



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM - FFOE
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA

ALFAETE VIEIRA OLIVEIRA

EFEITO NEUROPROTECTOR DO ANTAGONISMO DOS
RECEPTORES DO TIPO P2X7 NO PARKINSONISMO EXPERIMENTAL
INDUZIDO POR ROTENONA EM RATOS.

FORTALEZA

2022

ALFAETE VIEIRA OLIVEIRA

**EFEITO NEUROPROTEROR DO ANTAGONISMO DOS
RECEPTORES DO TIPO P2X7 NO PARKINSONISMO EXPERIMENTAL
INDUZIDO POR ROTENONA EM RATOS.**

Monografia apresentada ao Curso de Bacharelado em Farmácia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem – FFFOE da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof. Dra. Geanne Matos de Andrade.

Coorientador: Ma. Tyciane de Souza Nascimento.

FORTALEZA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- O45e Oliveira, Alfaete.
EFEITO NEUROPROTEROR DO ANTAGONISMO DOS RECEPTORES DO TIPO P2X7 NO
PARKINSONISMO EXPERIMENTAL INDUZIDO POR ROTENONA EM RATOS. / Alfaete Oliveira. –
2022.
70 f. : il. color.
- Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia,
Odontologia e Enfermagem, Curso de Farmácia, Fortaleza, 2022.
Orientação: Profa. Dra. Geanne Matos de Andrade.
Coorientação: Profa. Ma. Tyciane de Souza Nascimento.
1. Doença de Parkinson. 2. P2X7. 3. Rotenona. I. Título.

CDD 615

ALFAETE VIEIRA OLIVEIRA

**EFEITO NEUROPROTEROR DO ANTAGONISMO DOS
RECEPTORES DO TIPO P2X7 NO PARKINSONISMO EXPERIMENTAL
INDUZIDO POR ROTENONA EM RATOS.**

Monografia apresentada ao Curso de Bacharelado em Farmácia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem – FFFOE da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Aprovada em: 04/06/2022.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Geanne Matos de Andrade (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Ramon Róseo Paula Pessoa Bezerra de Menezes
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Ma. Jéssica Rabelo Bezerra
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Ao meu pai, meu melhor amigo, que estará sempre presente em meu coração.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer à Deus.

A minha mãe, **Maria**, a pessoa mais importante na minha vida, que está comigo em todos os momentos, sempre me apoiou e incentivou a correr atrás dos meus sonhos e objetivos e sempre será minha melhor amiga, esse TCC é mais que tudo, para você.

A minha irmã, **Alexandra** e meus amados sobrinhos, **Alycia** e **Benício**, por são mais que tudo, parte de mim e que eu amo profundamente.

Ao meu companheiro, **João Victor**, por estar comigo em todos o momentos importantes, sempre me dando apoio. Obrigado por compreender minhas ausências e sempre me incentivar a buscar meus sonhos.

A minha querida orientadora, **Profa. Dra. Geanne Matos**, muito obrigado por ter acreditado em mim e me recebido em seu grupo de pesquisa há 5 anos atrás, te agradeço pela excelente orientação.

Gostaria de agradecer a **Tyci**, que conheci assim que cheguei no grupo LNC, que se tornou muito mais que uma colega de trabalho, mas sim uma grande amiga, orientada e parceira, com a qual eu divido os bons e maus momentos, muito obrigado amiga pela sua coorientação e parceria que pretendo levar para toda a vida.

Aos professores, por todos os conselhos, pela ajuda e pela paciência com a qual guiaram o meu aprendizado. Tenho certeza de que levarei um pouco de cada um de vocês em minha vida pessoal e profissional. Em especial gostaria de agradecer aos que compõem essa banca **Prof. Dr. Ramon** e a **Mra Jéssica Rabelo**, obrigado pelas correções e ensinamentos.

Aos meus grandes amigos do LNC que sem o apoio de vocês chagar até aqui seria muito mais difícil. **Jéssica Pessoa**, obrigado pela amizade pelo suporte sua amizade é muito importante para mim. **Juliete, Carol, Albert, Amanda, Ari**, gostaria de agradecer a amizade, risadas e companheirismo.

Ao meu grupo de amigos, **Bia Mota, Lívia, Hendy, Mac, Júlio, Mateus Edson**, que a faculdade me proporcionou, saibam que pretendo levar essa relação para a vida. O suporte de vocês foi essencial para tornar essa grande jornada mais leve. Em especial, gostaria de agradecer ao **Joshua**, que costumo dizer que foi um presente que a universidade me deu muito obrigado por tudo.

Gostaria de agradecer a todos os funcionários da universidade, muito obrigado pelo trabalho duro de vocês que torna todo o processo possível.

Gostaria de agradecer aos animais que foram utilizados no projeto, sempre tive muito respeito pela vida de todos, sem a qual esse trabalho não poderia ser executado.

A todos que participaram, direta ou indiretamente do desenvolvimento deste trabalho de pesquisa, enriquecendo o meu processo de aprendizado. Às pessoas com quem convivi ao longo desses anos de curso, que me incentivaram e que certamente tiveram impacto na minha formação acadêmica.

*“Educação não transforma o mundo.
Educação muda as pessoas. Pessoas
transformam o mundo.”*

(Paulo Freire)

RESUMO

A Doença de Parkinson (DP) é caracterizada pela perda progressiva de neurônios dopaminérgicos da substância negra, levando a redução severa dos níveis de dopamina associada à neuroinflamação, resultando em vários sintomas motores e não motores. A rotenona (ROT) é um inseticida, utilizado na jardinagem que mimetiza os sintomas e a fisiopatologia da DP. A ativação dos receptores P2X₇, pelo ATP exerce, possui um papel importante em diversos processos inflamatórios. Assim, o presente estudo teve como objetivo investigar os efeitos antagonistas de receptores P2X₇ pelo *Brilliant Blue G* (BBG) em déficits motores e não motores e danos neuronais induzidos por ROT em ratos. 80 ratos *Wistar* foram divididos em 4 grupos: CTL (veículo ROT: 2 % de DMSO em óleo de girassol, ip, 21 dias) e veículo BBG, (ip, 15 dias), CTL BBG (veículo ROT, ip, 21 dias e BBG 50 mg / Kg ip, 15 dias), ROT (ROT 2,75 mg / Kg, ip por 21 dias e veículo BBG) e BBG (ROT 2,75 mg / Kg, ip, 21 dias e BBG 50 mg / Kg ip, 15 dias). Os animais foram submetidos a testes para avaliação dos déficits motores e não motores, ao final do protocolo os animais foram eutanasiados para realização de análise de dopamina, por HPLC e avaliação imunohistopatológica (TH, GFAP e Iba-1). Os resultados mostraram que o déficit induzido pela rotenona na detecção de odores voláteis após 7 dias de administração pode ser usado como ponto de partida para o tratamento, e o BBG protege o déficit induzido pela rotenona na exploração horizontal e vertical e velocidade média no teste de campo aberto, também foi observada uma melhora no déficit de coordenação motora no teste do *rotarod* e prevenção da anedonia no teste de preferência de sacarose e protegeu contra o comprometimento da memória de trabalho no teste do labirinto em Y. O BBG também protegeu os animais expostos à rotenona da neurodegeneração dopaminérgica (TH) e preveniu da microgliose (Iba-1). Esses resultados mostraram que o bloqueio dos receptores P2X₇ pelo BBG pode prevenir déficits motores e não motores, presentes na DP, por meio do controle da neurodegeneração e microgliose.

Palavras-chave: Doença de Parkinson; P2X₇; *Brilliant Blue G*.

ABSTRACT

Parkinson's Disease (PD) is characterized by the progressive loss of dopaminergic neurons from the substantia nigra, leading to severe reduction in dopamine levels associated with neuroinflammation, resulting in various motor and non-motor symptoms. Rotenone (ROT) is an insecticide used in gardening that mimics the symptoms and pathophysiology of PD. Activation of P2X7 receptors by ATP plays an important role in several inflammatory processes. Thus, the present study aimed to investigate the antagonistic effects of P2X7 receptors by Brilliant Blue G (BBG) on motor and non-motor deficits and neuronal damage induced by ROT in rats. 80 Wistar rats were divided into 4 groups: CTL (ROT vehicle: 2% DMSO in sunflower oil, ip, 21 days) and BBG vehicle, (ip, 15 days), BBG CTL (ROT vehicle, ip, 21 days and BBG 50 mg / kg ip, 15 days), ROT (ROT 2.75 mg / kg, ip for 21 days and BBG vehicle) and BBG (ROT 2.75 mg / kg, ip, 21 days and BBG 50 mg / kg ip, 15 days). The animals were submitted to tests to evaluate the motor and non-motor deficits, at the end of the protocol the animals were euthanized to perform dopamine analysis, by HPLC and immunohistopathological evaluation (TH, GFAP and Iba-1). The results showed that the rotenone-induced deficit in the detection of volatile odors after 7 days of administration can be used as a starting point for treatment, and BBG protects the rotenone-induced deficit in horizontal and vertical exploration and mean velocity in the test of In the open field, an improvement in motor coordination deficit in the rotarod test and prevention of anhedonia in the sucrose preference test was also observed and protected against working memory impairment in the Y-maze test. BBG also protected exposed animals to rotenone from dopaminergic neurodegeneration (TH) and prevented from microgliosis (Iba-1). These results showed that the blockade of P2X7 receptors by BBG can prevent motor and non-motor deficits present in PD by controlling neurodegeneration and microgliosis.

