 488 foi excitado com o laser azul (488nm) e os comprimentos das ondas emitidas selecionados por meio do filtro 530/30. Alexa Fluor 647 foi excitado com o laser vermelho (638nm) e os comprimentos das ondas emitidas selecionados por meio do filtro 660/20. Os anticorpos primários utilizados foram: policlonal de coelho anti-TUJ1 (Sigma, 1:700), policlonal de coelho anti-V-Glut (Abcam, 1:500), policlonal de coelho anti-V-Gat (Merck, 1:250), policlonal de coelho anti-ChAT (Abcam, 1:500), policlonal de coelho anti-TH (Merck, 1:500), policlonal de coelho anti-D1R (Abcam, 1:100), policlonal de coelho anti-D2R (Abcam, 1:100), policlonal de cabra anti-ENK (Abcam, 1:500), policlonal de coelho anti-NMDAR



(Abcam, 1:100), policlonal de coelho anti-GAD65/67 (Abcam, 1:500), policlonal de cabra anti-GFAP (Santa Cruz, 1:500).

### 3.2.5. Ensaio farmacológicos

Os esquemas farmacológicos se iniciaram a partir do tratamento dos neurônios diferenciado com concentrações crescentes do QA. Os períodos de exposição aos tratamentos variaram conforme as técnicas analíticas. O método de determinação do valor de  $EC_{50}$  se fundamentou nos ensaios de citotoxicidade realizados por meio do AlamarBlue® Assay e de quantificação das variações transientes das  $[Ca^{2+}]_c$  realizados por meio do *kit FLIPR Calcium 3 Assay (Molecular Devices)*.

Os valores das concentrações efetivas (*effective concentration* - EC) do ácido quinolínico (QA) foram determinados por meio de um esquema metodológico fundamentado nas seguintes etapas técnico-analíticas: 1 - transformação dos dados brutos de intensidade de fluorescência por meio de cálculos aritméticos ( $E_0$ ); 2 - modelagem matemática fundamentada no modelo de Hill (função farmacológica do *sigmoid  $E_{max}$  model*) e determinação dos parâmetros da curva de correlação não linear ( $EC_{Max}$ ,  $EC_{50}$ ,  $EC_n$  e  $\alpha$  - coeficiente de sigmoidicidade); 3 - seleção das concentrações de trabalho; 4 - avaliação das diferenças estatísticas entre os valores dos efeitos observados por meio das análises dos p-valores, conforme o teste-t ou à *two-way ANOVA*; 5 - avaliação e discussão sobre os perfis de interação farmacológica.

Objetivando avaliar a capacidade do 3-NP 5mM (concentração não citotóxica) de potencializar os efeitos excitotóxicos do QA 8mM ( $EC_{50}$ ), as culturas de neurônios diferenciados foram divididas em dois grupos: grupo não pré-tratado com 3-NP e tratado com QA 8mM (controle); e grupo pré-tratado com o 3-NP 5mM e tratado com QA 8mM (tratamento). O pré-tratamento com 3-NP 5 mM foi realizado uma hora antes da adição do QA 8mM. Para os ensaios de citotoxicidade, as culturas de neurônios diferenciados foram incubadas com QA por 24h. Para as determinações das amplitudes máximas das variações transientes das  $[Ca^{2+}]_c$ , as culturas de neurônios diferenciados foram expostas ao QA por 7 min – período da leitura (cinética). O tratamento das culturas neurais com 3-NP 5 mM não resultou em efeitos citotóxicos observáveis após 24h (dado não exibido).

Objetivando avaliar o potencial neuroprotetor da adenosina 250 $\mu$ M (concentração não citotóxica), as culturas de neurônios diferenciados foram divididas em quatro grupos: grupo não pré-tratado com 3-NP e tratado com QA 8mM (controle); grupo não pré-tratado com 3-NP, pré-tratado com adenosina 250 $\mu$ M e tratado com QA 8mM (tratamento 1); grupo pré-tratado com 3-NP 5mM e tratado com QA 8mM (controle 2); grupo pré-tratado com 3-NP 5mM, pré-tratado com adenosina 250 $\mu$ M e tratado com QA 8mM (tratamento 2). O pré-tratamento com 3-NP 5 mM foi realizado uma hora antes da adição do QA 8mM. O pré-tratamento com adenosina 250  $\mu$ M foi realizado trinta minutos (30 min) antes da adição do QA 8mM. Os períodos de exposição das culturas de neurônios diferenciados foram os mesmos daqueles descritos na metodologia do ensaio anterior. Um volume equivalente de meio de cultura foi adicionado a um dos grupos de cada um dos pares (controle e 3-NP). A adenosina a 250  $\mu$ M não apresentou efeitos citotóxicos após 24h em ambas as condições (dado não exibido).

### **3.3. Ensaio farmacológicos**

#### **3.3.1. Ensaio de citotoxicidade**

##### **3.3.1.1. AlamarBlue® Assay**

O método do alamarBlue® Assay se fundamenta na relação diretamente proporcional entre a atividade metabólica de redução do reagente Alamar Blue dye (Biosource) e a quantidade de células viáveis contendo mitocôndrias competentes (Rebola *et al.*, 2005). O AlamarBlue® Assay é utilizado na determinação indireta da viabilidade celular a partir das análises comparativas entre as culturas controles e as culturas tratadas (Fatokun *et al.*, 2008). Os valores são expressos em termos da porcentagem (%) em relação ao controle, sendo os valores médios e os desvios dos múltiplos experimentos independentes comparados por meio dos testes estatísticos que lhe são apropriados (Fatokun *et al.*, 2008).

Neste ensaio, as leituras de fluorescência (ou absorvância) foram realizadas por meio do instrumento *FlexStation 3 Multi-Mode Microplate Reader* após 4 horas da adição do reagente analítico Alamar Blue dye (Biosource). Os dados foram analisados conforme as instruções do fabricante. As diminuições dos percentuais (%) das atividades metabólicas óxido-redutoras foram correlacionadas aos potenciais citotóxicos dos fármacos em suas respectivas concentrações após 24h de incubação a 37 °C e atm 5% CO<sub>2</sub>. Os dados foram apresentados de forma a podermos

correlacionar as condições farmacológicas dos grupos analisados às % de sobrevivência celular (ou % viabilidade celular). As análises das diferenças estatísticas entre os valores médios e os desvios foram realizadas conforme descrito no tópico 'Análises estatísticas'.

### 3.3.1.2. Determinação das atividades extracelulares de lactato desidrogenase (LDH)

A atividade de LDH extracelular foi determinada por meio do kit LDH Liquiform (Labtest), conforme as instruções do fabricante. As leituras de absorvância foram realizadas por meio do instrumento *FlexStation 3 Multi-Mode Microplate Reader*. Os dados foram apresentados de forma a correlacionar as diferentes condições farmacológicas às atividades extracelulares de LDH (U/L). Nos ensaios de citotoxicidade, os aumentos das atividades extracelulares de LDH se correlacionam de modo diretamente proporcional às quantidades de células mortas devido à indução de algum dano celular com resultante perda da integridade da membrana plasmática (Hartley *et al.*, 1993; Karanian *et al.*, 2006; Al-Sabahi *et al.*, 2014; Ahmed *et al.*, 2020; Ferreira *et al.*, 2020). Neste sentido, as perdas de integridade das membranas plasmáticas e as liberações de LDH no meio extracelular se correlacionam às mortes celulares por necrose (Champagne *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2004; Alexander *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2018).

### 3.3.2. Determinação das variações transientes das $[Ca^{2+}]_i$ por microfluorimetria

Os valores das variações transientes das concentrações citoplasmáticas de  $Ca^{2+}$  ( $[Ca^{2+}]_c$ ) foram determinados por meio do *kit* FLIPR® Calcium 4 Assay (Molecular Devices), conforme previsto pelo fabricante. As leituras de microfluorimetria foram realizadas utilizando o instrumento *FlexStation 3 Multi-Mode Microplate Reader*. Os valores das variações transientes das intensidades de fluorescência apresentam correlações diretamente proporcionais às variações transientes da  $[Ca^{2+}]_i$ . Os dados foram apresentados de forma a podermos correlacionar as condições farmacológicas dos grupos analisados aos aumentos das amplitudes máximas (delta) relativas às variações transientes das  $[Ca^{2+}]_i$ . Os valores das amplitudes máximas relativas às variações transientes da  $[Ca^{2+}]_i$  foram determinados ao longo de 7 minutos (min) de análise. Os valores médios das variações transientes da  $[Ca^{2+}]_i$  foram calculados por meio do *software* Softmax®.

### 3.4. Análises estatísticas

Os dados referentes aos ensaios farmacológicos foram adquiridos a partir de, no mínimo, três experimentos independentes. Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  SEM. As análises das diferenças estatísticas entre as duas condições dos neurônios pós-mitóticos (controle e 3-NP) foram realizadas por meio do teste t de Student (paramétrico) pareado. As comparações entre dois grupos de neurônios pós-mitóticos (controle e pré-tratado com adenosina) nas duas condições (controle e 3-NP) foram realizadas por meio da *two-way* ANOVA seguido pelo *Fisher's LSD test*. A avaliação das diferenças estatísticas entre os perfis de expressão dos mRNA detectados por meio da técnica de PCR nas amostras de células E14-TG2a indiferenciadas (UND), E14-TG2a diferenciadas (GABAN) e de cérebro de camundongo (Brain) foram realizadas utilizando o método *one-way* ANOVA seguido pela correção de Bonferroni. Os testes estatísticos foram realizados considerando os parâmetros de distribuição *two-tailed*. As análises de significância consideraram um p-valor  $<0.05$ . As análises foram feitas utilizando o *software* GraphPad Prism version 5.00.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1. Caracterização dos MSNs GABAérgicos do *striatum*

As caracterizações das células neurais se fundamentam nas propriedades morfológicas, neuroquímicas, moleculares, eletrofisiológicas e farmacológicas. Com base neste princípio, avaliamos as especificidades do método *five stage* em vista dos perfis diferenciais dos MSNs GABAérgicos do *striatum* constituintes das conexões *striatonigral* (via direta) e *striatopallidal* (via indireta). Neste sentido, a Figura 10 representa os ensaios de caracterização por imunofluorescência dos neurônios pós-mitóticos adquiridos por meio da neurodiferenciação das mESCs E14TG2a. A Figura 10A ilustra as marcações nucleares com DAPI e as reações imunocitoquímicas anti-TUJ1-positivas ( $\beta$ -III-tubulina), características das células neuronais (Chun *et al.*, 2016); e as morfologias típicas dos MSNs – corpos celulares em formato oval. A Figura 10B ilustra as reações imunocitoquímicas positivas anti-Htt e anti-GABA características das células de mamíferos e dos neurônios GABAérgicos, respectivamente (Sepers e Raymond, 2014; Pandey e Rajamma, 2018). A Figura 10C ilustra as reações imunocitoquímicas positivas anti-GAD67, anti-DARP-32 e anti-TUJ1 características dos MSNs GABAérgicos do *striatum*. A Figura 10D ilustra as reações imunocitoquímicas positivas anti-A<sub>2A</sub>R e anti-D2R características dos MSNs GABAérgicos do *striatum* da via indireta; e a reação positiva anti-substância P característica dos MSNs GABAérgicos do *striatum* da via direta (Lanciego *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2015; Ploktin e Goldberg, 2018).

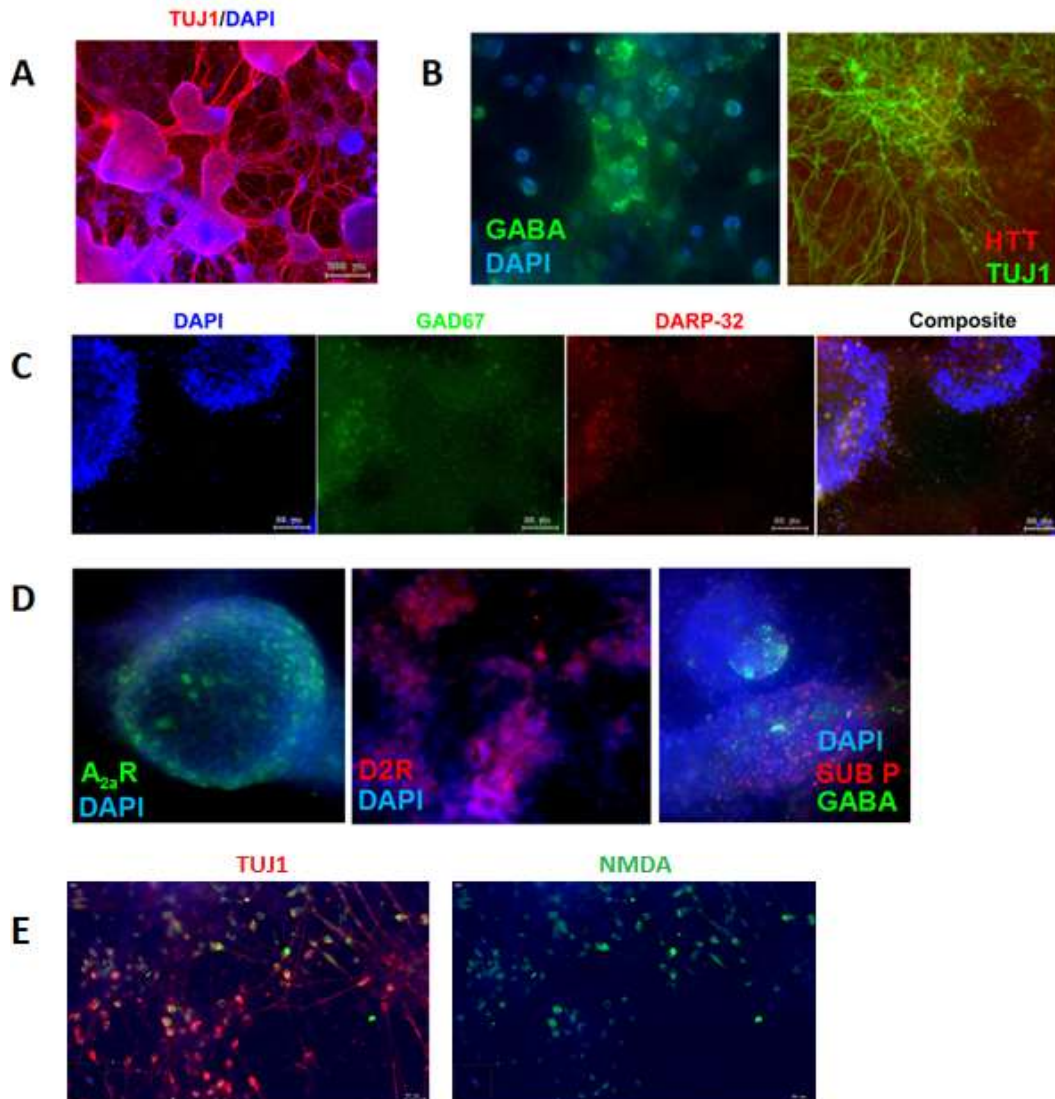


Figura 10. Caracterização por imunofluorescência dos neurônios pós-mitóticos adquiridos por meio do método *five stage* de neurodiferenciação das mESCs E14TG2a. Os neurônios pós-mitóticos apresentam perfis imunocitoquímicos semelhantes aos MSNs GABAérgicos do *striatum*. As células foram previamente fixadas em solução PFA 4% e, posteriormente, incubadas sucessivamente com os respectivos Ac primários e secundários. As leituras foram realizadas por meio da técnica de microscopia de fluorescência - microscópio Zeiss LSM 780-NLO. A - Marcação de material genético dupla-fita (DNA) com DAPI e de  $\beta$ -III-tubulina com TUJ1 (marcador de neurônios pós-mitóticos). B - Conjunto de biomarcadores característicos de neurônios pós-mitóticos GABAérgicos (GABA e  $\beta$ -III-tubulina), e da proteína Htt selvagem. C - Conjunto de biomarcadores característicos de MSNs GABAérgicos do *striatum* (glutamato descarboxilase, GAD67; e proteína dopamina-/cAMP-regulada, DARP-32). D - Biomarcadores característicos de MSNs GABAérgicos do *striatum* constituintes das conexões corticoestriatais integrantes da via indireta ( $A_{2a}R$  e D2R) e direta (substância P - SUB P). E - Marcação anti-TUJ1 (vermelho) e anti-NMDAR (verde). As imagens apresentadas são representativas de apenas um experimento realizado em duplicata.

As Figuras 11 e 12 representam, respectivamente, as capacidades dos neurônios pós-mitóticos de despolarizarem as membranas plasmáticas e de responderem às estimulações com glutamato de modo concentração-dependente. A despolarização das membranas plasmáticas representa uma característica fundamental dos neurônios pós-mitóticos maduros; enquanto os aumentos das concentrações citoplasmáticas de cálcio livre por meio dos influxos de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular resultantes das estimulações com glutamato referem-se à pressuposição de que existem a presença das aferências glutamatérgicas, as quais são características dos MSNs GABAérgicos do *striatum* (Okabe *et al.*, 1996; Shin *et al.*, 2012).

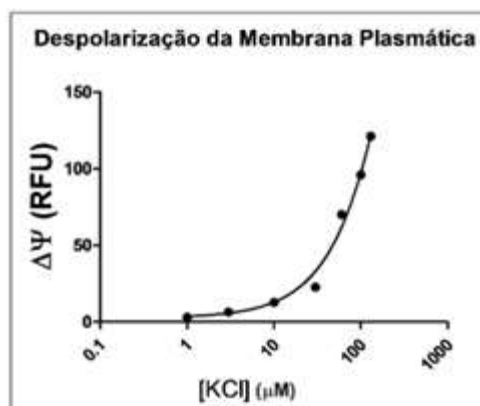


Figura 11. Os neurônios pós-mitóticos são capazes de despolarizar a membrana plasmática. O ensaio foi realizado por meio da adição de concentrações crescentes do agente despolarizante KCl. As medidas de variação do potencial de membrana plasmática foram analisadas por microfluorimetria (FlexStation III). Os resultados representam a diferença (subtração) entre as médias de fluorescência máxima e as médias de fluorescência mínima determinadas após a realização de 120 leituras no intervalo de 2 minutos. Os dados apresentados representam os valores adquiridos por meio de apenas um experimento.

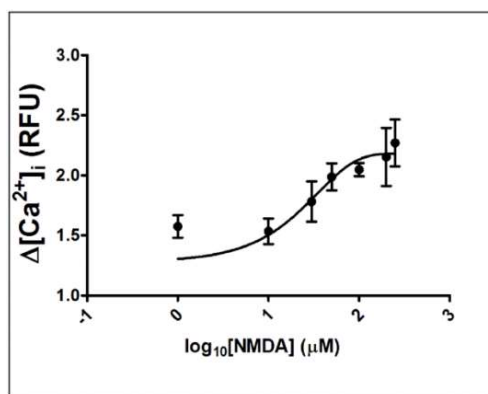


Figura 12. Medidas de  $\Delta[Ca^{2+}]_i$  por microfluorimetria. O gráfico representa a relação entre os logaritmos das concentrações de NMDA e os valores de fluorescência referentes às amplitudes máximas das variações transientes das  $[Ca^{2+}]_i$  adquiridas durante três minutos (3 min) de leitura. Os dados representam os valores das replicatas de apenas um experimento.

As análises das PCR em tempo real (Figura 13) revelaram que as culturas de neurônios pós-mitóticos adquiridos por meio do método *five stage* apresentam níveis aumentados dos transcritos dos mRNAs relativos aos  $A_1R$ ,  $A_{2A}R$ ,  $A_3R$ , NMDAR1, NMDAR2a, AMPA2, TUJ1, TAC1 (substância P), GAD2, VGLUT-1, VGLUT-2 e TH (tirosina hidroxilase) quando comparados ao grupo UND ( $p < 0.05$ ). Os níveis dos transcritos dos mRNAs relativos aos  $A_{2B}R$ , ecto-5'-nucleotidase/cd73, glutamina sintetase, DARP32, GFAP, S100b (marcador de astrócitos), AMPA1, nestina e PENK (encefalina) não foram diferentes aos observados no grupo UND ( $p > 0.5$ ). Os níveis dos transcritos dos mRNAs relativos ao gene da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) foram utilizados como 'controle interno' (*internal housekeeping gene*) nas normalizações.



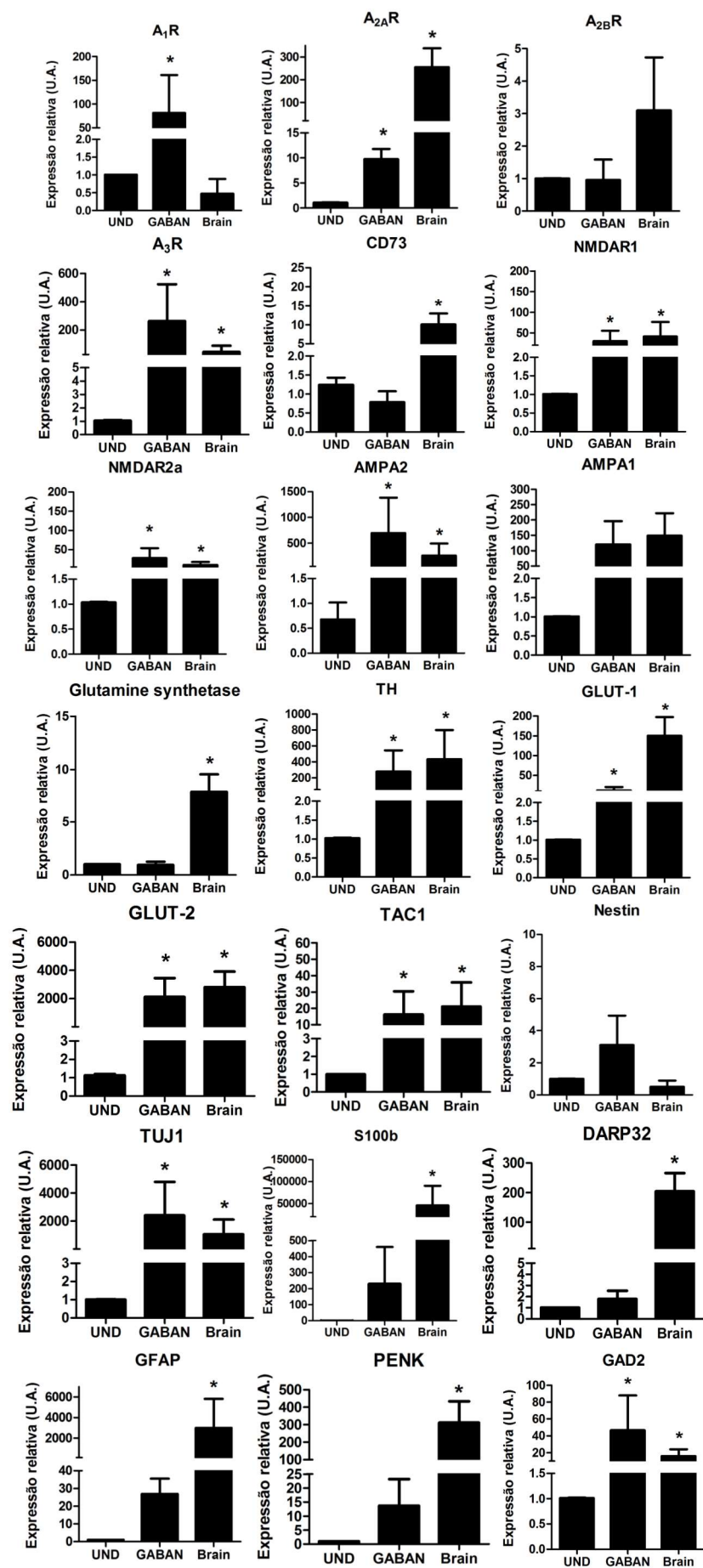


Figura 13. Análise dos mRNAs por meio do método da PCR em tempo real. A análise dos mRNAs transcritos foram realizadas a partir das amostras de mESCs E14tg2a (UND), de MSNs GABAérgicos do *striatum* adquiridos por meio do método *five stage* (GABAN) e de cérebro de camundongos (Brain). Os valores de expressão relativa (*arbitrary unit* - A.U.)  $\pm$  SEM foram determinados em razão dos dados de quantificação da expressão dos mRNAs referentes ao *internal housekeeping gene* relativo à enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH). Os dados são representativos de três experimentos independentes realizados em triplicata.

A partir dos conjuntos dos marcadores detectados por meio das determinações dos transcritos dos mRNAs e das reações imunocitoquímicas, concluímos que o método *five stage* produz culturas heterogêneas de neurônios maduros – expressam mRNAs relativos à proteína TUJ1 e apresentam reações imunocitoquímicas anti-TUJ1-positivas – compatíveis às conexões corticoestriatais e nigroestriatais, pois expressam marcadores característicos dos neurônios glutamatérgicos – mRNAs referentes aos transportadores VGLUT-1 e VGLUT-2 (Mahr e Aberle, 2006; Wozny *et al.*, 2018) –, dopaminérgicos – mRNAs referentes à tirosina hidroxilase (TH) (Hedreen, 1999; Aumann *et al.*, 2011; Mori *et al.*, 2006; Eid e Parent, 2015; Barkhuizen *et al.*, 2018; Salvatore *et al.*, 2019) – e dos MSNs GABAérgicos do *striatum* – mRNA referentes à glutamato descarboxilase (GAD2) e reações imunocitoquímicas positivas anti-GABA, anti-GAD67 e anti-DARP32 (Okabe *et al.*, 1996; Shin *et al.*, 2012).

Além disso, a partir dos dados obtidos, também podemos classificar os MSNs GABAérgicos do *striatum* conforme as vias direta e indireta dos circuitos córtico-BGs, pois apresentam níveis aumentados dos transcritos dos mRNAs relativos à TAC1 (substância P) e reações imunocitoquímicas positivas anti-substância P – características dos MSNs GABAérgicos da via direta –; e níveis aumentados dos transcritos dos mRNAs relativos aos receptores A<sub>2A</sub> e reações imunocitoquímicas positivas anti-D2R e anti-A<sub>2A</sub>R – características dos MSNs GABAérgicos da via indireta (Lanciego *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2015; Ploktin e Goldberg, 2018).

Em contrapartida, os níveis dos transcritos de mRNA relativos à glutamina sintetase semelhantes aos observados no grupo ‘UND’ e as reações imunocitoquímicas anti-GFAP-negativas indicam produção insignificante de astrócitos (dados não exibidos) (Halliday, 1996; HalBaber e Haghghat, 2010); enquanto os níveis dos transcritos de mRNA relativos à S100b (família das proteínas de ligação ao Ca<sup>2+</sup>) semelhantes aos observados no grupo ‘UND’ indicam produções insignificantes de células da glia (astrócitos e oligodendrócitos) e de células progenitoras neurais (Donato *et al.*, 2009).

As expressões relativamente aumentadas dos transcritos dos mRNAs relativos aos receptores purinérgicos A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub> e A<sub>3</sub> e aos receptores glutamatérgicos NMDA1, NMDA2a e AMPA2, assim como as reações imunocitoquímicas positivas anti-NMDAR, justificam a viabilidade dos nossos ensaios farmacológicos cujos objetivos foram avaliar as funções de causalidade das mortes celulares correlacionadas aos fenômenos excitotóxicos glutamato-dependentes e as funções neuroprotetoras da adenosina.

Os resultados apresentados demonstram que os neurônios pós-mitóticos obtidos por meio do método *five stage* – neurodiferenciação das mESCs – atendem aos critérios necessários à classificação de MSNs GABAérgicos do *striatum* maduros; contudo, os MSNs GABAérgicos representam apenas uma fração das culturas neuronais heterogêneas, as quais inferimos serem representativas das conexões nigroestriatais e corticoestriatais, sendo esta última integrante do circuito *striatonigral* (via direta) ou *striatopallidal* (via indireta). Esta hipótese se fundamentou nas observações das morfologias dos corpos celulares em formato oval característica dos MSNs (Figura 10A); nas reações imunocitoquímicas positivas anti-TUJ1, anti-GABA, anti-GAD67, anti-DARP-32, anti-NMDAR, anti-A<sub>2A</sub>R, anti-D2R e anti-substância P características dos MSNs GABAérgicos do *striatum* das vias direta e indireta (Figura 10B-C); nas capacidades de despolarizarem as membranas plasmáticas, as quais indicam as aparentes maturações e funcionalidades (Figura 11); nas capacidades de responderem às estimulações glutamatérgicas observadas por meio dos aumentos das concentrações de cálcio livre intracelular – os quais se devem aos influxos de Ca<sup>2+</sup> extracelular através dos NMDARs –, indicativas das aferências glutamatérgicas dos MSNs GABAérgicos do *striatum* (Figura 12); e nos níveis aumentados dos transcritos dos mRNAs relativos aos A<sub>1</sub>R, A<sub>2A</sub>R, A<sub>3</sub>R, NMDAR1, NMDAR2a, AMPA2, TUJ1, TAC1 (substância P), GAD2, VGLUT-1, VGLUT-2 e TH (Figura 13). Desta forma, estes resultados também justificam a uso deste modelo nas nossas pesquisas das interações farmacológica envolvendo os sistemas de sinalização glutamatérgica, dopaminérgica e purinérgica.

#### 4.2. Caracterização dos neurônios HT-22 diferenciados

Os neurônios HT-22 diferenciados foram submetidos às análises das reações de imunofluorescência em citômetro de fluxo. Os neurônios HT-22 diferenciados apresentaram características de uma cultura neuronal heterogênea não totalmente madura (Figura 14). Esta

afirmação se fundamenta nas reações imunocitoquímicas positivas anti-GFAP, anti-TUJ1, anti-V-Glut, anti-ChAT, anti-TH, anti-V-Gat, anti-NMDAR, anti-GAD65/67, anti-D1R, anti-D2R e anti-ENK. Estes dados também nos indicam as produções de neurônios glutamatérgicos, dopaminérgicos, colinérgicos e GABAérgicos passíveis de responderem aos estímulos glutamatérgicos e dopaminérgicos.

Em detalhes, os ensaios de caracterização dos neurônios HT-22 diferenciados por citometria de fluxo (Figura 14) demonstraram que, nas regiões duplo-marcadas, 97.7% da população expressava V-Glut e TUJ1; 98% da população expressava ChAT e TUJ1; 99% da população expressava TH e TUJ1; 99% da população expressava V-Gat e TUJ1; 99% da população expressava NMDAR e TUJ1; 88.3% da população expressava GAD 65/67 e NMDAR; 83.6% da população expressava GAD 65/67 e D1R; 88% da população expressava GAD 65/67 e D2R; 97.4% da população expressava ENK e D2R; e 58.7% da população expressava GFAP e TUJ1.