Keywords: Parkinson's Disease; P2X₇; Rotenone.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Desenho do Protocolo Experimental	28
Figura 2	Efeitos do BBG sobre a atividade locomotora horizontal em ratos parkinsonismos no teste no campo aberto.....	35
Figura 3	Efeitos do BBG sobre a atividade locomotora vertical em ratos parkinsonismos no teste no campo aberto.....	36
Figura 4	Efeitos do BBG sobre a velocidade média em ratos parkinsonismos no teste no campo aberto.....	36
Figura 5	Efeitos do BBG sobre a coordenação motora em ratos parkinsonianos no teste do rotarod.....	37
Figura 6	Efeitos do BBG sobre a hiposmia em ratos parkinsonianos no teste do pellet enterrado.....	38
Figura 7	Efeitos do BBG sobre o comportamento tipo depressivo (anedonia) induzido pela rotenona no teste de preferência por sacarose.....	39
Figura 8	Efeitos do BBG sobre a memória de trabalho no teste do labirinto em Y.....	40
Figura 9	Efeitos do BBG sobre a concentrações de dopamina no estriado de ratos expostos a rotenona.....	41
Figura 10	BBG atenua a perda de tirosina hidroxilase (TH) no mesencéfalo de ratos expostos à rotenona.....	42
Figura 11	BBG atenua a perda estriatal de Tirosina Hidroxilase em ratos expostos à rotenona.....	42
Figura 12	BBG atenua a microgliose no estriado de ratos expostos à rotenona.....	43
Figura 13	BBG não protege o estriado de ratos expostos à rotenona da astrogliose.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Organização dos grupos experimentais	26
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT	Serotonina
6-OHDA	6-Hidroxi-dopamina
ANOVA	Análise De Variância (<i>Analysys Of Variance</i>)
ATP	Adenosina Trifosfato
ASC	Área Sob A Curva
BBG	<i>Brilliant Blue G</i>
DA	Dopamina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOPAC	Ácido Diidroxifenilacético
DP	Doença De Parkinson
EPM	Erro Padrão Médio
EROS	Espécies Reativas De Oxigênio
FE	Fluido Extracelular
GFAP	<i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i>
HPLC	Cromatografia Líquida De Alta Eficiência (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
IBGE	Instituto Brasileiro De Geografia E Estatística
I.P	Injeção Intraperitoneal
ml	Mililitro
mm	Milímetros
NE	Noradrenalina
NPDM	Núcleo De Pesquisa E Desenvolvimento De Medicamentos
SN	Substância Negra
SNPC	Substância Negra <i>Pars Compacta</i>

TH Tirosina Hidroxilase

μg Microgramas

μl Microlitros

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
\pm	Mais ou menos
μ	Micro
$<$	Menor que
$>$	Maior que
$\%$	Porcentagem

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
1.2. Etiologia.....	14
1.3. Epidemiologia.....	15
1.4. Fisiopatologia.....	16
1.5. Sintomas motores e não motores.....	16
1.6. Tratamento.....	17
1.7. Modelos Animais da Doença de Parkinson.....	18
1.8. Modelo da Doença de Parkinson com Rotenona.....	20
1.9. Sistema Purinérgico e os Receptores P2X7.....	21
1.10. BBG e o Antagonismo dos Receptores P2X7.....	23
2. OBJETIVOS.....	24
2.1. Objetivo Geral.....	24
2.2. Objetivos Específicos.....	24
3. METODOLOGIA.....	25
3.1. Animais.....	25
3.2. Drogas.....	25
3.3. Protocolo Experimental.....	25
3.4. Testes Comportamentais.....	27
<i>3.4.1. Teste do Campo Aberto.....</i>	<i>27</i>
<i>3.4.2. Teste do Rotarod.....</i>	<i>28</i>
<i>3.4.3. Teste do Pellet de comida enterrado.....</i>	<i>28</i>
<i>3.4.4. Teste de preferência por Sacarose.....</i>	<i>29</i>
<i>3.4.5. Teste do Labirinto em Y.....</i>	<i>29</i>
3.5. Dosagem de Dopamina por HPLC.....	31
3.6. Imunomarcção para Tirosina hidroxilase.....	31
3.7. Imunomarcção para Iba – 1.....	31
3.8. Imunomarcção para GFAP.....	32
3.9. Análise Estatística.....	33
4. RESULTADOS.....	34
4.1. BBG protegeu ratos parkinsonianos contra déficits motores (teste do campo aberto).....	34

4.2.	Efeito do BBG sobre a coordenação motora dos animais (teste do <i>rotarod</i>).....	36
4.3.	Efeito do BBG sobre a detecção olfatória de cheiros voláteis dos animais (teste da procura do <i>pellet</i> enterrado).....	37
4.4.	Efeito do BBG sobre comportamento depressivo dos animais (teste de preferência por sacarose).....	39
4.5.	Efeito do BBG sobre a memória de trabalho dos animais (Teste do labirinto em Y).....	40
4.6.	Efeito do BBG sobre as concentrações de dopamina no estriado.....	41
4.7.	Efeitos do BBG sobre a imunorreatividade para TH em animais parkinsonianos.....	42
4.8.	Efeitos do BBG sobre a imunorreatividade para iba-1 em ratos parkinsonianos.....	45
4.9.	Efeitos do BBG sobre a imunorreatividade para GFAP em ratos parkinsonianos.....	47
5.	DICUSSÃO.....	48
6.	CONCLUSÃO.....	53
7.	REFERÊNCIAS.....	54

1 INTRODUÇÃO

1.1. Doença de Parkinson

A doença de Parkinson (DP) foi definida pela primeira vez em 1817, por James Parkinson, que publicou um trabalho intitulado “*Essay on the Shaking Palsy*”, onde descreveu um fenômeno intitulado *Shaking Palsy*, que caracterizava uma paralisia que causa tremores involuntários e diminuição da força muscular em pacientes, com desenvolvimento lento e progressivo (PARKINSON; JAMES, 1817). Posteriormente, a DP foi definida como uma doença neurodegenerativa, caracterizada pela perda de neurônios dopaminérgicos na substância negra e mesencéfalo, acarretando alterações fisiológicas importantes, como uma diminuição considerável nos níveis de dopamina estriatais, aspecto responsável pelas manifestações motoras da doença (REICH; SAVITT, 2019).

1.2. Etiologia

A DP trata-se de uma doença idiopática, ou seja, não possui causas bem definidas. O que se sabe é que tem origem multifatorial, estando relacionados fatores genéticos, envelhecimento e exposição à substâncias químicas, como os agrotóxicos (SIMON; TANNER; BRUNDIN, 2020); (HUANG; CHAN; HALLIDAY, 2007); (JANKOVIC; TAN, 2020). Mutações em alguns genes são ligados a uma pequena população de pacientes com DP, alterações em genes como da α -sinucleína (SNCA), Parkina (PARKIN), a quinase mitocondrial Quinase 1 induzida por PTEN (PINK1), DJ-1 (DJ-1) que funciona como uma chaperona e regulador transcricional, Dardarina ou Quinase 2 rica em leucina (LRRK2) e da Glucocerebrosidase (GBA) (SIMON; TANNER; BRUNDIN, 2020). Esses casos podem apresentar herança autossômica dominante ou recessiva, contudo, essas mutações como fator causal da DP familiar, representa apenas de 5 a 10% dos casos da doença, com os demais e maioria dos casos não tendo fator determinante conhecido (JAMES; GEORGOPOULOS, 2020). E esse determinante genético está presente apenas em 30% dos pacientes com DP familiar e 3-5% dos casos de DP idiopática (SAVICA, 2019).