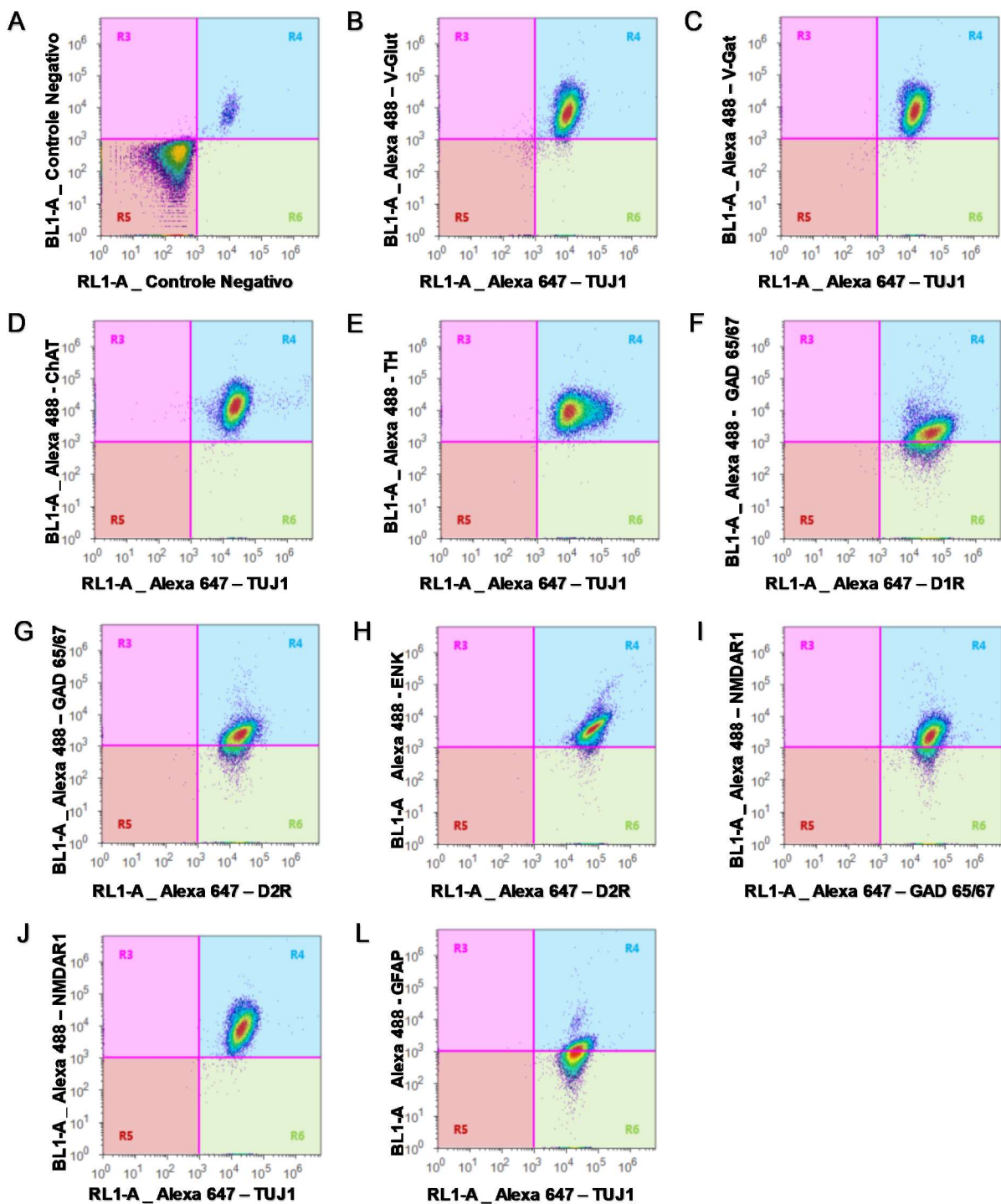


Figura 14. Análise de biomarcadores neurais por imunofluorescência e leitura em citômetro de fluxo. Os gráficos dot-plots se referem à cultura de neurônios HT-22 diferenciados e duplamente marcados com os diferentes anticorpos primários e secundários. Os neurônios HT-22 foram diferenciados com o suplemento N2 por 48h. As quantificações das regiões duplo-marcadas revelam uma cultura de células neurais com características semelhantes às culturas neuronais heterogêneas. Os dados representam apenas um experimento realizado em triplicata.

Desta forma, os dados indicam que os neurônios HT-22 diferenciados apresentam características dos neurônios glutamatérgicos, pois expressam, concomitantemente, V-Glut e TUJ1 (Menezes e Luskin, 1994; Mahr e Aberle, 2006; Wozny *et al.*, 2018); dopaminérgicos, pois expressam TH e TUJ1 (Menezes e Luskin, 1994; Hedreen, 1999; Aumann *et al.*, 2011; Mori *et al.*, 2006; Eid e Parent, 2015; Barkhuizen *et al.*, 2018; Salvatore *et al.*, 2019); colinérgicos, pois expressam ChAT e TUJ1 (Menezes e Luskin, 1994; Oda, 1999); e GABAérgicos, pois expressam V-Gat, TUJ1 e GAD 65/67 (Menezes e Luskin, 1994; Chaudhry *et al.*, 1998; Saito *et al.*, 2010; Tavazzani *et al.*, 2014). As reações anti-NMDAR-positivas indicam a responsividade dos neurônios HT-22 diferenciados aos estímulos glutamatérgicos; enquanto as reações anti-D1R- e anti-D2R-positivas indicam as responsabilidades aos estímulos dopaminérgicos.

As semelhanças entre os neurônios HT2-2 diferenciados e os MSNs GABAérgicos do *striatum* se fundamentam nas reações imunocitoquímicas positivas anti-TUJ1, anti-GAD 65/67, anti-ENK, anti-D1R, anti-D2R e anti-NMDAR (Shivers *et al.*, 1986; Okabe *et al.*, 1996; Saito *et al.*, 2010; Lanciego *et al.*, 2012; Shin *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2013; Shepherd, G. M. G., 2013; Shipp, 2017; Rangel-Barajas e Rebec, 2016; Ploktin e Goldberg, 2018; Amita, H. *et al.*, 2019). Entretanto, devido à ocorrência das concomitantes reações imunocitoquímicas positivas anti-GFAP e anti-TUJ1, inferimos que 58.7% das populações das culturas de células HT-22 diferenciadas sejam células progenitoras neurais (Donato *et al.*, 2009).

### **4.3. Ensaio farmacológico**

Conforme descrito, as hipóteses citopatológicas da HD objetivam explicar as causas das preponderantes neurodegenerações dos MSNs GABAérgicos D2-positivos (McColgan e Tabrizi, 2017). Uma primeira hipótese (H1) correlaciona o desfecho morte celular às estimulações dos receptores de NMDA – funções do glutamato e do agonista seletivo QA. Uma segunda hipótese (H2) correlaciona as mortes celulares à inibição da succinato desidrogenase (complexo mitocondrial II) – funções das mHtts e do inibidor irreversível 3-NP. Assim, por meio de uma terceira hipótese (H3), objetivamos explicar o aumento das intensidades dos fenômenos excitotóxicos correlacionados às mortes celulares a partir da validação da inferência de que a inibição da succinato desidrogenase com 3-NP potencializa os efeitos deletérios das estimulações dos receptores glutamatérgicos de NMDA com QA. Por último, avaliamos as funções neuroprotetoras da adenosina – agonista endógeno dos receptores purinérgicos P1 – frente aos

fenômenos excitotóxicos desencadeados por meio dos tratamentos com QA, na ausência e na presença do 3-NP. As análises se fundamentaram nos ensaios de determinação das variações transientes das  $[Ca^{2+}]_i$  e dos efeitos citotóxicos – percentuais (%) de sobrevivência celular e atividades extracelulares (U/L) de LDH – utilizando as culturas de neurônios HT-22 diferenciado.

Os primeiros relatos históricos sobre os efeitos excitotóxicos do glutamato foram correlacionados às mortes celulares necróticas (Velasco *et al.*, 2017; Krasil'nikova *et al.*, 2019). Contudo, os mesmos efeitos excitotóxicos do glutamato já foram correlacionados às mortes celulares apoptóticas (Lentile *et al.*, 2001; Fatokun *et al.*, 2008; Kritis *et al.*, 2015; Park *et al.*, 2019). Neste sentido, uma hipótese objetiva inferir a respeito de que tanto a apoptose como a necrose representam segmentos distintos de um estado contínuo de morte celular desencadeado por meio dos fenômenos excitotóxicos, sendo as concentrações menores de glutamato responsáveis por induzir as mortes celulares por apoptose, enquanto as concentrações maiores induzem morte celular por necrose (Pang *et al.*, 1997; Vis *et al.*, 2002). Lentile *et al.* (2001) reportaram que as exposições das culturas de neurônios corticais às baixas concentrações de glutamato em períodos curtos resultaram em apoptose, enquanto as concentrações maiores e os períodos longos resultaram em necrose, sendo a última um desfecho tardio comum às mortes celulares desencadeadas por excitotoxicidade. Esta hipótese do estado contínuo das mortes celulares se desdobrou em explicações fundamentadas nas funções do agonista dos receptores glutamatérgico ácido kaínico em relação aos desencadeamentos das mortes celulares necróticas e apoptóticas, conforme os estágios de maturação neuronal; sendo a apoptose correlacionada ao favorecimento da morte celular dos neurônios imaturos, e a necrose às mortes dos neurônios maduros (Portera-Cailliau *et al.*, 1997; Vis *et al.*, 2002). Além disso, tanto a apoptose como a necrose e os diferentes estágios das maturações neuronais apresentam correlações com os perfis de expressão das subunidades dos receptores de NMDA (NR1, NR2A e NR2B) (Zeron *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2007; Dong *et al.*, 2009). Neste sentido, a necrose correlaciona-se às expressões das subunidades NR1/NR2B (Liu *et al.*, 2007). Por outro lado, outra hipótese infere que as estimulações dos receptores de NMDA resultam em morte celular por necrose, sendo as mortes celulares apoptóticas explicadas por meio dos mecanismos NMDAR-independente (Pang *et al.*, 1997). Esta última hipótese se desdobra na pressuposição de que os efeitos excitotóxicos iniciais do glutamato resultam nas mortes celulares necróticas, enquanto as células sobreviventes aos efeitos danosos da fase inicial dos fenômenos excitotóxicos desenvolveriam as mortes celulares

por meio dos mecanismos apoptóticos (Allen *et al.*, 1999; Fatokun *et al.*, 2008). Neste sentido, Kritis *et al.* (2015) comentam sobre a hipótese de que o glutamato apresenta efeitos citotóxicos agudos indutores de necrose, enquanto os efeitos citotóxicos tardios induzem à apoptose. Da mesma forma, as mortes neuronais por apoptose ou necrose também já foram correlacionadas aos tratamentos com 3-NP, na ausência e na presença de glutamato. As altas concentrações e os períodos iniciais das exposições ao 3-NP foram correlacionadas às mortes celulares necróticas, enquanto as baixas concentrações e os períodos tardios das exposições se correlacionaram às mortes celulares apoptóticas (Pang *et al.*, 1997; Vis *et al.*, 2002). Contudo, Pang *et al.* (1997) relatam que os tratamentos de neurônios com 3-NP podem resultar tanto em necrose quanto em apoptose, conforme as concentrações extracelulares de glutamato.

Neste trabalho, as culturas de neurônios HT-22 diferenciados foram tratadas com concentrações crescentes de QA, incubadas por 24h e submetidas às análises de citotoxicidade (dados não demonstrados). A concentração de QA 8 mM foi selecionada, pois se aproximou do valor de  $EC_{50}$  necessário às diminuições de 50% das sobrevidas celulares quando quantificadas por meio do ensaio de redução do reagente AlamarBlue®. Este valor de  $EC_{50}$  se aproximou das concentrações de glutamato utilizadas por outros autores que objetivaram alcançar a mesma faixa de % de sobrevida celular em culturas de neurônios HT-22 avaliadas por meio de métodos analíticos compatíveis (Jin *et al.*, 2014; Kritis *et al.*, 2015; Park *et al.*, 2019). Em paralelo, as culturas de neurônios HT-22 diferenciados foram tratadas com concentrações crescentes do inibidor 3-NP, incubadas por 24h e submetidas às análises de citotoxicidade (dados não demonstrados). A concentração de 3-NP 5 mM foi selecionada, pois resultou em diminuição das % de sobrevida celular (dados não demonstrados). Por último, as culturas de neurônios HT-22 diferenciados foram pré-tratadas com 3-NP 5mM e tratadas com QA 8mM por 24h (Figura 15). Os neurônios HT-22 diferenciados tratados apenas com QA 8mM foram considerados o 'grupo controle'. O pré-tratamento com o inibidor 3-NP 5mM (pré-tratamento) foi realizado uma hora (1h) antes do tratamento com QA 8mM.

Os resultados apresentados na Figura 15 ilustram a propriedade do 3-NP 5mM de potencializar os efeitos excitotóxicos do QA 8mM quando analisamos as % de sobrevida celular das culturas de neurônios HT-22 diferenciados após 24h de incubação. As culturas dos neurônios HT-22 diferenciados pré-tratadas com 3-NP 5 mM apresentaram uma maior sensibilidade aos



efeitos citotóxicos dos tratamentos com QA 8mM por 24h, haja vista a diminuição da % de sobrevivida celular ( $p < 0.05$ ). Este resultado indica que a inibição do complexo mitocondrial II potencializa os efeitos citotóxicos das estimulações dos receptores de NMDA.

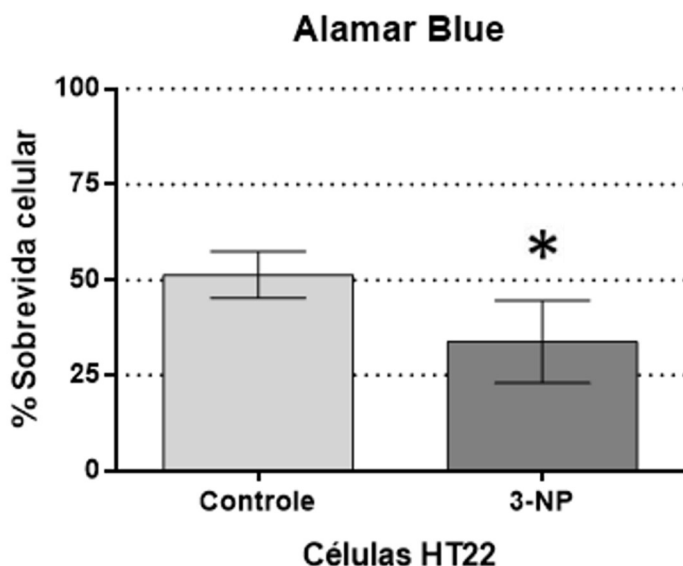


Figura 15. Avaliação da propriedade do 3-NP de potencializar os efeitos excitotóxicos do QA 8mM em neurônios HT-22 diferenciados. As análises das % sobrevivida celular foram realizadas por meio do método de determinação das capacidades mitocondriais de manterem as funções relativas às reações de óxido-redução indicativas das atividades de desidrogenase (AlamarBlue®). A concentração de QA 8mM (condição controle) se refere à  $EC_{50}$  calculada após 24h. O 3-NP 5mM não resultou em efeitos citotóxicos observáveis após 24h (dados não demonstrados). Para avaliar o sinergismo farmacológico, os neurônios HT-22 diferenciados foram pré-tratados com 3-NP 5mM uma hora (1h) antes da adição do QA 8mM. Os resultados indicam que os neurônios HT-22 diferenciados pré-tratados com 3-NP 5mM apresentam uma maior sensibilidade aos estímulos excitotóxicos do QA 8mM mantidos por 24h ( $p < 0.05$ ). Os valores apresentados representam as médias  $\pm$  S.E.M. de pelos menos três experimentos independentes realizados em duplicata. \* indica um valor de  $P < 0.05$  entre as barras ou grupos referenciados no experimento.

A propriedade neuroprotetora dos agonistas dos receptores purinérgicos P1 foram avaliadas por meio do pré-tratamento das culturas de neurônios HT-22 diferenciados com adenosina a 250 $\mu$ M (Figuras 16 e 17). A concentração de adenosina a 250 $\mu$ M foi selecionada, pois não houve o comprometimento da viabilidade das culturas de neurônios HT-22 diferenciados (dados não exibidos). A adenosina 250 $\mu$ M foi adicionada trinta minutos (30min) antes dos tratamentos dos neurônios pós-mitóticos HT22 com QA 8mM por 24h. Apesar das concentrações endógenas de adenosina se aproximem do valor de 100nM (Fredholm, 1997); os agonistas

seletivos dos receptores  $A_1$  serem utilizados em concentrações entre 100nM e 100 $\mu$ M (Rebola *et al.*, 2005; Cao *et al.*, 2019); os agonistas seletivos dos receptores  $A_{2A}$  serem utilizados em concentrações entre 20nM e 100nM (Jeon *et al.*, 2011; Rebola *et al.*, 2005; Franco *et al.*, 2020); os antagonistas seletivos dos receptores  $A_1$  serem utilizados em concentrações entre 100nM e 10 $\mu$ M (Boeck *et al.*, 2005; Rebola *et al.*, 2005; Ordonez *et al.*, 2010; Cao *et al.*, 2019); os antagonistas seletivos dos receptores  $A_{2A}$  serem utilizados em concentrações entre 50nM e 1 $\mu$ M (Dall'Igna *et al.*, 2003; Boeck *et al.*, 2005; Rebola *et al.*, 2005; Jeon *et al.*, 2011; Aires *et al.*, 2019; Franco *et al.*, 2020); a cafeína – antagonista dos receptores P1 – ser utilizada em concentrações entre 1 $\mu$ M e 100 $\mu$ M (Dall'Igna *et al.*, 2003; Cao *et al.*, 2019); a adenosina é utilizada em ensaios de estimulação dos receptores purinérgicos P1 (*in vitro*) em concentrações entre 1 $\mu$ M e 300 $\mu$ M, sem causar morte celular (Ordonez *et al.*, 2010; Cao *et al.*, 2019).

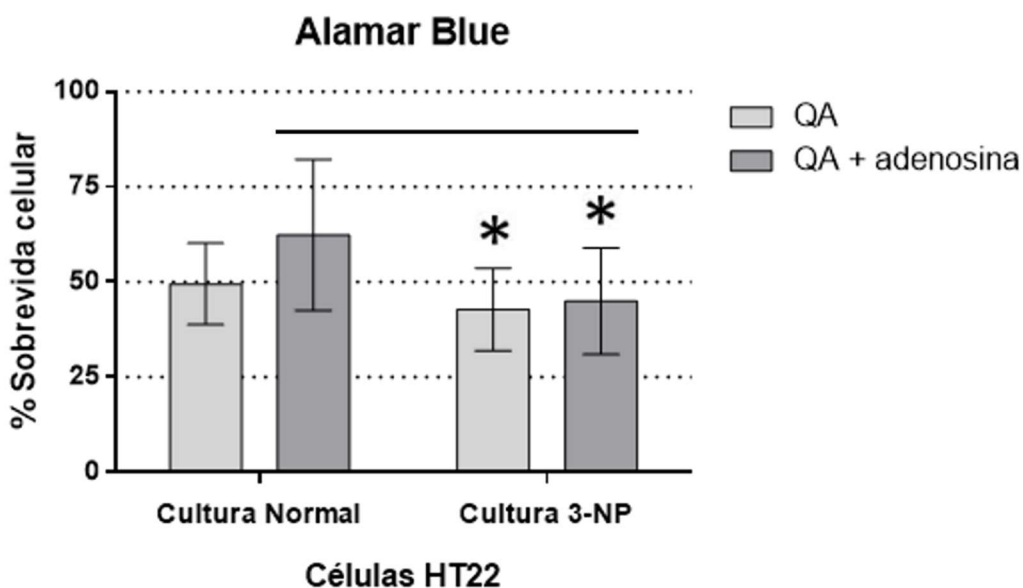


Figura 16. Avaliação do efeito neuroprotetor da adenosina 250 $\mu$ M em neurônios HT-22 diferenciados (controle e 3-NP) tratados com QA 8mM por 24h. As análises das % sobrevida celular foram realizadas por meio do método de determinação das capacidades mitocondriais de manterem as funções de óxido-redução relativas às atividades de desidrogenase (AlamarBlue®) - ensaios de redução do reagente AlamarBlue®. Os neurônios HT-22 diferenciados foram condicionados ou não (controle) com 3-NP uma hora (1h) antes do tratamento com QA 8mM por 24h. Os neurônios HT-22 diferenciados foram pré-tratados ou não (subcontroles) com adenosina 250 $\mu$ M 30min antes do tratamento com QA 8mM por 24h. Os resultados demonstraram que o 3-NP aumentou a sensibilidade dos neurônios

HT-22 diferenciados aos estímulos excitotóxicos desenvolvidos por meio dos tratamentos com QA 8mM por 24h; entretanto, por meio da *two-way* ANOVA, não foi possível considerar estatisticamente significantes as diferenças entre os valores adquiridos ( $p>0.05$ ). Embora os pré-tratamentos dos neurônios HT-22 com adenosina 250 $\mu$ M não apresentaram significância estatística ( $p>0.05$ ), as tendências dos efeitos neuroprotetores podem ser observadas. Diferenças estatisticamente significante ( $p<0.05$ ) foram observadas entre os valores de % sobrevivência de células do grupo de células normais tratadas com adenosina e com QA em relação a ambos os grupos de células pré-tratadas com 3-NP. Os valores apresentados representam as médias  $\pm$  S.E.M. de pelo menos três experimentos independentes realizados em duplicata. \* indica um valor de  $P<0.05$  entre as barras ou grupos referenciados no experimento.

A adenosina 250 $\mu$ M não resultou em efeitos neuroprotetores significativos quando analisamos a % de sobrevivência celular (Figura 16) e as atividades extracelulares de LDH (U/L) (Figura 17) nas culturas dos neurônios HT-22 diferenciados (normais ou 3-NP 5mM) ( $p>0.5$ ). Entretanto, foi possível observar pontos indicativos das linhas de tendência dos efeitos neuroprotetores da adenosina 250 $\mu$ M. Por outro lado, não obtivemos resultados consistentes quando analisamos as atividades neuroprotetoras da adenosina 250 $\mu$ M frente aos efeitos excitotóxicos dos tratamentos com QA 8mM na presença dos antagonistas dos receptores purinérgicos A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> e A<sub>3</sub> (dados não exibidos).

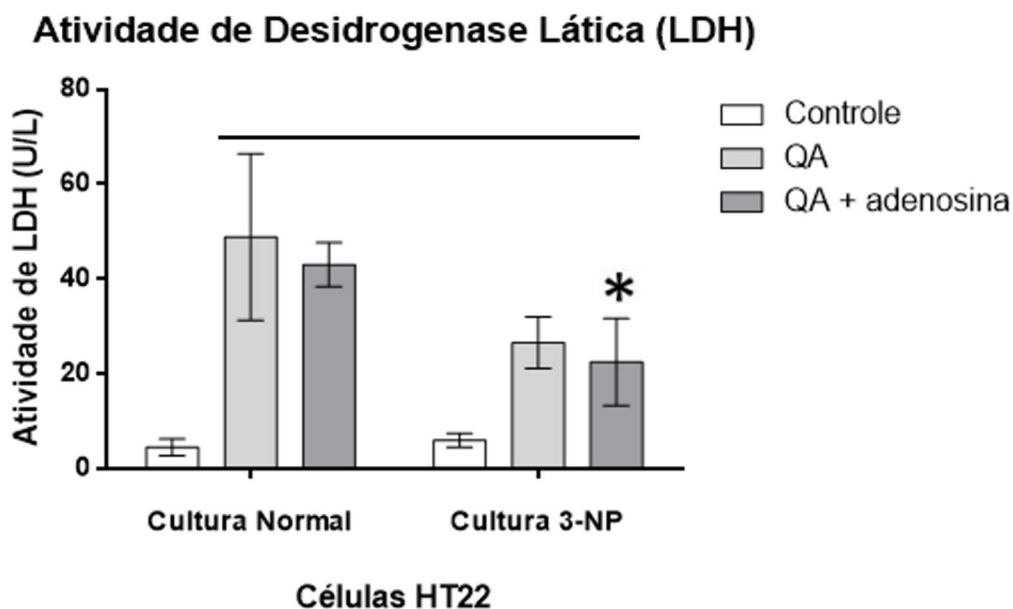


Figura 17. Efeito do 3-NP e da adenosina 250 $\mu$ M na liberação de LDH induzida por meio do tratamento dos neurônios HT-22 diferenciados com o agonista QA 8mM. As análises das atividades extracelulares de LDH (U/L) foram realizadas após o tratamento dos neurônios HT-22 diferenciados com QA 8mM por 24h. O 3-NP 5mM foi adicionado

uma hora antes do tratamento dos neurônios pós-mitóticos HT-22 com QA 8mM. A adenosina 250µM foi adicionada trinta minutos (30) antes do tratamento com QA 8mM. Os neurônios HT-22 diferenciados e condicionados com 3-NP 5mM apresentaram uma tendência de diminuição da atividade extracelular de LDH após o tratamento com QA 8mM por 24h, entretanto, quando comparado ao grupo de neurônios HT-22 diferenciados e tratados apenas com QA 8mM, a diferença entre os valores adquiridos não foi estatisticamente significativa ( $p>0.05$ ). Os neurônios HT-22 diferenciados e pré-tratamentos com adenosina 250µM apresentaram valores menores de atividade extracelular de LDH após o tratamento com QA 8mM por 24h, entretanto os resultados não foram estatisticamente significantes em ambas as condições de pré-exposição (controle e 3-NP) ( $p>0.05$ ). Os valores de atividade extracelular de LDH detectados nas amostras de neurônios HT-22 diferenciados e tratados apenas com QA 8mM apresentaram diferenças estatisticamente significantes quando comparados aos valores das amostras de neurônios HT-22 diferenciados pré-tratados com 3-NP 5mM e adenosina 250µM seguido pelo tratamento com QA 8mM ( $p<0.05$ ). Os valores de atividade extracelular de LDH apresentados representam as médias  $\pm$  S.E.M. de pelos menos três experimentos independentes realizados em duplicata. \* indica um valor de  $P<0.05$  entre as barras ou grupos referenciados no experimento.

Os ensaios de determinação das atividades extracelulares de LDH são considerados indicativos das mortes celulares necróticas, pois quantificam, indiretamente, as perdas de integridade das membranas plasmáticas (Alexander *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2018). Desta forma, embora as diferenças entre os valores não sejam consideradas diferentes em termos de significância estatística ( $p>0.05$ ), os resultados indicam que as culturas de neurônios HT-22 diferenciados pré-tratadas com 3-NP 5mM apresentam quantidades menores de células necróticas após os tratamentos com QA 8mM por 24h (Figura 17). Por outro lado, as culturas de neurônios HT-22 diferenciados submetidas aos pré-tratamentos com 3-NP 5mM e adenosina 250µM, seguidos pelos tratamentos com QA 8mM por 24h, apresentaram valores menores de atividade extracelular de LDH (U/L) quando comparadas às culturas de neurônios HT-22 diferenciados tratadas apenas com QA 8mM por 24h ( $p<0.05$ ), o que indica uma diminuição na proporção de células necróticas. Este último resultado nos indica as capacidades dos pré-tratamentos com 3-NP 5mM e adenosina 250µM reduzirem os potenciais indutores de morte celular por necrose relativos aos tratamentos com QA 8mM. Neste sentido, as tendências divergentes dos efeitos citotóxicos observados por meio dos ensaios de determinação das atividades extracelulares de LDH (U/L) (Figura 17) e dos ensaios de quantificação das % de sobrevivência celular (Figuras 15 e 16) – metabolização do reagente AlamarBlue® – podem ser explicadas por meio da hipótese de que os tratamentos com QA 8mM por 24h induzem os aumentos das proporções de células apoptóticas e as diminuições das quantidades de células necróticas nas culturas de neurônios HT-22 diferenciados pré-tratadas com 3-NP 5mM; e o

aumento de necrose, invés de apoptose, nas culturas de neurônios HT-22 diferenciados tratados apenas com QA 8mM por 24h. Esta última hipótese se fundamenta nas observações de que o tratamento com o antagonista dos receptores de NMDA MK-801 (10mM) inibiu as mortes celulares agudas por necrose desenvolvidas nos neurônios hipocâmpais pré-tratados com 3-NP; porém, não inibiu as mortes celulares apoptóticas tardias (Pang *et al.*, 1997). Da mesma forma, Allen *et al.* (1999) demonstram que o pré-tratamento das culturas de neurônios e células da glia com 3-NP promovem o aumento das quantidades de células apoptóticas notados após o desenvolvimento dos efeitos citotóxicos decorrentes de trauma mecânico, sendo o desfecho analisado inibido por meio do tratamento com MK-801. Neste sentido, as mortes celulares apoptóticas ou necróticas resultantes dos tratamentos das culturas neuronais com glutamato se correlacionam a diferentes contextos em função das atividades mitocôndrias (Allen *et al.*, 1999; Hardingham e Bading, 2003).