O principal fator ambiental relacionado a ocorrência da doença é a exposição a pesticidas. Estudos mostram uma grande prevalência de parkinsonismo em trabalhadores rurais e a relação estreita entre a exposição à esses produtos e aumento do risco de desenvolver a

doença (BALL *et al.*, 2019). Os modelos animais baseados na exposição a esses agentes e que reproduzem achados patológicos e clínicos da doença endossam essa ideia. É interessante observar que a aprovação anual de novos agrotóxicos no Brasil tem sido a maior em 15 anos (LEITE, 2020), devido a uma nova legislação, mais permissiva de utilização e liberação de agrotóxicos (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2019), associado ao aumento crescente de casos de doença de Parkinson.

O principal fator correlacionado a doença ainda é o envelhecimento, que é caracterizada por instabilidade genômica, alterações epigenéticas, perda da sua capacidade de produção e dobramento de proteínas adequados, disfunção mitocondrial, detecção desregulada de nutrientes, comunicação intercelular alterada e senescência celular (HOU *et al.*, 2019).

1.3. Epidemiologia

A DP é uma das doenças neurodegenerativas que mais afeta a população acima de 60 anos, perdendo apenas para a Doença de Alzheimer (DA) e a principal doença relacionada a distúrbios de movimento (TYSNES; STORSTEIN, 2017). De acordo com alguns estudos prospectivos, estima-se que a DP possua uma prevalência de 0,3% na população geral, 1,0% em pessoas com mais de 60 anos e 3,0% naquelas com 80 anos ou mais e uma incidência de 8 a 18 por 100.000 pessoas/ano, em países industrializados (LEE; GILBERT, 2016); (BALESTRINO; SCHAPIRA, 2020); (TYSNES; STORSTEIN, 2017).

Dados epidemiológicos atualizados da DP no Brasil são escassos, mas de acordo com o último censo realizados em 2010, estima-se que no país exista cerca de 220 mil casos, com uma incidência de 36 mil casos a cada ano, afetando principalmente homens com idade superior a 50 anos (IBGE, 2016). Uma vez que a notificação da DP não é obrigatória os dados existentes da ocorrência da DP no país são subestimados, com apenas 0,0022% de internações relacionadas a DP, com a região nordeste sendo a terceira região do país mais afetada (SANTOS *et al.*, 2022). Com o aumento da expectativa de vida, esse número tende a crescer, consideravelmente. Estima-se que o número de pessoas com DP dobre no Brasil até 2030 (DORSEY *et al.*, 2007). Estudos mais recentes, mostram que esse número poderá ser bem mais expressivo, chegando a aproximadamente 600 mil pessoas com a doença no país (BOVOLENTA; FELÍCIO, 2016).

1.4. Fisiopatologia

A DP não está associada a apenas um fenômeno fisiopatológico, mas a uma série de disfunções associadas que culminam na morte dos neurônios dopaminérgicos, principalmente na substância negra *par compacta* (SNpc), no *lócus coeruleus* (LC) e em outras regiões, causando uma diminuição nos níveis de dopamina no corpo estriado, esse fenômeno responsável pela maioria dos sintomas clássicos da doença. Entretanto, são ainda observadas disfunções nos níveis de outras monoaminas como serotonina e noradrenalina (TEIVE, 2019). Além disso, diversos outros fatores estão relacionados como o dobramento inadequado de proteínas, a neuroinflamação, redução da atividade mitocondrial e questões envolvendo o sistema gastrointestinal (JANKOVIC; TAN, 2020).

Diversos eventos moleculares e celulares que incluem disfunção mitocondrial, lisossomal, estresse oxidativo, excitotoxicidade, processo inflamatório, mecanismos apoptóticos e autofágicos, transporte axonal e distúrbio no tráfego de vesículas e dobramento inadequado de proteínas estão associados à DP (ABYAD, 2020; PEREIRA; GARRETT, 2010; RAZA; ANJUM; SHAKEEL, 2019). Contudo, as causas da morte neuronal que ocorre na doença ainda não estão completamente elucidadas.

A neuroinflamação é considerada um dos principais achados na DP, responsável pela morte dos neurônios dopaminérgicos. Nesse processo, a gliose tem um papel fundamental sustentando a hipótese de que a mediação celular dos astrócitos e a micróglia possuem um papel fundamental no processo de morte celular em doenças neurodegenerativas (MACMAHON COPAS et al., 2021).

Os astrócitos são considerados as células mais abundantes no SNC, depois dos neurônios, possuem diversas funções fisiológicas, dentre elas o suporte metabólico, promoção da sinaptogênese e controle da permeabilidade da Barreira Hematoencefálica (BHE) (MACMAHON COPAS et al., 2021). Já foi visto que há a super expressão de astrócitos no cérebro de pacientes com DP (YU HERTZ et al., 1992). Além disso, foi visto que em doenças neurodegenerativas eles são responsáveis por estimular o perfil pró-inflamatório da micróglia, por meio da liberação de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 α , TNF- α , e C1q (CLARKE et al., 2018; MORGAN M. ROGERS-CARTER1 2; CHRISTIANSON1, 2017).

As micróglia são consideradas macrófagos, entretanto são residentes exclusivamente do SNC, possuem como função é de verificar alterações fisiológicas ou patológicas no cérebro e gerar uma resposta em relação a isso, em condições fisiológicas são responsáveis por removerem resíduos celulares. Entretanto, ao assumir um perfil inflamatório, elas assumem

uma morfologia ameboide e aumentam a sua capacidade fagocitária, acredita-se que seu perfil de reparo fisiológico também perde sua função durante o processo inflamatório (BELARBI et al., 2020; BADANJAK et al., 2021)

A deposição citoplasmática de proteínas não solúveis, como a α -sinucleína e ubiquitina, formando os chamados corpúsculos de Lewy é um dos principais achados da DP (BABA et al., 1998). A α -sinucleína é sintetizada em neurônios pré-sinápticos, não possui uma função específica conhecida em condições fisiológicas, mas acredita-se que possa haver uma relação com o complexo de Receptores Solúveis de Proteínas de Ligação a Fatores Sensíveis a N-etilmaleinamida (SNARE), que está associado à regulação e liberação de neurotransmissores na fenda pós-sináptica. Na DP essa proteína se encontra em concentrações excessivas, podendo estar relacionados com alguma disfunção no processo de degradação, uma vez que já foi visto que alguns mutações estão associados a essa condição, como A53T e A30P (DU; XIE; LIU, 2020)(IAKOVENKO et al., 2020).

1.5. Sintomas motores e não motores

A DP uma doença caracterizada pelo surgimento e progressão de diversos sintomas no decorrer do seu desenvolvimento, estes podendo ser classificados em sintomas motores e não motores. Os primeiros são considerados clássicos, pois o seu surgimento está associado diretamente com o diagnóstico da mesma, dentre eles os mais característicos são o tremor de repouso, bradicinesia, rigidez e instabilidade postural (JANKOVIC; TAN, 2020; JOST; REICHMANN, 2017). Esses sintomas estão associados com a diminuição dos níveis de dopamina no estriado. O grande problema é que estes sinais clássicos surgem quando há um dano cerebral considerável, surgindo após a perda de cerca de 80% dos neurônios dopaminérgicos, comprometendo significativamente a qualidade de vida dos pacientes, uma vez que, com a terapêutica disponível atualmente, tais danos são irreversíveis (SALAWU; DANBURAM; OLOKOBA, 2010); (REICH; SAVITT, 2019).

Em contrapartida, os sintomas não motores, embora inespecíficos, por vezes confundidos com outras condições, antecedem o surgimento dos sintomas motores em 1 a 10 anos (SALAWU; DANBURAM; OLOKOBA, 2010). A possível justificativa para essa manifestação precoce é que nem sempre esses sinais estão associados diretamente com níveis dopaminérgicos, parecendo haver uma relação com a disfunção nos níveis de serotonina, noradrenalina e acetilcolina, em diferentes regiões cerebrais. Dentre os mais comuns, estão os déficits olfatórios, distúrbios do sono REM (do inglês: *Rapid Eye Movement*), depressão,

ansiedade e problemas gastrointestinais (SCHAPIRA; CHAUDHURI; JENNER, 2017); (SVEINBJORNSDOTTIR, 2016); (REICH; SAVITT, 2019).

1.6. Tratamento

O tratamento para a DP é na grande maioria dos casos, farmacológico, e ainda é baseado no controle dos sintomas, contudo sem controle da progressão e evolução da doença. Esse pode variar de acordo com diversos aspectos, como o estágio em que o paciente se encontra e os tipos de sintomas apresentados (ARMSTRONG; OKUN, 2020).

Em fases iniciais, opta-se por estratégias menos agressivas, com o uso do Inibidores das Monoaminas Oxidases (IMAO), pois inibem a degradação de dopamina, aumentando as concentrações da mesma na fenda sináptica, diminuindo os efeitos causados pela redução da concentração de dopamina, dentre os mais utilizados, pode-se citar selegilina e a rasagilina (CABREIRA; MASSANO, 2019).

Em estágios mais avançados da doença, a opção mais utilizada é a reposição dos níveis de dopamina com uma associação entre levodopa, um precursor metabólico da dopamina e a carbidopa, que inibe a descarboxilação extracerebral da levodopa, fazendo com que mais levodopa esteja disponível para o cérebro e sofra subsequente conversão para dopamina. O grande problema desse esquema de tratamento, são os efeitos colaterais, além de aumentar alguns sintomas não motores como ansiedade e déficits olfatórios, geram um quadro chamado de discinesia, que é caracterizada por movimentos involuntários e descontrolados, que podem variar em sua gravidade comprometendo a qualidade de vida dos pacientes, dificultando a adesão ao tratamento (JANKOVIC; TAN, 2020); (ARMSTRONG; OKUN, 2020); (ELSWORTH, 2021); (CHURCH, 2021).

Algumas outras estratégias tem sido utilizadas na tentativa de melhorar a qualidade de vida dos pacientes, uma vez que o tratamento convencional leva, a longo prazo, ao surgimento de sintomas tão comprometedores quanto a própria doença. Um deles é um procedimento cirúrgico denominado *Deep Brain Stimulation* (DBS) que consiste na implantação de eletrodos para modular os estímulos elétricos na região do cérebro afetada pela doença. Tal procedimento é indicado em alguns casos específicos de pacientes que possuem flutuações significativas nos níveis dopaminérgicos, dificultando o controle pelas terapias farmacológicas disponíveis (JANKOVIC; TAN, 2020); (OBESO et al., 2017).

1.7. Modelos Animais da Doença de Parkinson

O avanço da DP no Brasil e no mundo deixa claro a necessidade do desenvolvimento de pesquisas mais arrojadas na busca por novas terapias, que reduzam a perda de neurônios dopaminérgicos, e os consequentes sintomatologia motora e não motora. No entanto, essa busca por novas terapias neuroprotetoras tem se mostrado desafiadora, no sentido de traduzir resultados positivos de estudos pré-clínicos em clínicos (LANG, 2006), devido a imprecisão dos modelos pré-clínicos em englobar a fisiopatologia da doença a nível dopaminérgico e não dopaminérgico e seu caráter progressivo e crônico (OLANOW; KIEBURTZ; SCHAPIRA, 2008). Esse quadro, deixa clara a necessidade de se revisitar e repensar os modelos animais utilizados na busca de novas substâncias neuroprotetoras, bem como no estudo dos mecanismos envolvidos na morte neuronal da doença, que ainda não são conhecidos.

Os modelos animais podem ser classificados em três grupos de acordo com critérios farmacológicos, comportamentais e bioquímicos. A validade preditiva representa os modelos com isomorfismo farmacológico, com a geração de sinais e sintomas não totalmente relacionado à doença. A validade de face assegura similaridade entre o modelo e doença em relação à sintomatologia, porém não garante os mesmos mecanismos fisiopatológicos. Já a validade de constructo engloba os modelos que cumprem os critérios de face e preditiva, compartilhando isomorfismo farmacológico, sintomatologia e os mesmos mecanismos fisiopatológicos relacionados a doença (FRIES; DA SILVA MAGALHÃES, 2010). Para o estudo da doença, atualmente são utilizados modelos animais geneticamente modificados ou expostos a toxinas que seletivamente destroem o sistema catecolaminérgico.

Os modelos genéticos envolvem a utilização de animais com deleções, multiplicações e outras alterações de genes reportadamente envolvidas na fisiopatologia da DP. Contudo, o distúrbio de caráter causal genético engloba apenas uma pequena parcela dos casos da doença no mundo. Assim, esses modelos não contemplam os casos idiopáticos que representam a maior parcela de ocorrências no mundo (SIMON; TANNER; BRUNDIN, 2020).

Os modelos da doença desenvolvidos utilizando toxinas mais utilizados nas últimas décadas, incluem a 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA), 1- metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidroperdidina (MPTP), paraquat e rotenona, sendo os dois primeiros os mais bem caracterizados.

A 6-OHDA é um análogo da dopamina e foi o primeiro modelo de DP empregado, ela não cruza a barreira-hematoencefálica portanto é utilizada através de injeções intracerebrais por meio de cirurgia estereotáxica (GRANDI; DI GIOVANNI; GALATI, 2018). Uma vez no cérebro, a 6-OHDA é transportada pelo transportador de dopamina (DAT) para o interior dos neurônios dopaminérgicos onde inibe o complexo I e IV da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, levando a um quadro de estresse oxidativo, excitotoxicidade glutamatérgica e inflamação, levando a morte seletiva dos neurônios dopaminérgicos (ZENG; GENG; JIA, 2018). A 6-OHDA produz um modelo com uma lesão robusta e de alta reprodutibilidade, induzindo os surgimentos de déficits motores, olfatórios, gastrointestinais e na memória. Apesar de ser o modelo mais utilizado, possui limitações, uma vez que os déficits motores e não motores ocasionados pela 6-OHDA não são progressivos e surgem em conjunto, bem como essa toxina não é capaz de reproduzir todos os mecanismos fisiopatológicos da patologia, parecendo não afetar outras regiões cerebrais além do estriado e substância negra, além de não induzir a produção de agregados proteicos e não interagir com a α -sinucleína (SALARI; BAGHERI, 2019; ZENG; GENG; JIA, 2018).

O MPTP é uma toxina que atravessa a barreira-hematoencefálica, podendo ser administrado por vias periféricas. Uma vez no cérebro é metabolizado à MPP⁺ pelos astrócitos e transportada ao interior de neurônios dopaminérgicos pelo DAT, onde inibe o complexo I da cadeia transportadora de elétrons causando déficit energético, estresse oxidativo, excitotoxicidade glutamatérgica e inflamação (GRANDI; DI GIOVANNI; GALATI, 2018; TRIGO-DAMAS; DEL REY; BLESÁ, 2018). O MTPT produz um modelo com degeneração seletiva dos neurônios dopaminérgicos em camundongos, não apresentando o mesmo sucesso quando injetado em ratos, levando a déficits motores, déficits gastrointestinais, olfatório e de memória. Entretanto, esses déficits não são progressivos e ainda não está completamente esclarecido se o modelo crônico de exposição ao MPTP que acarreta sintomas não motores é capaz de induzir déficits motores substanciais, e o único protocolo de exposição que gerou déficits olfatórios se deu por meio de injeções intranasais, assim tal déficit pode refletir um prejuízo na mucosa nasal e o MTPT também não interage com a α -sinucleína (MEREDITH; SONSALLA; CHESSELET, 2008; SALARI; BAGHERI, 2019; TITOVA et al., 2017; VINGILL; CONNOR-ROBSON; WADE-MARTINS, 2018; ZHANG et al., 2017a).

O modelo de DP induzido por rotenona (figura 1) foi usado a primeira vez em 2000, por Betarbet e colaboradores, devido sua capacidade de atravessar facilmente a barreira hematoencefálica, a sua alta lipossolubilidade e se acumular em organelas intracelulares, como

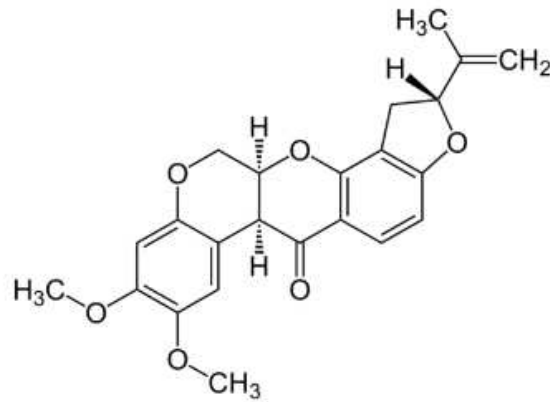
as mitocôndrias. Age como um potente inibidor do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial, por inibir a enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo desidrogenase (NADH), levando à morte neuronal (DROLET et al., 2009; GREENAMYRE et al., 2011; JOHNSON; BOBROVSKAYA, 2015; MEREDITH; SONSALLA; CHESSELET, 2008; ZHANG et al., 2017b).