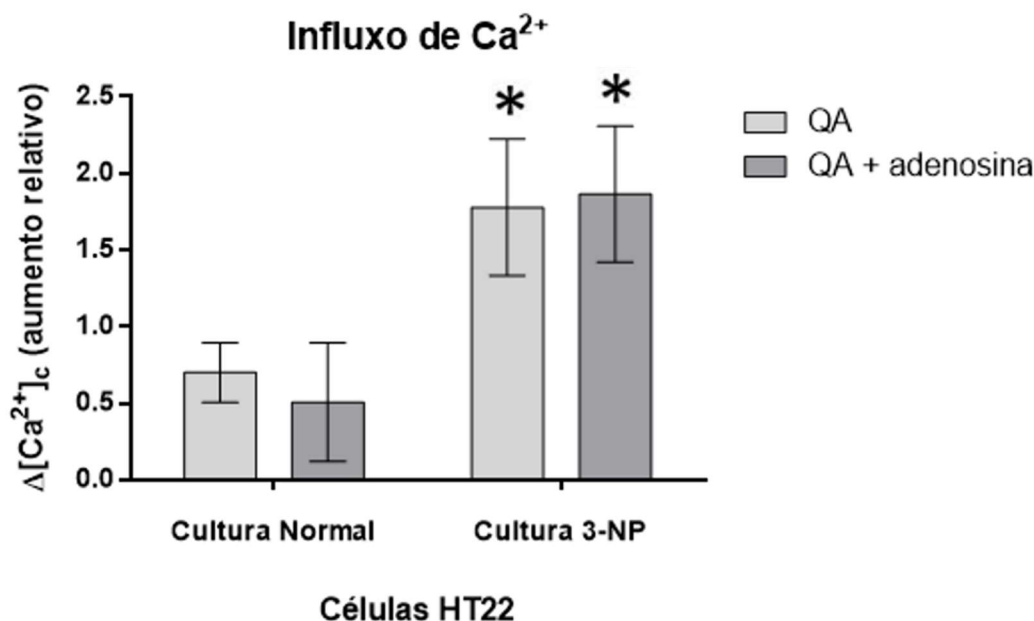


Figura 18. Avaliação dos efeitos do 3-NP 5mM e da adenosina 250 $\mu$ M nas médias das amplitudes das variações transientes da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  apresentadas pelos neurônios HT-22 diferenciados e tratados com QA 8mM. As determinações das variações transientes da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  foram realizadas por meio do *kit* FLIPR Calcium 4 Assay (Molecular Devices®). O 3-NP 5mM foi adicionado uma hora (1h) antes do tratamento com QA 8mM. A adenosina 250 $\mu$ M foi adicionada trinta minutos (30 min) antes do tratamento com QA 8mM. As variações transientes das  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  foram analisadas durante 6 minutos após a adição do QA 8mM. O pré-tratamento dos neurônios HT-22 com 3-NP resultou em um aumento dos valores de amplitude máxima relativos às variações transientes das  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  que são induzidas pelo

tratamento com QA 8mM ( $p < 0.05$ ). O pré-tratamento dos neurônios HT-22 (controle e 3-NP) com adenosina 250 $\mu$ M não resultou em efeitos estatisticamente significantes ( $p > 0.05$ ). Os valores apresentados representam as médias  $\pm$  S.E.M. de pelos menos três experimentos independentes realizados em duplicata. \* indica um valor de  $P < 0.05$  entre as barras ou grupos referenciados no experimento.

As Figuras 18 e 19 indicam a propriedade do 3-NP 5 mM de potencializar os efeitos excitotóxicos do QA 8 mM em culturas de neurônios HT-22 diferenciados. Este efeito foi observado por meio das avaliações das amplitudes das variações transientes das  $[Ca^{2+}]_i$  determinadas no intervalo de 6 minutos. As culturas dos neurônios HT-22 diferenciados pré-tratados com 3-NP 5mM apresentaram valores superiores de amplitude máxima das variações transientes das  $[Ca^{2+}]_i$  após a adição do QA 8mM do que as culturas de neurônios HT-22 diferenciados expostas apenas ao QA 8mM (cultura normal) ( $p < 0.05$ ). Por outro lado, os pré-tratamentos com adenosina 250 $\mu$ M não resultaram em alterações estatisticamente significativas nas amplitudes máximas das variações transientes das  $[Ca^{2+}]_i$  ( $p > 0.05$ ) (Figura 18).

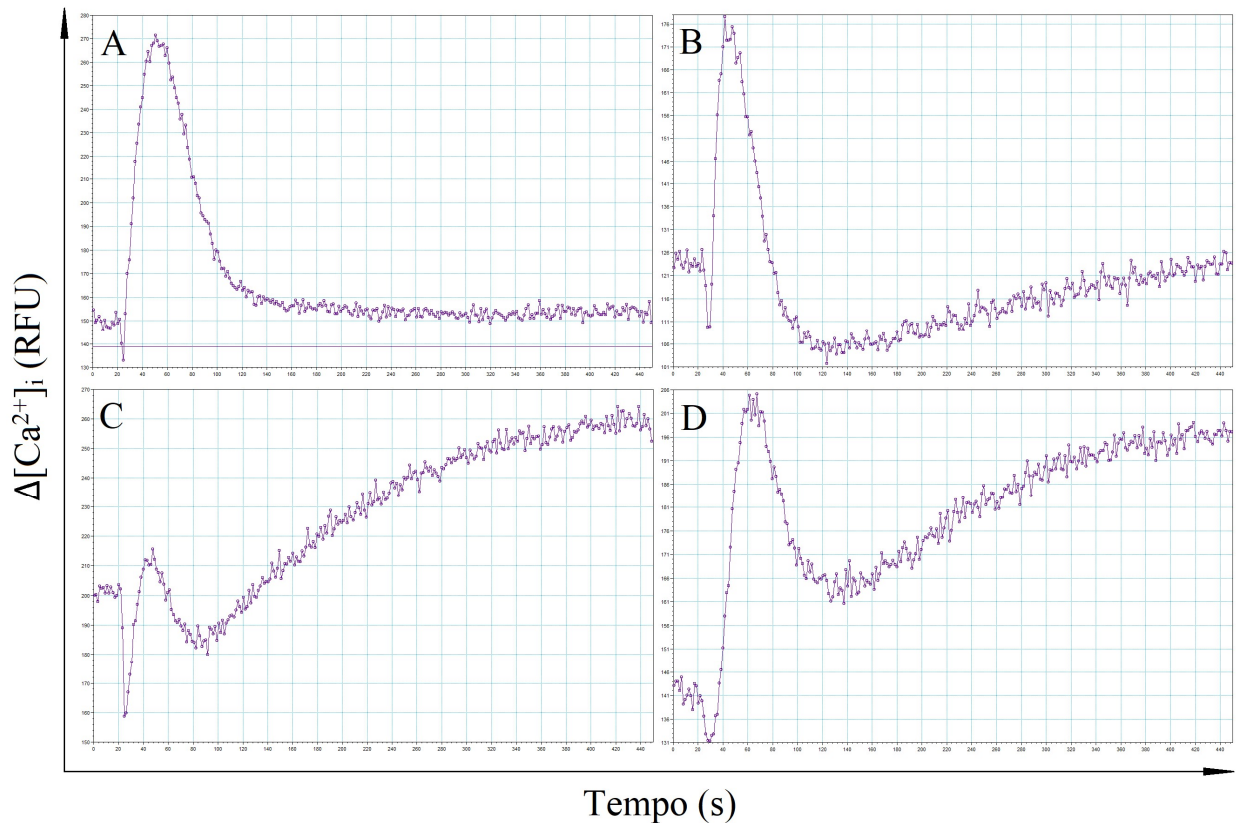


Figura 19. Gráficos representativos das determinações das variações transientes das  $[Ca^{2+}]_i$  em culturas de neurônios

HT-22 diferenciados. As determinações das variações transientes da  $[Ca^{2+}]_i$  foram realizadas por meio do *kit* FLIPR Calcium 4 Assay (Molecular Devices®). As leituras de intensidade de fluorescência foram realizadas por microfluorimetria com auxílio do instrumento *FlexStation 3 Multi-Mode Microplate Reader*. As análises cinéticas tiveram a duração de 7 minutos. Um período inicial de 20 segundos representa a linha de base das variações transientes das  $[Ca^{2+}]_i$  – período anterior à adição do QA 8mM. A – Tratamento com QA 8mM. B – Pré-tratamento com adenosina 250 $\mu$ M e tratamento com QA 8mM. C – Pré-tratamento com 3-NP 5mM e tratamento com QA 8mM. D – Pré-tratamento com 3-NP 5mM, pré-tratamento com adenosina 250 $\mu$ M e tratamento com QA 8mM.

Os fenômenos excitotóxicos se caracterizam por meio dos perfis bifásicos de aumento das variações transientes das concentrações de cálcio livre intracelular (Tymianski *et al.*, 1993; Abramov *et al.*, 2008). A primeira fase se caracteriza por meio dos rápidos aumentos das  $[Ca^{2+}]_i$ , os quais decaem em poucos minutos, sendo correlacionados aos influxos de  $Ca^{2+}$  extracelular através dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos. A segunda fase se caracteriza por meio dos sustentados e irreversíveis aumentos das  $[Ca^{2+}]_i$ , os quais se correlacionam às mortes celulares apoptóticas. Desta forma, a Figura 19 representa parte dos distintos perfis dos fenômenos excitotóxicos glutamato-dependentes correlacionados aos diferentes mecanismos das mortes celulares dos neurônios HT-22 diferenciado (cultura normal e cultura 3-NP) e submetidos aos tratamentos com QA 8mM por 24h. Estes dados experimentais fundamentam a hipótese de que o 3-NP 5mM desloca as mortes celulares por necrose desencadeadas por meio do tratamento com QA 8mM no sentido dos mecanismos apoptóticos (via intrínseca); pois as culturas dos neurônios HT-22 diferenciados pré-tratadas com 3-NP 5mM apresentam um aumento das amplitudes das variações transientes das  $[Ca^{2+}]_i$  referentes à segunda fase dos fenômenos excitotóxicos – sendo estas prolongadas/sustentadas, aparentemente irreversíveis; e, possivelmente, correlacionadas à apoptose.

Em relação aos pré-tratamentos com adenosina 250 $\mu$ M, embora não tenhamos observado alterações estatisticamente significantes nas amplitudes das variações transientes das  $[Ca^{2+}]_i$  ( $p > 0.05$ ) (Figura 18); na Figura 19, notamos que as culturas dos neurônios HT-22 diferenciados (cultura normal – ausência de 3-NP) pré-tratadas com adenosina 250 $\mu$ M apresentaram uma diminuição da altura do pico das amplitudes das variações transientes das  $[Ca^{2+}]_i$  referente à primeira fase dos fenômenos excitotóxicos, assim como um aumento das amplitudes das variações transientes das  $[Ca^{2+}]_i$  que se referem à segunda fase. Estes dados contribuem à hipótese de que a adenosina 250 $\mu$ M, assim como o 3-NP 5mM, promove a

diminuição do número de células necróticas nas culturas dos neurônios HT-22 diferenciados tratados com QA 8mM por 24h.

As mortes neuronais devido às estimulações glutamatérgicas excitotóxicas podem ser explicadas por meio do excesso de glutamato extracelular, o qual resulta em influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, acumulação e sobrecarga de cálcio nas mitocôndrias, desbalanço das  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  e despolarização das membranas mitocondriais (Angelova *et al.*, 2019). Na HD, os efeitos excitotóxicos são potencializados a partir das expressões das proteínas mHtt, o que resulta em diminuição da captação mitocondrial de  $\text{Ca}^{2+}$ , aumento da suscetibilidade das mitocôndrias às despolarizações induzidas por meio do aumento das  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  e perda do  $\Delta\psi_m$  (Benchoua *et al.*, 2006; Liot *et al.*, 2009). Da mesma forma, os efeitos excitotóxicos são potencializados por meio das inibições dos complexos mitocondriais II com o agonista irreversível 3-NP, resultando em aumento das sensibilidades mitocondriais à sobrecarga de cálcio livre, despolarização das membranas mitocondriais, formação do mPTP e perda do  $\Delta\psi_m$  (Ruan *et al.*, 2004; Mao *et al.*, 2006). Além disso, o tratamento das culturas de neurônios com 3-NP resulta em diminuição imediata das quantidades de ATP (Liot *et al.*, 2009). Deste modo, a inibição do complexo mitocondrial II seguida da estimulação dos receptores NMDA se correlaciona às elevações das  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , pois as estimulações dos receptores NMDA influenciam as funções mitocondriais, as quais são consideradas o maior reservatório de sequestro dos íons  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmáticos (Brustovetsky *et al.*, 2003; Zeron *et al.*, 2004). Os aumentos das  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , por sua vez, foram correlacionados de modo diretamente proporcional às mortes celulares por apoptose (via intrínseca), pois as estimulações dos NMDARs e as inibições do complexo mitocondrial II favorecem a alteração das  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  homeostáticas e a despolarização das membranas mitocondriais, resultando em perda do  $\Delta\psi_m$ , formação do mPTP, liberação do citocromo c e ativação de caspase-3 (Brustovetsky *et al.*, 2003; Zeron *et al.*, 2004; Milakovic *et al.*, 2006; Ferreira *et al.*, 2010; Quintanilla *et al.* 2013). As potencializações dos efeitos excitotóxicos das estimulações dos receptores glutamatérgicos de NMDA por meio das inibições das succinato desidrogenases (complexo mitocondrial II) se encontram descritas na literatura científica, sendo o efeito sinérgico correlacionado à via intrínseca (ou mitocondrial) da apoptose (Calabresi *et al.*, 2001; Brustovetsky *et al.*, 2003; Zeron *et al.*, 2004; Milakovic *et al.*, 2006). As proteínas mHtt se correlacionam à cascata de eventos da via intrínseca da apoptose, pois resultam em perda dos  $\Delta\psi_m$ , abertura dos mPTP, liberação dos citocromos c e ativação das caspases-3 (Zeron *et al.*, 2004; Ciammola *et al.*, 2006). Além disso, as expressões das



mHtts, as potencializações dos efeitos excitotóxicos dos NMDARs e as mortes celulares desenvolvidas por meio da via intrínseca da apoptose se correlacionam aos aumentos das amplitudes das variações transientes das  $[Ca^{2+}]_i$  (Zeron *et al.*, 2001; Zeron *et al.*, 2002; Zeron *et al.*, 2004).

Portanto, conforme os mecanismos descritos, podemos inferir que os resultados apresentados nas Figuras 15 e 16 ressoam com aqueles apresentados nas Figura 18 e 19, pois a inibição da succinato desidrogenase por meio dos pré-tratamentos com 3-NP 5mM potencializaram os efeitos excitotóxicos dos tratamentos com QA 8 mM, resultando em diminuição das % de sobrevivência celular (Figura 15 e 16) e aumento das amplitudes das variações transientes das  $[Ca^{2+}]_c$  (Figuras 18 e 19), sendo estes últimos associados à segunda fase dos fenômenos excitotóxicos – correlacionada à apoptose. Por outro lado, buscamos explicar as correlações entre as Figuras 17, 18 e 19 por meio da hipótese de que a inibição da succinato desidrogenase resulta em alteração dos mecanismos das mortes celulares por necrose desencadeadas por meio do tratamento com QA 8mM por 24h para os mecanismos de morte celular por apoptose (via intrínseca).