A inibição do complexo I da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial ocasionada pela exposição a esse pesticida induz uma cascata de eventos relacionada a estresse oxidativo e inflamação. O déficit mitocondrial acarreta morte celular por crise bioenergética, prejudicando o armazenamento da dopamina em vesículas; por isso, na exposição crônica à rotenona, observa-se inicialmente um aumento dos níveis de DA, espécies reativas de oxigênio (EROs) e óxido nítrico, formando um quadro de estresse oxidativo e peroxidação lipídica, gerando danos no DNA (DUTY; JENNER, 2011; LEVY; MALAGELADA; GREENE, 2009; WU; JOHNSON, 2007). A incapacidade da produção de ATP também acarreta a entrada excessiva de cálcio na célula, reação microglial e ativação de astrócitos (BABA et al., 1998; BERNDT; HOLZHÜTTER; BULIK, 2013; VENDEROVA; PARK, 2012).

A rotenona também parece elevar os níveis de glutamato deixando os neurônios dopaminérgicos mais vulneráveis a excitotoxicidade glutamatérgica (SONIA ANGELINE et al., 2012; WU; JOHNSON, 2007), além do acúmulo de α -sinucleína com formação de corpúsculos de Lewy (BETARBET et al., 2000; YUAN et al., 2015), e acúmulo de tubulina intracelular e ativação de caspases, levando a ativação de mecanismos apoptóticos (SARAVANAN; SINDHU; MOHANAKUMAR, 2005; SCHOBER, 2004). Isso tudo resulta na morte dos neurônios dopaminérgicos na Substância negra e estriado (BETARBET et al., 2000) e perda de neurônios noradrenérgicos no *locus coeruleus* (DUTY; JENNER, 2011), resultando em um quadro de alterações motoras (ALAM; SCHMIDT, 2002; LEWIS et al., 2011) e não motoras (JOHNSON; BOBROVSKAYA, 2015; MORAIS et al., 2012).

Frente ao exposto, fica claro que o modelo de parkinsonismo induzido pela rotenona compartilha mecanismos fisiopatológicos com a DP, cumprindo critérios de validade de face e preditiva e constructo, possuindo assim o maior grau de validação dentro dos critérios de classificação para modelos animais.

Figura 1 – Estrutura química da rotenona.



Fonte: (ALMEIDA, 2010).

1.8.Sistema Purinérgico e os Receptores P2X₇

A adenosina trifosfato, ou simplesmente ATP, possui um importante papel na geração de energia química por meio de sua hidrólise, um processo altamente exergônico, mas sua atuação não se limita a geração de energia nos processos bioquímicos. (PATRITTI-CRAM et al., 2021). Os farmacologistas começaram a observar que o papel do ATP não se limitava apenas a esses processos energéticos, mas que possuíam atividade farmacológica. E então, nos anos 70, Burnstock e colaboradores começaram a investigar e classificar os receptores purinérgicos, hoje sabe-se que existem dois tipos de receptor pelos quais o ATP pode agir, são os receptores P2Y, subdivididos em P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃ e P2Y₁₄. Que são receptores acoplados à proteína G e os receptores do tipo P2X divididos em 7 subtipos P2X₁, P2X₂, P2X₃, P2X₄, P2X₅, P2X₆ e P2X₇, são receptores acoplados à canais iônicos (BURNSTOCK, 1976) (BURNSTOCK, 2018) (LINDEN; KOCH-NOLTE; DAHL, 2019)(VON KÜGELGEN, 2021).

Os receptores P2X₇, como dito anteriormente, são acoplados a canais iônicos e foram descritos pela primeira vez, em 1996, por Buell e colaboradores. Eles identificaram três variações, das quais somente duas estão presentes em humanos, que são as subunidades P2X₇A e P2X₇B, a variante K, que só está presente em roedores. Esses receptores possuem algumas peculiaridades que os distinguem dos outros da mesma família. Por exemplo, só são ativados em concentrações muito superiores de ATP, quando comparados a outros receptores purinérgicos e, por serem canais, permitem a passagem de íons como K⁺, Na⁺ e Ca²⁺, mas

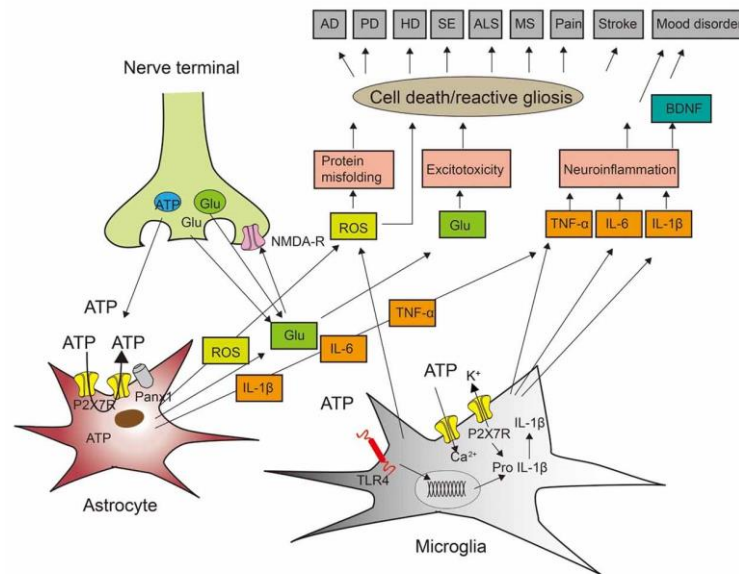
quando estimulados por um longo período, se comportam como poros, permitindo a entrada de moléculas de tamanho variado (NORTH; BUELL, 1996)(ILLES, 2020).

A ativação dos receptores purinérgicos P2X₇, exerce um papel importante em diversos processos inflamatórios. Primeiro, foi visto que a maioria das células envolvidas no sistema imune, como as células dendríticas, osteoclastos, micróglia e as células da glia, possuem receptores P2X₇ em sua superfície e estes são ativadas com grandes concentrações de ATP, causando uma despolarização, por influxo de Ca²⁺ (Figura 2). Já se sabe que as concentrações de ATP são aumentadas durante o dano celular e os receptores P2X₇ são sensíveis à essa elevação. Além disso, já foi visto que os receptores possuem um papel importante, pois mediam a liberação de interleucinas pró-inflamatórias como IL-1 β , que é liberada na sua forma imatura e via inflamassoma NLRP3, que é um processo mediado por efluxo de K⁺ ATP dependente. Esses processos irão desencadear o aumento do perfil inflamatório, além de elevar as concentrações das espécies reativas de oxigênio, responsáveis por causar estresse oxidativo e morte celular (CALZAFERRI et al., 2020) (ADINOLFI et al., 2017) (KARMAKAR et al., 2016) (RIBEIRO et al., 2019).

A ativação dos receptores P2X₇, está envolvida na fisiopatologia de diversas doenças neurodegenerativas. Já foi visto que pacientes com DP possuem um estado de micróglia ativado e um perfil de citocinas pró-inflamatórias aumentadas no fluido cérebro-espinhal, como o IL-1 β e o TNF- α (ILLES, 2020)(DAN-DAN et al., 2021). Além disso, existe uma relação entre as concentrações de IL-1 β e uma maior propensão a morte dos neurônios dopaminérgicos, o que é considerado um dos principais achados da DP (SOLINI et al., 2020) (GLASER et al., 2021).

A relação entre o aumento da atividade dos receptores P2X₇ e os processos fisiopatológicos envolvidos em doenças neurodegenerativas levou a pesquisas no bloqueio desses receptores. Existem diversos antagonistas dos receptores P2X₇, dentre eles o *Brilliant blue g* (BBG), KN62 e AZ11645373, algumas dessas moléculas tem origem natural, já outras foram desenhadas com esse propósito, de antagonizar os receptores purinérgicos (ADINOLFI et al., 2017)(DAYEL; EVANS; SCHMID, 2019)(DRILL et al., 2021). Diversos trabalhos já demonstraram que o bloqueio dessa via é capaz de atenuar os processos inflamatórios em diversos modelos animais, de doenças neurodegenerativas, depressão ou mesmo câncer, que são condições que envolvem um processo inflamatório intenso (OLIVEIRA-GIACOMELLI et al., 2019)(KARMAKAR et al., 2016)(DRILL et al., 2021).

Figura 2 – Atividade dos receptores P2X₇ no Sistema Nervoso Central (SNC)



Fonte: (ZHAO, 2021).