As atividades neuroprotetoras da adenosina já foram correlacionadas, principalmente, às funções dos receptores purinérgicos  $A_1$  e  $A_{2A}$ . Neste sentido, sabemos que os receptores  $A_1$  apresentam efeitos neuromodulatórios sobre as transmissões sinápticas (Cunha, 2005). No contexto da excitotoxicidade, agonistas dos receptores  $A_1$  promovem neuroproteção por meio da diminuição da liberação pré-sináptica de glutamato e da hiperpolarização das membranas dos neurônios pós-sinápticos (Fredholm, 1997; Cunha, 2005; Ribeiro *et al.*, 2016; Tescarollo *et al.*, 2020). Em contrapartida, os antagonistas dos receptores  $A_1$  apresentam as propriedades de potencializarem os efeitos neurotóxicos dos estímulos excitatórios neuronais (Cunha, 2005). Por sua vez, os agonistas dos receptores  $A_{2A}$  foram correlacionados à liberação de glutamato e, conseqüentemente, à estimulação dos NMDARs; enquanto os antagonistas dos receptores  $A_{2A}$  apresentaram efeitos neuroprotetores frente aos fenômenos excitotóxicos (Fredholm, 1997; Pedata *et al.*, 2014; Ribeiro *et al.*, 2016; Martins *et al.*, 2020; Moreira-de-Sá *et al.*, 2021). Além de induzir a liberação pré-sináptica de glutamato, a ativação dos receptores  $A_{2A}$  pré-sinápticos facilita o desenvolvimento das correntes pós-sinápticas produzidas por meio dos receptores de NMDA (sinápticos) (Mouro *et al.*, 2018). Estes efeitos são explicados por meio da inibição das correntes

inibitórias pós-sinápticas produzidas por meio da ativação dos receptores GABA<sub>A</sub> (Rombo *et al.*, 2016). Neste sentido, a ativação dos receptores A<sub>2A</sub> potencializam a excitotoxicidade (Sebastião, 2022). Contudo, as estimulações dos receptores A<sub>2A</sub> também já foram correlacionadas à propriedade neuroprotetora da adenosina, as quais se devem às funções inibitórias sobre as ativações dos NMDARs e às influências exercidas sobre os mecanismos apoptóticos (Cunha, 2005). Neste sentido, a hipótese mais aceita se refere às funções neuroprotetoras dos receptores A<sub>2A</sub>, os quais promovem efeitos neuroregeneradores intermediados pelo aumento da produção do BDNF (Jeon *et al.*, 2011; Ribeiro *et al.*, 2015; Sandau *et al.*, 2016; Mouro *et al.*, 2018; Miranda-Lourenço *et al.*, 2020). Assim, as ativações dos receptores A<sub>2A</sub> se correlacionam às funções do sistema de sinalização purinérgico nos mecanismos da plasticidade neural (Moreira-de-Sá *et al.*, 2021). Em síntese, a propriedade neuroprotetora da adenosina pode ser explicada por meio dos mecanismos de inibição da liberação de neurotransmissores a partir da inibição pré-sináptica do Ca<sup>2+</sup> e de inibição das correntes pós-sinápticas geradas através dos receptores de NMDA (Ribeiro e Sebastião, 2010). Assim, podemos notar a importância dos avanços nas pesquisas sobre as funções neuroprotetoras/neurotóxicas dos receptores purinérgicos A<sub>1</sub> e A<sub>2A</sub> no contexto das doenças neurodegenerativas.

## 5. CONCLUSÕES

A neurodiferenciação das mESCs E14-TG2a por meio do método *five stage* produziu neurônios pós-mitóticos com as características necessárias à classificação dos MSNs GABAérgicos do *striatum* (maduros) – corpos celulares em formato oval; capacidade de despolarizar as membranas plasmáticas; respostas concentrações-dependentes com influxos de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular às estimulações glutamatérgicas; e expressões dos marcadores de Htt,  $\beta$ -III-tubulina, GABA, NMDAR, GAD67 e DARP-32.

Os MSNs GABAérgicos do *striatum* constituíam uma fração das culturas neuronais heterogêneas adquiridas por meio do método *five stage*, as quais expressavam marcadores característicos das conexões nigroestriatais, corticoestriatais, *striatonigral* (via direta) e *striatopallidal* (via indireta) – expressões dos marcadores de VGLUT, TH, GAD2,  $A_{2A}R$ , D2R, e substância P.

As culturas dos neurônios pós-mitóticos adquiridas por meio do método *five stage* expressavam marcadores característicos dos receptores glutamatérgicos de NMDA e de AMPA; dopaminérgicos D1 e D2; e purinérgicos P1 ( $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_3$ ).

A neurodiferenciação da linhagem de células precursoras neurais do hipocampo de camundongos HT-22 por meio do reagente N-2 produziu culturas neurais heterogêneas, não totalmente maduras e com características semelhantes aos neurônios glutamatérgicos, dopaminérgicos, colinérgicos e GABAérgicos.

As culturas dos neurônios HT-22 diferenciados expressavam marcadores dos receptores glutamatérgicos de NMDA e dopaminérgicos D1/D2.

O tratamento dos neurônios HT-22 diferenciados com QA 8mM reproduziu os fenômenos excitotóxicos glutamato-dependentes, produzindo o aumento das amplitudes das variações transientes das  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , a diminuição das % sobrevidas celulares e o aumento das atividades extracelulares de LDH (U/L) – este último efeito concorda com os relatos históricos de que o glutamato apresenta efeitos pró-necróticos.

O pré-tratamento dos neurônios HT-22 diferenciados com 3-NP 5mM foi capaz de potencializar os efeitos excitotóxicos dos tratamentos com QA 8mM, pois diminuiu as % de

sobrevida celular após 24h; e aumentou as amplitudes das variações transientes das  $[Ca^{2+}]_i$  ao longo dos primeiros 6 min (cinética).

A segunda fase dos fenômenos excitotóxicos dependentes do QA 8mM – correlacionada à apoptose – preponderou nas análises das amplitudes das variações transientes das  $[Ca^{2+}]_i$  nas culturas dos neurônios HT-22 diferenciados pré-tratados com 3-NP 5mM – diferentemente dos perfis observados nas culturas dos neurônios HT-22 diferenciados tratados apenas com QA 8mM cujas maiores amplitudes das variações transientes das  $[Ca^{2+}]_i$  se referem à primeira fase dos fenômenos excitotóxicos.

O pré-tratamento dos neurônios HT-22 diferenciados com 3-NP 5mM alterou o perfil das mortes celulares desencadeadas por meio dos tratamentos com QA 8mM por 24h, pois resultou em diminuição das atividades extracelulares de LDH (U/L) – um fator indicativo da menor proporção de células necróticas.

Os neurônios HT-22 diferenciados pré-tratados com adenosina 250 $\mu$ M, na ausência e na presença do 3-NP 5mM, não apresentaram resultados diferentes – em termos de significância estatística ( $p < 0.05$ ) – após os tratamentos com QA 8mM por 24h – % de sobrevida celular e atividade extracelular de LDH (U/L) – ou por 6 min – amplitude das variações transientes das  $[Ca^{2+}]_i$  –; entretanto, os valores adquiridos por meio dos ensaios de citotoxicidade e de determinação das variações transientes das  $[Ca^{2+}]_i$  indicaram as linhas de tendência dos efeitos neuroprotetores da adenosina frente aos fenômenos excitotóxicos glutamato-dependentes.

A capacidade do 3-NP 5mM de potencializar os efeitos excitotóxicos do QA 8mM foi explicada por meio dos mecanismos de diminuição da captação mitocondrial de cálcio livre citoplasmático, os quais resultam nos aumentos das amplitudes das variações transientes das  $[Ca^{2+}]_i$ , principalmente na segunda fase dos fenômenos excitotóxicos glutamato-dependentes. A segunda fase dos fenômenos excitotóxicos glutamato-dependentes se correlaciona às mortes celulares por apoptose (via intrínseca). Desta forma, pressupomos que as ativações das mortes celulares por apoptose a partir das inibições das succinato desidrogenases seguidas pelas estimulações dos receptores de NMDA resultam nas diminuições das proporções de células necróticas observadas nas culturas dos neurônios HT-22 diferenciados pré-tratados com 3-NP 5mM e tratados com QA 8mM por 24h; sendo as proporções de células necróticas – as quais

correlacionamos às estimulações dos receptores de NMDA com QA 8mM – observadas nas culturas dos neurônios HT-22 diferenciados tratados apenas com QA 8mM por 24h – ou seja, na ausência do inibidor da succinato desidrogenase (complexo mitocondrial II) 3-NP 5mM.

Os efeitos neuroprotetores da adenosina, embora não estatisticamente significativos, foram explicados por meio das funções dos receptores purinérgicos  $A_1$  de hiperpolarizarem as membranas neuronais pós-sinápticas, as quais resultam nas diminuições dos influxos de  $Ca^{2+}$  extracelular através dos canais iônicos dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos; e por meio das funções dos receptores  $A_{2A}$ , os quais promovem o aumento das produções do BDNF, auxiliando os processos de neuroregeneração.

## REFERÊNCIAS

ABBRACCHIO, M. P. *et al.* Purinergic signalling in the nervous system: an overview. **Trends in Neurosciences**. 2008.

ABRAMOV, A. Y. *et al.* Mechanisms underlying the loss of mitochondrial membrane potential in glutamate excitotoxicity. **Biochimica et Biophysica Acta**. 2008.

AHMED, S. *et al.* Potential role of TrkB agonist in neuronal survival by promoting CREB/BDNF and PI3K/Akt signaling in vitro and in vivo model of 3-nitropropionic acid (3NP) induced neuronal death. **Springer**. 2020.

AIRES, I. D. *et al.* Blockade of microglial adenosine A<sub>2A</sub> receptor suppresses elevated pressure-induced inflammation, oxidative stress, and cell death in retinal cells. **Glia**. 2019.

ALEXANDER, G. *et al.* Mechanisms of Neural Cell Death: Implications for Development of Neuroprotective Treatment Strategies. **NeuroRx**. 2004.

ALLEN, J. W. *et al.* Combined mechanical trauma and metabolic impairment in vitro induces NMDA receptor-dependent neuronal cell death and caspase-3-dependent apoptosis. **The FASEB Journal**. 1999.

AL-SABAHI, *et al.* Pomegranate seed oil: Effect on 3-nitropropionic acid-induced neurotoxicity in PC12 cells and elucidation of unsaturated fatty acids composition. **Nutritional Neuroscience**. 2014.

AMITA, H. *et al.* Neuronal connections of direct and indirect pathways for stable value memory in caudal basal ganglia. **European Journal of Neuroscience**. 2019.

ANDRÉ, V. M. *et al.* Dopamine and Glutamate in Huntington's Disease: A Balancing Act. **Neuroscience & Therapeutics**. 2010.

ANGELOVA, P. R. *et al.* Pharmacological Sequestration of Mitochondrial Calcium Uptake Protects Neurons Against Glutamate Excitotoxicity. **Molecular Neurobiology**. 2019.

AUMANN, T. D. *et al.* Neuronal activity regulates expression of tyrosine hydroxylase in adult mouse substantia nigra pars compacta neurons. **Journal of Neurochemistry**. 2011.

BABER, Z.; HAGHIGHAT, N. Glutamine synthetase gene expression and glutamate transporters in C6-glioma cells. **Metab Brain Dis**. 2010.

BALDO, B. et al. Maintenance of Basal Levels of Autophagy in Huntington's Disease Mouse Models Displaying Metabolic Dysfunction. **Plos One**. 2013.

BARKHUIZEN, M. *et al.* The influence of anesthetics on substantia nigra tyrosine hydroxylase expression and tau phosphorylation in the hypoxic–ischemic near-term lamb. **Basic Science Investigation**. 2018.

BATES, G. P. et al. Huntington disease. **Nature Reviews**. 2015.

BENCHOUA, A. *et al.* Involvement of Mitochondrial Complex II Defects in Neuronal Death Produced by N-Terminus Fragment of Mutated Huntingtin. **Molecular Biology of the Cell**. 2006.

BLUM, D. et al. The Role of Adenosine Tone and Adenosine Receptors in Huntington's Disease. **Journal of Caffeine and Adenosine Research**. 2018.

BOECK, C. R. *et al.* Adenosine receptors co-operate with NMDA preconditioning to protect cerebellar granule cells against glutamate neurotoxicity. **Neuropharmacology**. 2005.

BUNNER, K. D.; REBEC, G. V. Corticostriatal Dysfunction in Huntington's Disease: The Basics. **Frontiers in Human Neuroscience**. 2016.

BURNSTOCK, G. The past, present and future of purine nucleotides as signalling molecules. **Neuropharmacology**. 1997.

BURNSTOCK, G. Purinergic signalling and disorders of the central nervous system. **Nature Reviews**. 2008.

BURNSTOCK, G. Purinergic signalling: from discovery to current developments. **Exp Physiol**. 2014.

BURNSTOCK, G. Purine and Purinergic Receptors. **Brain and Neuroscience Advances**. 2018.

BRUSTOVETSKY, N. *et al.* Increased Susceptibility of Striatal Mitochondria to Calcium-Induced Permeability Transition. **The Journal of Neuroscience**. 2003.

CABRAL-COSTA, J. V.; KOWALTOWSKI, A. J. Neurological disorders and mitochondria. **Molecular Aspects of Medicine**. 2020.

CALABRESI, P. *et al.* Inhibition of Mitochondrial Complex II Induces a Long-Term Potentiation of NMDA-Mediated Synaptic Excitation in the Striatum Requiring Endogenous Dopamine. **The Journal of Neuroscience**. 2001.

CAO, T. *et al.* Caffeine Treatment Promotes Differentiation and Maturation of Hypoxic Oligodendrocytes via Counterbalancing Adenosine 1 Adenosine Receptor-Induced Calcium Overload. **Med Sci Monit**. 2019.

CHAMPAGNE, M. *et al.* Protection Against Necrosis but Not Apoptosis by Heat-Stress Proteins in Vascular Smooth Muscle Cells Evidence for Distinct Modes of Cell Death. **Hypertension**. 1999.

CHAUDHRY, F. A. *et al.* The Vesicular GABA Transporter, VGAT, Localizes to Synaptic Vesicles in Sets of Glycinergic as Well as GABAergic Neurons. **The Journal of Neuroscience**. 1998.

CHEN, J. Y. *et al.* Dopamine imbalance in Huntington's disease: a mechanism for the lack of behavioral flexibility. *Frontiers in Neuroscience*. 2013.

CHEN, Q. *et al.* The independence of and associations among apoptosis, autophagy, and necrosis. **Signal Transduction and Targeted Therapy**. 2018.

CHIU, F. *et al.* Elucidating the role of the A2A adenosine receptor in neurodegeneration using neurons derived from Huntington's disease iPSCs. **Human Molecular Genetics**. 2015.

CHEFFER, A. *et al.* Purinergic system in psychiatric diseases. **Molecular Psychiatry**. 2018.

CHUN, S. Y. *et al.* Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells into Dopaminergic Neuron-like Cells in Vitro. **Cell Therapy & Organ Transplantation**. 2016.

CIAMMOLA, A. *et al.* Increased apoptosis, huntingtin inclusions and altered differentiation in muscle cell cultures from Huntington's disease subjects. **Cell Death and Differentiation**. 2006.

CISBANI, G.; CICCHETTI, F. An in vitro perspective on the molecular mechanisms underlying



mutant huntingtin protein toxicity. **Cell Death and Disease**. 2012.

COLLE, D. *et al.* Probucol modulates oxidative stress and excitotoxicity in Huntington's disease models in vitro. **Brain Research Bulletin**. 2012.

CUNHA, R. A. Neuroprotection by adenosine in the brain: From A<sub>1</sub> receptor activation to A<sub>2A</sub> receptor blockade. **Purinergic Signalling**. 2005.

DALL'LGNA, O. P. *et al.* Neuroprotection by caffeine and adenosine A<sub>2A</sub> receptor blockade of beta-amyloid neurotoxicity. **British Journal of Pharmacology**. 2003.

DELONG, M. R.; THOMAS, W. Circuits and Circuit Disorders of the Basal Ganglia. **American Medical Association**. 2007.

DIAZ-HENANDEZ, M. *et al.* Altered P2X<sub>7</sub>-receptor level and function in mouse models of Huntington's disease and therapeutic efficacy of antagonist administration. **FASEB J**. 2009.

DING, J. *et al.* Effect of NMDA on proliferation and apoptosis in hippocampal neural stem cells treated with MK801. **Experimental and Therapeutic Medicine**. 2018.