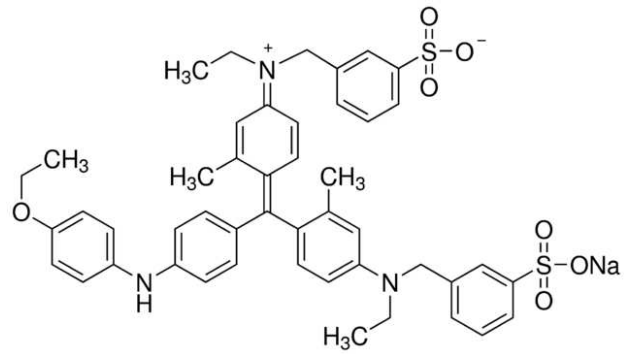
1.9.BBG e o Antagonismo dos Receptores P2X₇

O *Brilliant Blue G* (BBG) é um corante que vem sendo utilizado na indústria alimentícia, há bastante tempo, nas preparações de doces, cereais e até mesmo bebidas alcoólicas (Figura 3). Uma outra aplicação do corante, foi na pesquisa, pois o mesmo é um dos componentes do reagente de Bradford, utilizado na quantificação proteica. Entretanto, foi visto que o corante possuía um mecanismo farmacológico, funcionando como antagonista dos receptores P2X₇, sendo possível, a partir deste achado, investigar a influência do bloqueio dessa via em diversos protocolos experimentais, como modelos animais de doenças neurodegenerativas e depressão (VON MUECKE-HEIM et al., 2021) (ZHOU et al., 2019) (FERREIRA et al., 2016)(VON MUECKE-HEIM et al., 2021).

Alguns trabalhos já demonstram o potencial do antagonismo dos receptores P2X₇, com a utilização do BBG, em modelos animais de Parkinsonismo. Carmo e colaboradores, em 2014, por meio de um protocolo de hemiparkinsonismo utilizando 6-OHDA, demonstrou que a administração de BBG por via intraperitoneal 2 horas após a cirurgia, foi capaz de diminuir o processo inflamatório, através da diminuição microglial, causado pelo modelo e proteger contra

diversas alterações comportamentais (CARMO et al., 2014).

Figura 3 – Estrutura molecular do BBG



Fonte: (FRIEDLE; MARJORIE; CURET, 2010).

2 OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Estudar o efeito neuroprotetor do bloqueio dos receptores P2X7 no parkinsonismo experimental induzido pela rotenona em ratos.

2.2. Objetivos Específicos

- Reproduzir o modelo de parkinsonismo em ratos *Wistar*, pela administração intraperitoneal subcrônica de rotenona, induzindo alterações motoras, não motoras e dano neuronal.

- Nos animais tratados com BBG avaliar:

- Déficits motores, déficits olfatórios, comportamento tipo-depressivo, déficit de memória;

- Neurodegeneração dopaminérgica, microgliose e astrogliose.

3 METODOLOGIA

3.1. Animais

Foram utilizados ratos *Wistar* albinos (*Rattus norvegicus*) "specific pathogen free" (SPF), machos, pesando entre 220-250 gramas, provenientes do biotério do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) da Universidade Federal do Ceará (UFC). Os animais foram mantidos em gaiolas micro isoladas, com ciclo claro/escuro de 12/12 horas e alimentados com ração peletizada padrão e água *ad libitum*. No que se refere aos cuidados com os animais, este estudo seguiu os princípios éticos da experimentação animal, estabelecidos pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA) e só teve início após aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) UFC/NPDM, sob o número 9680310818.

3.2. Drogas

As seguintes substâncias foram utilizadas: Rotenona (Sigma Aldrich, EUA), *Brilliant Blue G* (Sigma Aldrich, EUA), Quetamina (König, Argentina) e Xilazina (König, Argentina). Os demais reagentes foram de grau analítico.

3.3 Protocolo Experimental

Para a indução do parkinsonismo, os animais receberam 2,75mg/Kg de rotenona por via intraperitoneal (i.p), diluída em 2% de DMSO em óleo de girassol, por 5 dias consecutivos com 2 dias de intervalo, somando 21 dias de aplicação. O presente modelo foi recentemente padronizando no Laboratório de Neurociências e Comportamento (LNC) e engloba sintomas olfatórios pré-motores que foram usados como marco para o início do tratamento visando neuroproteção. Esse protocolo é uma adaptação do modelo proposto por Cannon e colaboradores (2009), em que a aplicação intraperitoneal de rotenona por 21 dias consecutivos causa pouca ou nenhuma toxicidade periférica, a adaptação para um modelo com intervalos entre as aplicações visa diminuir a mortalidade gerada pela rotenona.

Para o estudo do efeito do bloqueio dos receptores P2X₇ em ratos parkinsonianos foi

administrado 50mg/kg de BBG diluído em solução salina 9%, após sete dias de administração da rotenona, por via i.p. O 7º dia marca o surgimento dos sintomas pré motores induzidos pela rotenona (déficit olfatório) e foi utilizado como marco para investigar a ação neuroprotetora do BBG num estágio “*prodromal-like*”.

Foram utilizados 80 animais divididos em quatro grupos experimentais, cada um com 20 animais, de acordo com a tabela 1. O grupo controle recebeu o veículo da rotenona (2% de DMSO em óleo de girassol, 1ml/Kg) e o veículo do BBG (solução salina 9%) por via intraperitoneal (i.p.), o grupo controle tratado recebeu o veículo da rotenona e 50mg/kg de BBG (i.p.), o grupo rotenona recebeu 2,75 mg/Kg de rotenona (i.p.) e o veículo do BBG, e o grupo rotenona tratado recebeu 2,75 mg/Kg de rotenona (i.p.) e 50mg/Kg de BBG (i.p.).

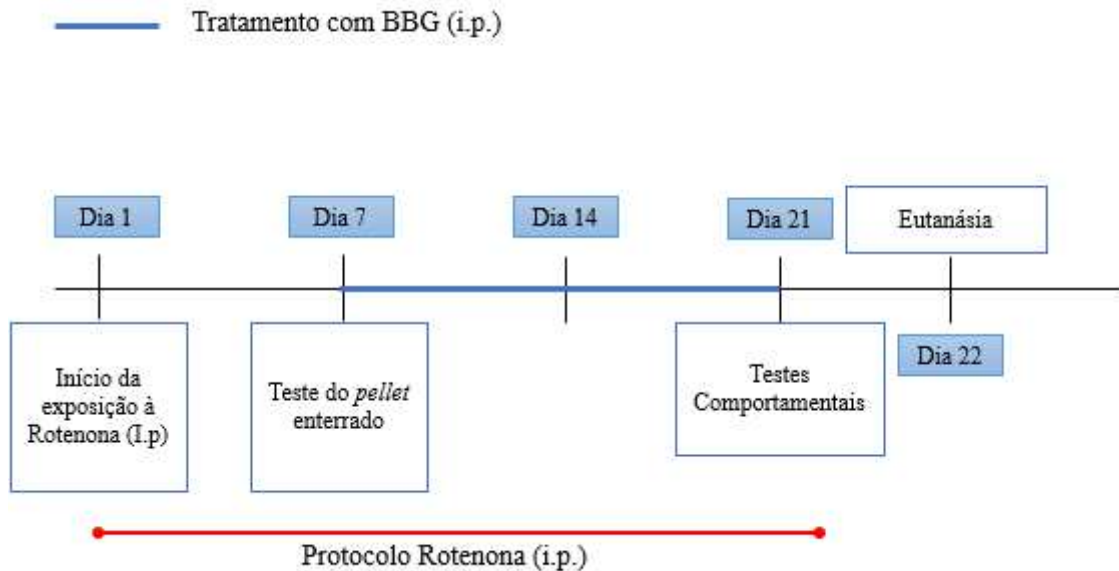
Tabela 1: Organização dos Grupos Experimentais

Grupo	Protocolo
Controle	Veículo da rotenona (2% de DMSO em óleo de girassol, 1ml/Kg) + veículo do BBG (solução salina 9%) (i.p)
Controle Tratado	Veículo da rotenona (2% de DMSO em óleo de girassol, 1ml/Kg) + 50mg/Kg de BBG (i.p)
Parkinsoniano	2,75 mg/Kg de rotenona (i.p.) + veículo do BBG (solução salina 9%) (i.p)
Parkinsoniano Tratado	2,75 mg/Kg de rotenona (i.p.) + 50mg/Kg de BBG (i.p)

Após 21 dias de administração de rotenona, os animais foram submetidos à testes motores, olfatórios, de comportamento tipo-depressivo e memória divididos em dois protocolos. No protocolo I, os animais foram submetidos ao teste do *rotarod*, *pellet* enterrado e eutanasiados por decapitação para retirada das áreas cerebrais para realização da dosagem de monoaminas por HPLC. No protocolo II, os animais foram submetidos aos testes de preferência por sacarose, campo aberto e labirinto em Y e parte dos animais foram eutanasiados por decapitação para retirada das áreas cerebrais para realização de futuros testes bioquímicos e

outros perfundidos com paraformaldeído 4% para realização da avaliação histopatológica (Figura 1).

Figura 1: Desenho do Protocolo Experimental



3.4 Testes Comportamentais

Todos os testes comportamentais ocorreram entre às 10 e às 17 horas, em condições de luz vermelha de baixa intensidade, com temperatura e umidade controladas. O comportamento foi captado em vídeo e analisado em tempo real, com o software ANY *maze* (Stoelting Co. EUA).

3.4.1 Teste do Campo Aberto

O teste do campo aberto avalia a atividade locomotora e exploratória dos animais. O campo aberto consiste em uma arena quadrada de acrílico preto (80 x 80 cm). No teste, o animal foi colocado na arena e deixado para explorar o ambiente por cinco (5) minutos, sendo registrado o número de explorações horizontais (*crossings*), o número de explorações verticais (*rearings*) e a velocidade média (WALSH; CUMMINS, 1976).

3.4.2 Teste do Rotarod

A fim de avaliar a coordenação motora e as alterações de equilíbrio dos animais, foi realizado o teste do *rotarod*. Os animais foram treinados antes do início do tratamento em duas sessões de 5min, com intervalo de 10 min entre cada sessão, em condição de aceleração de 4 a 40 rpm e um dia anterior ao teste em uma sessão de 120s em condição de velocidade constante de 20 rpm. No teste, foi permitido ao animal se mover no aparato, em condição de velocidade constante de 20 rpm, sendo o tempo para queda registrado, com tempo de permanência máxima de 120s (PADOVAN-NETO et al 2009.).

3.4.3 Teste do Pellet de comida enterrado

A avaliação da detecção olfatória de cheiros voláteis dos animais foi avaliada por sua habilidade de localizar um Pellet de comida (o Pellet normalmente utilizado na sua alimentação) enterrado na maravalha da gaiola do animal. Anteriormente ao teste, os animais foram mantidos em jejum por 16 horas, com livre acesso a água. O teste consiste em enterrar um *pellet* de comida abaixo de 3cm de maravalha. Foi, então, mensurado o tempo, em segundos, entre a introdução do animal na gaiola e o momento em que o animal tocar o *pellet* de comida com as duas patas dianteiras, com a máxima de permanência de 300 segundos (ALBERTS et al, 1971).

3.4.4 Discriminação olfatória

A capacidade dos animais de discriminar cheiros foi avaliada pelo teste de discriminação olfatória. Em geral, ratos adultos saudáveis são capazes de discriminar entre os dois compartimentos, tendo preferência pelo compartimento impregnado com o seu próprio odor em relação ao local com odor neutro (YANG; CRAWLEY, 2009). Assim, os animais foram colocados durante 5 min em uma caixa dividida em dois compartimentos idênticos, separados por uma porta aberta, de forma que possam escolher entre um compartimento contendo a maravalha retirada da caixa previamente ocupada por ele e outro contendo maravalha nova. O tempo gasto pelo rato em cada compartimento será registrado (PREDIGER et al., 2006; TADAIESKY et al., 2008).

3.4.5 Teste de preferência por Sacarose

O teste da preferência por sacarose é utilizado como uma medida de anedonia em roedores, já que esses em quadros depressivos tendem a diminuir a preferência pelo consumo de sacarose. O teste consiste em ofertar duas garrafas aos animais, uma contendo solução de sacarose à 2% e outra água, sendo as garrafas pesadas antes de serem apresentadas aos ratos e 24 horas depois. O percentual de consumo de sacarose foi então calculado usando a equação: % de preferência por sacarose = ingestão de sacarose x 100 / ingestão total. Os animais passaram por um teste basal, permanecendo no experimento apenas os ratos que apresentaram uma preferência por sacarose superior a 60% em relação ao consumo de 24 horas (PAPP et al., 1991; POTHION et al., 2004).

3.4.6 Teste do Labirinto em Y

Esse teste objetiva avaliar a memória operacional e o aprendizado. No teste, o animal foi colocado no labirinto em forma de Y e poder alternar espontaneamente as entradas nos outros braços durante 8 (oito) minutos. O número total de entradas em cada braço, bem como a sequência de entradas, foi registrado. As informações foram então analisadas para determinar o número de entradas nos braços sem repetição por meio de porcentagem de alternância entre os mesmos. O resultado foi expresso em porcentagem e obtido através de uma fórmula: Alternações espontâneas = (Número de acertos/ Número total de entradas - 2) x 100 (STONE et al., 1991).

3.5 Dosagem de Dopamina por HPLC

Foram utilizados os sobrenadantes dos homogenatos preparados dos tecidos do hipocampo, corpo estriado e bulbo olfatório para a detecção dos níveis de catecolaminas utilizando o equipamento de HPLC (cromatografia líquida de alto desempenho) por detecção eletroquímica. Os tecidos foram sonicados em ácido perclórico (HClO₄) por 30 segundos e o homogenato foi colocado em tubos *Eppendorf* para centrifugação por 15 minutos em centrífuga refrigerada a 15000 rpm. Uma alíquota de 20µL do sobrenadante foi então injetada no

equipamento de HPLC. Foi utilizada uma coluna CLC-ODS(M) com comprimento de 25cm, calibre 4,6cm e diâmetro da partícula de 03 μm , da Shimadzu Japão. A fase móvel utilizada foi composta por tampão ácido crítico 0,163M, pH 3,0 contendo ácido octanosulfônico sódico 0,69 M (SOS) como reagente formador do par iônico, acetonitrila 4% v/v e tetrahidrofurano 1,7%v/v. Dopamina (DA) foi eletroquimicamente detectada usando um detector amperométrico (AGUIAR, 2006).

3.6 Imunomarcção para Tirosina hidroxilase

A Tirosina hidroxilase (TH) é um marcador molecular de neurônios dopaminérgicos. A detecção imuno-histoquímica foi realizada em relação ao corpo estriado e a substância negra. Para examinar a extensão da deservação presente na substância negra, a imunorreatividade à TH foi avaliada sobre o lado lesionada e não lesionada. Os cortes foram lavados três vezes com 0,05 M Tris buffer (TB, pH 7.6), o bloqueio da peroxidase endógena foi feito com H_2O_2 a 3% em metanol a 10% em TB durante 15 min e depois de lavadas três vezes em TB. Foram pré-incubadas durante 30 minutos com soro de cabra normal a 5% (NGS) em Triton 0,3%, os cortes foram incubados com o anticorpo primário (1:500, anti-TH; Calbiochem, Nottingham, United Kingdom) em 2% NGS/TB durante a noite a 4°C. Após três enxaguadas com TB, os cortes foram incubados com um anticorpo secundário (biotinylated goat anti-rabbit IgG 1:200, DAKO) por 2 horas, enxaguados novamente três vezes com TB e revelados com diaminobenzidina 0,05% em 0.03% H_2O_2 por 5 min. Após lavagem com água destilada, os cortes foram montados em meio aquoso e cobertos com lamínula para posterior examinação. Os cortes foram analisados utilizando-se o programa *Image J* (ALVES et al., 2008; HINKLE et al., 2012).

3.7 Imunomarcção para Iba – 1

As micróglia são células imunocompetentes do cérebro. Para a verificação da presença e ativação destas células (microgliose) foi empregado o marcador de micróglia iba-1. A marcação para iba-1 foi realizada em fatias (10 μm de espessura e espaçamento de 50 μm) representativas do estriado. As fatias foram lavadas três vezes por 5 minutos em PBS, sendo o bloqueio da peroxidase endógena feito com H_2O_2 1,05% em metanol 10% em PBS, durante 40 minutos a temperatura ambiente (TA). Posteriormente, foram lavadas 3 vezes por 5 minutos em

PBS e bloqueadas as proteínas endógenas com uma solução bloqueadora (10% de soro de cavalo e 1% de Triton X-100 em PBS) por 2 horas a TA. Na sequência, as fatias foram incubadas no anticorpo primário anti-iba-1 diluído na solução bloqueadora (rabbit polyclonal, 1:300; WAKO, Japão) *overnight* a 4°C. As fatias foram então lavadas 3 vezes por 10 minutos em PBS, sendo em seguida incubadas com polímero marcado com HRP conjugado com anticorpos anti-mouse e anti-rabbit (Dako EnVision + Dual Link System-HRP, Dako) por 30 minutos horas a temperatura ambiente, e lavados novamente 3 vezes por 5 minutos com PBS. A marcação foi revelada com 3,3'-diaminobenzidina (DAB Peroxidase Substrate Kit; Dako). A reação foi interrompida, lavando-se as lâminas em água destilada. Por fim, após secagem, as lâminas foram mergulhadas em xilol e montadas com entellan (Merck, Alemanha) (JEONG *et al.*, 2013).