DONATO, R. *et al.* S100B's double life: Intracellular regulator and extracellular signal. **Biochimica et Biophysica Acta**. 2009.

DONG, X. *et al.* Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. **Acta Pharmacol Sin**. 2009.

DUBYAK, G. R.; EL-MOATASSIM, C. Signal transduction via P<sub>2</sub>-purinergic receptors for extracellular ATP and other nucleotides. The American Physiological Society. 1993.

DUCHEN, M. R. Mitochondria, calcium-dependent neuronal death and neurodegenerative disease. **Eur J Physiol**. 2012.

EID, L.; PARENT, M. Morphological evidence for dopamine interactions with pallidal neurons in primates. **Frontiers in Neuroanatomy**. 2015.

EVANS, A. E. *et al.* Molecular Regulation of Striatal Development: A Review. **Anatomy Research International**. 2012.

FAN, J. *et al.* P38 MAPK is involved in enhanced NMDA receptor-dependent excitotoxicity in YAC transgenic mouse model of Huntington disease. **Neurobiology of Disease**. 2012.

FATOKUN, A. A. *et al.* Adenosine receptor ligands protect against a combination of apoptotic and necrotic cell death in cerebellar granule neurons. **Exp Brain Res**. 2008.

FERRANTE, A. *et al.* Influence of CGS 21680, a selective adenosine A<sub>2A</sub> receptor agonist, on NMDA receptor function and expression in the brain of Huntington's disease mice. **Brain Research**. 2010.

FERREIRA, I. L. *et al.* Mitochondrial-dependent apoptosis in Huntington's disease human cybrids. **Experimental Neurology**. 2010.

FISONE, G. *et al.* Signaling in the basal ganglia: Postsynaptic and presynaptic mechanisms. **Physiology & Behavior**. 2007.

FLORES-BARRERA, E. *et al.* Dopaminergic modulation of corticostriatal responses in medium spiny projection neurons from direct and indirect pathways. **Frontiers in Systems Neuroscience**. 2011.

FRAICHARD, A. *et al.* In vitro differentiation of embryonic stem cells into glial cells and functional neurons. **J Cell Sci**. 1995.

FRANCO, R. *et al.* Adenosine A<sub>2A</sub> Receptor Antagonists Affects NMDA Glutamate Receptor Function. Potential to Address Neurodegeneration in Alzheimer's Disease. **Cells**. 2020.

FREDHOLM, B. B. Adenosine and Neuroprotections. **Neuroprotective Agents and Cerebral Ischaemia**. 1997.

FREDHOLM, B. B. Adenosine\_ a physiological or pathophysiological agent? **J Mol Med**. 2014.

FREEZE, B. S. *et al.* Control of Basal Ganglia Output by Direct and Indirect Pathway Projection Neurons. **The Journal of Neuroscience**. 2013.

GALVAN, L. *et al.* Functional Differences Between Direct and Indirect Striatal Output Pathways in Huntington's Disease. **Journal of Huntington's Disease**. 2012.

GAO, Y. *et al.* Protopanaxtriol protects against 3-nitropropionic acid-induced oxidative stress in a rat model of Huntington's disease. **Acta Pharmacologica Sinica**. 2015.

GARCIA-GIL, M. *et al.* Metabolic Aspects of Adenosine Functions in the Brain. **Frontiers in Pharmacology**. 2021.

GEATER, C. Direct Programming of Neural Progenitors into Medium Spiny Neurons by Transcription Factor Transfection. **PhD Thesis**. Prifysgol Caerdydd. 2014.

GIANFRIDDO, M. *et al.* Adenosine A antagonism increases striatal glutamate outflow in the 2A quinolinic acid rat model of Huntington's disease. **Brain Research**. 2003.

GIRLING, K. D.; WANG, Y. T. Neuroprotective strategies for NMDAR-mediated excitotoxicity in Huntington's Disease. **Front. Biol**. 2016.

GHEZZI, F. *et al.* Propofol Protects Rat Hypoglossal Motoneurons in an In Vitro Model of Excitotoxicity by Boosting GABAergic Inhibition and Reducing Oxidative Stress. **Neuroscience**. 2017.

GLASER, T. *et al.* Implications of purinergic receptor-mediated intracellular calcium transients in neural differentiation. **Cell Communication and Signaling**. 2013.

GLASER, T. *et al.* Purinergic Receptors in Basal Ganglia Diseases: Shared Molecular Mechanisms between Huntington's and Parkinson's Disease. **Neurosci Bull**. 2020.

GOODLIFFE, J. W. *et al.* Differential changes to D1 and D2 medium spiny neurons in the 12-month-old Q175<sup>+/-</sup> mouse model of Huntington's Disease. **Plos One**. 2018.

GUPTA, R.; DESHPANDE, S. B. 3-Nitropropionic acid depresses spinal reflexes involving GABAergic and glycinergic transmission in neonatal rat spinal cord in vitro. **Life Sciences**. 2008.

HABER, S. N. Corticostriatal circuitry. **Dialogues in Clinical Neuroscience**. 2016.

HALLIDAY, G. M. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) immunohistochemistry in human cortex: a quantitative study using different antisera. **Neurosci. Lett**. 1996.

HANSEN, K. B. *et al.* Structure, function, and allosteric modulation of NMDA receptors. **J. Gen. Physiol.** 2018.

HARDINGHAM, G. E.; BADING, H. The Yin and Yang of NMDA receptor signalling. **Trends in Neurosciences.** 2003.

HARDINGHAM, G. E.; BADING, H. Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders. **Nat Rev Neurosci.** 2010.

HARTLEY, D. M. *et al.* Glutamate Receptor-induced Ca<sup>2+</sup> Accumulation in Cortical Cell Culture Correlates with Subsequent Neuronal Degeneration. **The Journal of Neuroscience.** 1993.

HEDREEN, J. C. Tyrosine Hydroxylase-Immunoreactive Elements in the Human Globus Pallidus and Subthalamic Nucleus. **The Journal of Comparative Neurology.** 1999.

HERRERA-MUNDO, N.; SITGES, M. Mechanisms underlying striatal vulnerability to 3-nitropropionic acid. **J. Neurochem.** 2010.

HUERTA-OCAMPO, I. *et al.* Convergence of cortical and thalamic input to direct and indirect pathway medium spiny neurons in the striatum. **Brain Struct Funct.** 2014.

IENTILE, R. *et al.* Apoptosis and necrosis occurring in excitotoxic cell death in isolated chick embryo retina. **Journal of Neurochemistry.** 2001.

JEON, S. J. *et al.* Activation of Adenosine A<sub>2A</sub> Receptor Up-Regulates BDNF Expression in Rat Primary Cortical Neurons. **Neurochem Res.** 2011.

JIN, M. L. *et al.* The neuroprotective effects of cordycepin inhibit glutamate-induced oxidative and ER stress-associated apoptosis in hippocampal HT22 cells. **NeuroToxicology.** 2014.

KANG, B. *et al.* Effect of 3-nitropropionic acid inducing oxidative stress and apoptosis of granulosa cells in geese. **Bioscience Reports.** 2018.

KARANIAN, D. A. *et al.* 3-Nitropropionic Acid Toxicity in Hippocampus: Protection Through N-Methyl-D-Aspartate Receptor Antagonism. **Hippocampus.** 2006.

KALANI, K. *et al.* Mitochondrial permeability transition pore: a potential drug target for

neurodegeneration. **Drug Discovery Today**. 2018.

KIM, D. H. *et al.* Prevention of apoptotic but not necrotic cell death following neuronal injury by neurotrophins signaling through the tyrosine kinase receptor. **J Neurosurg**. 2004.

KING, B. F.; TOWNSEND-NICHOLSON, A. Recombinant P2Y receptors: the UCL experience. **Journal of the Autonomic Nervous System**. 2000.

KLAASSE, E. C. *et al.* Internalization and desensitization of adenosine receptors. **Purinergic Signaling**. 2008.

KOLES, L., *et al.* Modulation of excitatory neurotransmission by neuronal/glia signalling molecules: interplay between purinergic and glutamatergic systems. **Purinergic Signalling**. 2016.

KOVÁCS, Z. *et al.* 5'-Nucleotidases, Nucleosides and their Distribution in the Brain: Pathological and Therapeutic Implications. **Current Medicinal Chemistry**. 2013.

KRASIL'NIKOVA, I. *et al.* Insulin and Glutamate Excitotoxicity. **Frontiers in Neuroscience**. 2019.

KRITIS, A. A. *et al.* Glutamate cytotoxicity and cell lines. **Front. Cell. Neurosci**. 2015.

LABBADIA, J.; MORIMOTO, R. I. Huntington's disease: underlying molecular mechanisms and emerging concepts. **Trends in Biochemical Sciences**. 2013.

LANCIEGO, J. L. *et al.* Functional Neuroanatomy of the Basal Ganglia. **Cold Spring Harb Perspect Med**. 2012.

LEE, H. T. *et al.* A1 Adenosine Receptor Activation Inhibits Inflammation, Necrosis, and Apoptosis after Renal Ischemia-Reperfusion Injury in Mice. **J Am Soc Nephrol**. 2004.

LEVENTHAL, L. *et al.* Cyclosporin A Protects Striatal Neurons In Vitro and In Vivo From 3-Nitropropionic Acid Toxicity. **The Journal of Comparative Neurology**. 2000.

LIOT, G. *et al.* Complex II inhibition by 3-NP causes mitochondrial fragmentation and neuronal cell death via an NMDA- and ROS-dependent pathway. **Cell Death and Differentiation**. 2009.

LIU, J. *et al.* HT22 hippocampal neuronal cell line possesses functional cholinergic properties.

Life Sciences. 2009.

LIU, Y. *et al.* NMDA Receptor Subunits Have Differential Roles in Mediating Excitotoxic Neuronal Death Both In Vitro and In Vivo. **The Journal of Neuroscience**. 2007.

LUGO-HUITRÓN, R. *et al.* Quinolinic Acid: An Endogenous Neurotoxin with Multiple Targets. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. 2013.

MAHR, A.; ABERLE, H. The expression pattern of the Drosophilavesicular glutamate transporter: A marker protein for motoneurons and glutamatergic centers in the brain. **Gene Expression Patterns**. 2006.

MAO, Z. *et al.* Cystamine and cysteamine prevent 3-NP-induced mitochondrial depolarization of Huntington's disease knock-in striatal cells. **European Journal of Neuroscience**. 2006.

MARTINS, A. H. *et al.* Kinin-B2 Receptor Mediated Neuroprotection after NMDA Excitotoxicity Is Reversed in the Presence of KininB1 Receptor Agonists. **Plos One**. 2012.

MARTINS, R. S. *et al.* Caffeine has a dual influence on NMDA receptor-mediated glutamatergic transmission at the hippocampus. **Purinergic Signalling**. 2020.

MARTTELO, G.; SMITH, A. The nature of embryonic stem cells. **Annu Rev Cell Dev Biol**. 2014.

MCCOLGAN, P.; TABRIZI, S. J. Huntington's disease: a clinical review. **European Journal of Neurology**. 2017.

MENEZES, J. L.; LUSKIN, M. B. Expression of Neuron-Specific Tubulin Defines a Novel Population in the Proliferative Layers of the Developing Telencephalon. **The Journal of Neuroscience**. 1994.

MILAKOVIC, T. *et al.* Mutant Huntingtin Expression Induces Mitochondrial Calcium Handling Defects in Clonal Striatal Cells. **The Journal of Biological Chemistry**. 2006.

MILNERWOOD, A. J. *et al.* Mitigation of augmented extrasynaptic NMDAR signaling and apoptosis in cortico-striatal co-cultures from Huntington's disease mice. **Neurobiology of Disease**. 2012.

MILNERWOOD, A. J. *et al.* Early Increase in Extrasynaptic NMDA Receptor Signaling and Expression Contributes to Phenotype Onset in Huntington's Disease Mice. **Neuron**. 2010.

MINNELLA, A. M. *et al.* Excitotoxic superoxide production and neuronal death require both ionotropic and non-ionotropic NMDA receptor signaling. **Scientific Reports**. 2018.

MIRANDA-LOURENÇO, C. *et al.* Impairment of adenosinergic system in Rett syndrome: Novel therapeutic target to boost BDNF signaling. **Neurobiology of Disease**. 2020.

MOREIRA-DE-SÁ, A. *et al.* Adenosine A<sub>2A</sub> Receptors as Biomarkers of Brain Disease. **Frontiers in Neuroscience**. 2021.

MORI, F. *et al.* Relationship Among alpha-Synuclein Accumulation, Dopamine Synthesis, and Neurodegeneration in Parkinson Disease Substantia Nigra. **J Neuropathol Exp Neurol**. 2006.

MOURO, F. M. *et al.* Adenosine A<sub>2A</sub> receptors facilitate synaptic NMDA currents in CA1 pyramidal neurons. **British Journal of Pharmacology**. 2018.

NICIU, M. J. *et al.* Overview of glutamatergic neurotransmission in the nervous system. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. 2012.

NORTH, RA. P2X purinoceptor plethora. *The Neurosciences*. 1996.

ODA, Y. Choline acetyltransferase: The structure, distribution and pathologic changes in the central nervous system. **Pathology International**. 1999.

OKABE, S. *et al.* Development of neuronal precursor cells and functional postmitotic neurons from embryonic stem cells in vitro. **Mechanisms of Development**. 1996.

OLIVEIRA, J. M. A. Nature and cause of mitochondrial dysfunction in Huntington's disease: focusing on huntingtin and the striatum. **J. Neurochem**. 2010.

ORDONEZ, A. N. *et al.* Rapid ischemic tolerance induced by adenosine preconditioning results in Bcl-2 interacting mediator of cell death (Bim) degradation by the proteasome. **Int J Pathophysiol Pharmacol**. 2020.

PANDEY, M.; RAJAMMA, U. Huntington's disease: the coming of age. **Indian Academy of**

**Sciences.** 2018.

PANG, Z.; GEDDES, J. W. Mechanisms of Cell Death Induced by the Mitochondrial Toxin 3-Nitropropionic Acid: Acute Excitotoxic Necrosis and Delayed Apoptosis. **The Journal of Neuroscience.** 1997.

PAOLETTI, P. *et al.* Dopaminergic and Glutamatergic Signaling Crosstalk in Huntington's Disease Neurodegeneration: The Role of p25/Cyclin-Dependent Kinase 5. **The Journal of Neuroscience.** 2008.

PARK, J. *et al.* Neuroprotective effects of myristargenol A against glutamate-induced apoptotic HT22 cell death. **RSC Advances.** 2019.

PATTHEY, C.; GUNHAGA, L. Signaling pathways regulating ectodermal cell fate choices. **Experimental Cell Research.** 2014.

PEDATA, F. *et al.* Adenosine A2A Receptors Modulate Acute Injury and Neuroinflammation in Brain Ischemia. **Mediators of Inflammation.** 2014.

PEI, L. *et al.* DAPK1-p53 Interaction Converges Necrotic and Apoptotic Pathways of Ischemic Neuronal Death. **The Journal of Neuroscience.** 2014.

PEREZ-DE LA CRUZ, V.; SANTAMARIA, A. Integrative Hypothesis for Huntington's Disease: A Brief Review of Experimental Evidence. **Physiol. Res.** 2007.

PERREAULT, M. L. *et al.* Heteromeric Dopamine Receptor Signaling Complexes: Emerging Neurobiology and Disease Relevance. **Neuropsychopharmacology.** 2014.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research.** 2001.

PINTOR, A. *et al.* Adenosine A2A receptor antagonists prevent the increase in striatal glutamate levels induced by glutamate uptake inhibitors. **Journal of Neurochemistry.** 2004.

PIVONELLO, R. L. *et al.* Novel insights in dopamine receptor physiology. **European Journal of Endocrinology.** 2007.



PLOTKIN, J. L.; GOLBERG, J. A. Thinking Outside the Box (and Arrow): Current Themes in Striatal Dysfunction in Movement Disorders. **The Neuroscientist**. 2018.

POPOLI, P. *et al.* Blockade of Striatal Adenosine A<sub>2A</sub> Receptor Reduces, through a Presynaptic Mechanism, Quinolinic Acid-Induced Excitotoxicity: Possible Relevance to Neuroprotective Interventions in Neurodegenerative Diseases of the Striatum. **The Journal of Neuroscience**. 2002.

PORTERA-CAILLIAU, C. *et al.* Excitotoxic Neuronal Death in the Immature Brain Is an Apoptosis-Necrosis Morphological Continuum. **The Journal of Comparative Neurology**. 1997.

QUINTANILLA, R. A. *et al.* Possible role of mitochondrial permeability transition pore in the pathogenesis of Huntington disease. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 2016.

RANGEL-BARAJAS, C.; REBEC, G. V. Dysregulation of Corticostriatal Connectivity in Huntington's Disease: A Role for Dopamine Modulation. **Journal of Huntington's Disease** 5. 2016.

RATHJEN, J. *et al.* Formation of a primitive ectoderm like cell population, EPL cells, from ES cells in response to biologically derived factors. **Journal of Cell Science**. 1999.

RAVIKUMAR, B. *et al.* Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. **Nature Genetics**. 2004.

REBOLA, N. *et al.* Different roles of adenosine A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub> and A<sub>3</sub> receptors in controlling kainate-induced toxicity in cortical cultured neurons. **Neurochemistry International**. 2005.

RIBEIRO, J. A.; SEBASTIÃO, A. M. Modulation and metamodulation of synapses by adenosine. **Acta Physiologica**. 2010.

RIBEIRO, F. F. *et al.* Axonal elongation and dendritic branching is enhanced by adenosine A<sub>2A</sub> receptors activation in cerebral cortical neurons. **Brain Struct Funct**. 2015.

RIBEIRO, F. F. *et al.* Purine nucleosides in neuroregeneration and neuroprotection. **Neuropharmacology**. 2016.

RIVERO-SEGURA, N. A. *et al.* PRL induces neuroprotection reducing [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> overload. **Plos**

**One.** 2017.

ROMBO, D. M., *et al.* Adenosine A1 Receptor Suppresses Tonic GABAA Receptor Currents in Hippocampal Pyramidal Cells and in a Defined Subpopulation of Interneurons. **Cerebral Cortex.** 2016.

ROSZEK, K.; CZARNECKA, J. Is Ecto-nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase (NTPDase)-based Therapy of Central Nervous System Disorders Possible? **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry.** 2015.

RUAN, Q. *et al.* Striatal cells from mutant huntingtin knock-in mice are selectively vulnerable to mitochondrial complex II inhibitor-induced cell death through a non-apoptotic pathway. **Human Molecular Genetics.** 2004.

RUEDA, C. B. *et al.* Mitochondrial ATP-Mg/Pi Carrier SCaMC-3/Slc25a23 Counteracts PARP-1-Dependent Fall in Mitochondrial ATP Caused by Excitotoxic Insults in Neurons. **The Journal of Neuroscience.** 2015.

RUEDA, C. B. *et al.* Glutamate excitotoxicity and Ca<sup>2+</sup>-regulation of respiration: Role of the Ca<sup>2+</sup> activated mitochondrial transporters (CaMCs). **Biochimica et Biophysica Acta.** 2016.

SAITO, K. *et al.* The physiological roles of vesicular GABA transporter during embryonic development: a study using knockout mice. **Molecular Brain,** 2010.

SALVATORE, M. F. *et al.* Tyrosine hydroxylase inhibition in substantia nigra decreases movement frequency. **Mol Neurobiol.** 2019.

SANDAU, U. S. *et al.* Adenosine Kinase Deficiency in the Brain Results in Maladaptive Synaptic Plasticity. **The Journal of Neuroscience.** 2016.

SANO, H. *et al.* Signals through the Striatopallidal Indirect Pathway Stop Movements by Phasic Excitation in the Substantia Nigra. **The Journal of Neuroscience.** 2013.

SEBASTIÃO, A. M. A maestro role of adenosine A2A receptors in GABAergic synapses stabilization during postnatal neuronal maturation. **Purinergic Signalling.** 2022.

SEPERS, M. D.; RAYMOND, L. A. Mechanisms of synaptic dysfunction and excitotoxicity in

Huntington's disease. **Drug Discovery Today**. 2014.

SHEPHERD, G. M. G. Corticostriatal connectivity and its role in disease. **Nature**. 2013.

SHIN, E. *et al.* GABAergic Neurons from Mouse Embryonic Stem Cells Possess Functional Properties of Striatal Neurons In Vitro and Develop into Striatal Neurons In Vivo in a Mouse Model of Huntington's Disease. **Stem Cell Rev and Rep**. 2012.

SHIPP, S. The functional logic of corticostriatal connections. **Brain Struct Funct**. 2017.

SHIVERS, B. D. *et al.* Cellular localization of proenkephalin mRNA in rat brain: Gene expression in the caudate-putamen and cerebellar cortex. **Proc. Natl. Acad. Sci**. 1986.

SMUKLER, S. R. *et al.* Embryonic stem cells assume a primitive neural stem cell fate in the absence of extrinsic influences. **JCB**. 2006.

STANIKA, R. I. *et al.* Comparative Impact of Voltage-Gated Calcium Channels and NMDA Receptors on Mitochondria-Mediated Neuronal Injury. **The Journal of Neuroscience**. 2012.

STRUBING, C. *et al.* Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into the neuronal lineage in vitro gives rise to mature inhibitory and excitatory neurons. **Mechanisms of Development**. 1995.

SUN, X. *et al.* Extrasynaptic NMDA receptor-induced tau overexpression mediates neuronal death through suppressing survival signaling ERK phosphorylation. **Cell Death and Disease**. 2016.

TAVAZZANI, E. *et al.* Glutamic acid decarboxylase 67 expression by a distinct population of mouse vestibular supporting cells. **Frontiers in Cellular Neuroscience**. 2014.

TEHSE, J.; TAGHIBIGLOU, G. The overlooked aspect of excitotoxicity: Glutamate-independent excitotoxicity in traumatic brain injuries. **Eur J Neurosci**. 2018.

TEPPER, J. M. *et al.* Feedforward and feedback inhibition in neostriatal GABAergic spiny neurons. **Brain Research Review**. 2008.

TESCAROLLO, F. C. *et al.* Role of Adenosine in Epilepsy and Seizures. **Journal of Caffeine and Adenosine Research**. 2020.

TONG, Y. *et al.* Spatial and temporal requirements for huntingtin (Htt) in neuronal migration and survival during brain development. **J Neurosci.** 2011.

TYMIANSKI, M. *et al.* Source Specificity of Early Calcium Neurotoxicity in Cultured Embryonic Spinal Neurons. **The Journal of Neuroscience.** 1993.

VELASCO, M. *et al.* Excitotoxicity: An Organized Crime at The Cellular Level. **Journal of Neurology and Neuroscience.** 2017.

VIS, J. C. *et al.* 3-Nitropropionic acid induces a spectrum of Huntington's disease-like neuropathology in rat striatum. **Neuropathology and Applied Neurobiology.** 1999.

VIS, J. C. *et al.* 3-Nitropropionic acid induces cell death and mitochondrial dysfunction in rat corticostriatal slice cultures. **Neuroscience Letters.** 2002.

VYKLYCKY, V. *et al.* Structure, Function, and Pharmacology of NMDA Receptor Channels. **Physiol. Res.** 2014.

WALLING, H. W. *et al.* Molecular Aspects of Huntington's Disease. **Journal of Neuroscience Research.** 1998.

WANG, K. S. *et al.* Interactions between basal ganglia pathways. **Frontiers in Neuroanatomy.** 2015.

WEI, Q. *et al.* Roles of poly (ADP-ribose) polymerase 1 activation and cleavage in induction of multi-oocyte ovarian follicles in the mouse by 3-nitropropionic acid. **Reproduction, Fertility and Development.** 2019.

WILSON, S. I. *et al.* The status of Wnt signalling regulates neural and epidermal fates in the chick embryo. **Nature.** 2001.

WOZNY, C. *et al.* VGLUT2 Positive Hippocampal Output Neurons. **Frontiers in Cellular Neuroscience.** 2018.

XU, X. *et al.* Necrostatin-1 protects against glutamate-induced glutathione depletion and caspase-independent cell death in HT-22 cells. **Journal of Neurochemistry.** 2007.

YEGUTKIN, G. G. Enzymes involved in metabolism of extracellular nucleotides and nucleosides: Functional implications and measurement of activities. **Crit Rev Biochem Mol Biol**. 2014.

YING, Q. *et al.* Conversion of embryonic stem cells into neuroectodermal precursors in adherent monoculture. **Nature Biotechnology**. 2003.

ZERON, M. M. *et al.* Mutant Huntingtin Enhances Excitotoxic Cell Death. **Molecular and Cellular Neuroscience**. 2001.

ZERON, M. M. *et al.* Increased Sensitivity to N-Methyl-D-Aspartate Receptor-Mediated Excitotoxicity in a Mouse Model of Huntington's Disease. **Neuron**. 2002.

ZERON, M. M. *et al.* Potentiation of NMDA receptor-mediated excitotoxicity linked with intrinsic apoptotic pathway in YAC transgenic mouse model of Huntington's disease. **Molecular and Cellular Neuroscience**. 2004.

ZHOU, X. *et al.* NMDA receptor-mediated excitotoxicity depends on the coactivation of synaptic and extrasynaptic receptors. **Cell Death and Disease**. 2013.

ZHU, S. *et al.* Necrostatin-1 ameliorates symptoms in R6/2 transgenic mouse model of Huntington's disease. **Cell Death and Disease**. 2011.

## **ANEXOS**

## SÚMULA CURRICULAR

### 1. DADOS PESSOAIS

Nome: Lucas Bonfim Marques

Data de Nascimento: 18/08/1991

Endereço: Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 748 – 05508-000 – São Paulo – Brasil

E-mail: [lucasbonfimmarques@gmail.com](mailto:lucasbonfimmarques@gmail.com)

### 2. FORMAÇÃO

2013-2018: Graduação em Farmácia – Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brasil.

2018-2022: Mestrado em Ciências Biológicas (Bioquímica) no Instituto de Química – Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, Brasil.

### 3. PUBLICAÇÕES

GLASER, T.; SILVA, J. B.; JUVENAL, G. A.; MAIOLINI, P. N.; TURRINI, N.; PETIZ, L. L.; **MARQUES, B. M.**; RIBEIRO, D. E.; YE, Q.; TANG, Y.; ULRICH, H. Various facets of excitotoxicity. Exploration of Neuroprotective Therapy. 2022.

GLASER, T.; ANDREJEW, R.; OLIVEIRA-GIACOMELLI, A.; RIBEIRO, D. E.; **MARQUES, L. B.**; YE, Q.; REN, W.; SEMYANOV, A.; ILLES, Y. T.; ULRICH, H. Purinergic Receptors in Basal Ganglia Diseases: Shared Molecular Mechanisms between Huntington's and Parkinson's Disease. Neurosci Bull. 2020.

**MARQUES, LUCAS BONFIM**; OTTONI, FLAVIANO MELO; XAVIER PINTO, MAURO CUNHA; RIBEIRO, JULIANA MARTINS; DE SOUSA, FERNANDA S.; WEINLICH, RICARDO; DE VICTO, NATHALIA CRUZ; KISITU, JAFFAR; HOLZER, ANNA-KATHARINA; LEIST, MARCEL; ALVES, RICARDO JOSÉ; DE SOUZA-FAGUNDES, ELAINE MARIA. Lapachol acetylglycosylation

enhances its cytotoxic and pro-apoptotic activities in HL60 cells. *TOXICOLOGY IN VITRO*, v. 65, p. 104772, 2020.

PERDIGAO, G. M. C.; LOPES, M. S.; **MARQUES, L. B.**; PRAZERES, P. H. D.; GOMES, K. S.; OLIVEIRA, R. B.; PINTO, M. C. X.; SOUZA-FAGUNDES, E. M. Novel nitroaromatic compound activates autophagy and apoptosis pathways in HL60 cells. *CHEMICO-BIOLOGICAL INTERACTIONS*, v. 283, p. 107-115, 2018.

DE SOUZA-FAGUNDES, ELAINE MARIA; DELP, JOHANNES; PRAZERES, PEDRO H. D. M.; **MARQUES, LUCAS BONFIM**; CARMO, ARTURENE MARIA LINO; STROPPIA, PEDRO HENRIQUE FAZZA; GLANZMANN, NICOLAS; KISITU, JAFFAR; SZAMOSVÁRI, DÁVID; BÖTTCHER, THOMAS; LEIST, MARCEL; DA SILVA, ADILSON DAVID. Correlation of structural features of novel 1,2,3-triazoles with their neurotoxic and tumoricidal properties. *CHEMICO-BIOLOGICAL INTERACTIONS*, v. 291, p. 253-263, 2018.

PINTO, NÍCOLAS C.C.; SILVA, JUCÉLIA B.; MENEGATI, LAURA M.; GUEDES, MARIA CLARA M.R.; **MARQUES, LUCAS B.**; SILVA, THIAGO P. DA; MELO, ROSSANA C.N. DE; SOUZA-FAGUNDES, ELAINE M. DE; SALVADOR, MARCOS J.; SCIO, ELITA; FABRI, RODRIGO L. Cytotoxicity and bacterial membrane destabilization induced by *Annona squamosa* L. extracts. *ANAIS DA ACADEMIA BRASILEIRA DE CIENCIAS*, v. 89, p. 2053-2073, 2017.

TIZZIANI, T.; VENZKE, D.; RUANI, A. P.; **MARQUES, L. B.**; PRAZERES, P. H. D. M.; SOUZA-FAGUNDES, E. M.; PIZZOLATTI, M. G.; BRIGHENTE, I. M. C. Antitumor screening of crude extracts of ten medicinal plants of *Polygala* genus from Southern Brazil. *JOURNAL OF APPLIED PHARMACEUTICAL SCIENCE*, p. 079-083, 2017.

FERREIRA, ISABELLA P.; PILÓ, ELISA D.L.; RECIO-DESPAIGNE, ANGEL A.; DA SILVA, JEFERSON G.; RAMOS, JONAS P.; **MARQUES, LUCAS B.**; PRAZERES, PEDRO H. D. M.; TAKAHASHI, JACQUELINE A.; SOUZA-FAGUNDES, ELAINE M.; ROCHA, WILLIAN; BERHALDO, HELOISA. Bismuth (III) complexes with 2-acetylpyridine- and 2-benzoylpyridine-derived hydrazones: Antimicrobial and cytotoxic activities and effects on the clonogenic survival of human solid tumor cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry (Print)*, v. 24, p. 2988-2998, 2016.