Para a quantificação da imunorreatividade para iba-1, as lâminas foram visualizadas em um microscópio (Nikon Elipse E200) com aumento de 100x. Foram selecionadas 3 fatias de cada animal e três áreas em cada fatia, aleatoriamente, e a quantificação semi-quantitativa da densidade óptica foi realizada em todas as imagens utilizando o software *Image J* (NIH, Bethesda, MD, EUA). A densidade óptica final de cada imagem foi dada pela densidade do branco subtraído da densidade da imagem total. Foi calculada a média dos 3 valores por animal, e calculada a média dos valores obtidos para o grupo controle, e os demais valores foram calculados como percentagem desse valor.

3.8 Imunomarcção para GFAP

A avaliação da astrogliose foi feita pela imunomarcção com o anticorpo para GFAP (*Glial fibrillary acidic protein*). A marcação para GFAP foi realizada em fatias (10 µm de espessura e espaçamento de 50 µm) representativas do estriado. As fatias foram lavadas três vezes por 5 minutos em PBS, sendo o bloqueio da peroxidase endógena feito com H₂O₂ 1,05% em metanol 10% em PBS, durante 40 minutos a temperatura ambiente (TA). Após lavar 3 vezes por 5 minutos em PBS e bloquear as proteínas endógenas com uma solução bloqueadora (10% de soro de cavalo e 1% de Triton X-100 em PBS) por 2 horas a TA. Após, as fatias foram incubadas no anticorpo primário anti-GFAP diluído na solução bloqueadora (goat, 1:200; Sigma-Aldrich) *overnight* a 4°C. As fatias foram então lavadas 3 vezes por 10 minutos em PBS, sendo em seguida incubadas com um anticorpo secundário diluído na solução de bloqueio (rabbit anti-goat IgG, 1:200; Sigma-Aldrich) por 2 horas a temperatura ambiente (TA) e lavados novamente 3 vezes por 5 minutos com PBS. O método avidina-biotina (ABC) (Vector Labs) foi

utilizado por 30 minutos a TA para a amplificação do sinal. A marcação foi revelada com 3,3'-diaminobenzidina (DAB Peroxidase Substrate Kit; Dako). A reação foi interrompida, lavando-se as lâminas em água destilada. Por fim, após secagem, as lâminas foram mergulhadas em xilol e montadas com entellan (Merck, Alemanha) (BASCO *et al.*, 1981).

Para a quantificação da imunorreatividade para GFAP, as lâminas foram visualizadas em um microscópio (Nikon Elipse E200) com aumento de 100x. Foram selecionadas 3 fatias de cada animal e três áreas em cada fatia, aleatoriamente, e a quantificação semiquantitativa da densidade óptica foi realizada em todas as imagens utilizando o software *Image J* (NIH, Bethesda, MD, EUA). A densidade óptica final de cada imagem foi dada pela densidade do branco subtraído da densidade da imagem total. Foi calculada a média dos 3 valores por animal e calculada a média dos valores obtidos para o grupo controle, e os demais valores foram calculados como percentagem desse valor.

3.9 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas pelo Software GraphPad Prism 6.01. Para a análise estatística foi inicialmente realizado o teste de normalidade Shapiro Wilk para verificar se os dados apresentavam distribuição normal a fim de determinar o uso de testes paramétricos ou não paramétricos. Os dados dos testes que apresentaram resultados paramétricos foram analisados utilizando a análise de variância (ANOVA), seguido do teste post hoc de Tukey ($p < 0,05$) e os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. Os dados de testes não paramétricos foram analisados utilizando o teste de Kruskal-Wallis seguidos de post hoc de Dunn e expressos em mediana e intervalo interquartil.

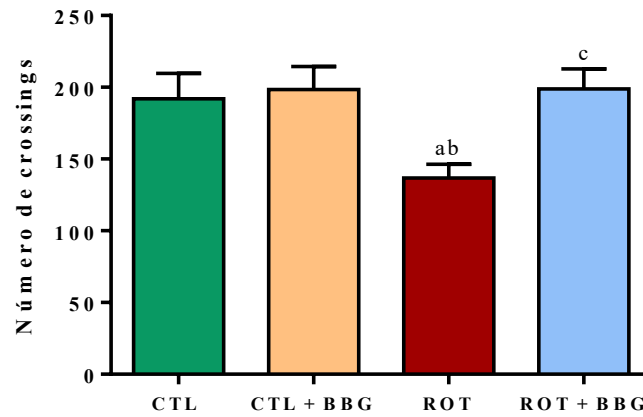
4 RESULTADOS

4.1 BBG protegeu ratos parkinsonianos contra déficits motores.

No teste do campo aberto, foi observada uma diminuição do número de explorações horizontais (*crossings*) dos animais parkinsonianos, quando comparado aos controles (CTL: $191,9 \pm 17,72$; CTL BBG: $198,50 \pm 15,97$; ROT: $136,7 \pm 9,71$; ROT BBG: $198,8 \pm 13,94$; $p < 0,05$), confirmando que o modelo é capaz de causar danos motores, após 21 dias de exposição (Figura 2). O BBG protegeu contra danos motores causados pela administração de rotenona, sendo possível verificar que houve um aumento significativo do número de *crossings* dos animais que receberam BBG em comparação ao grupo que recebeu rotenona. O mesmo resultado foi obtido na análise da exploração vertical dos animais (CTL: $12,4 \pm 1,59$; CTL BBG: $12,1 \pm 1,95$; ROT: $4,80 \pm 1,78$; ROT BBG: $7,64 \pm 1,53$; $p < 0,05$), por meio da quantificação do número de *rearings* e os animais tratados com BBG também apresentaram uma melhora significativa em relação aos parkinsonianos (Figura 3).

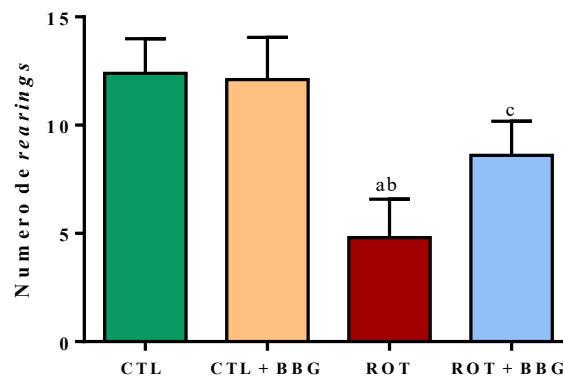
Também foi observado que os animais parkinsonianos apresentaram uma diminuição significativa da velocidade média, um indicativo de bradicinesia. O tratamento com BBG protegeu os animais desses déficits induzindo um aumento significativo da velocidade média em relação aos animais parkinsonianos (CTL: $0,176 \pm 0,022$ m/s; CTL BBG: $0,200 \pm 0,026$ m/s; ROT: $0,061 \pm 0,006$ m/s; ROT BBG: $0,146 \pm 0,027$ m/s; $p < 0,05$) (Figura 4).

Figura 2. Efeitos do BBG sobre a atividade locomotora horizontal em ratos parkinsonismos no teste no campo aberto.



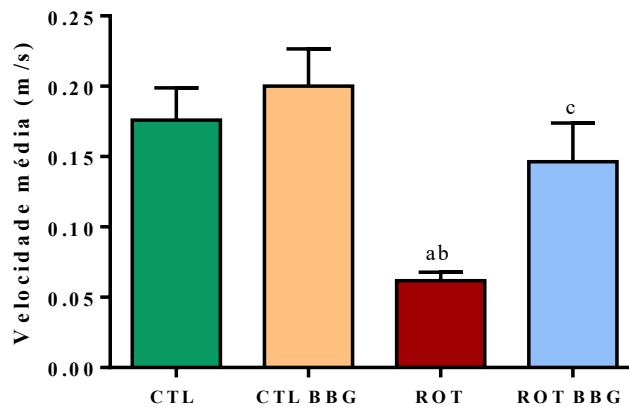
Os animais foram deixados para explorar o aparato do campo aberto por 5 minutos e o número de crossings foi contabilizado através do software Any-maze, n =10. os valores estão representados como média ± EPM. a vs. CTL, b vs CTL BBG; $p < 0,05$, ANOVA de uma via e teste de Tukey.

Figura 3. Efeitos do BBG sobre a atividade locomotora vertical em ratos parkinsonismos no teste no campo aberto.



Os animais foram expostos à rotenona (2,75mg/Kg) durante 21 dias e tratados com BBG (50mg/Kg) a partir do sétimo dia de exposição. Após o 21 dia animais foram deixados para explorar o aparato do campo aberto por 5 minutos e o número de rearings foi contabilizado através do *software* Any-maze, n =10. os valores estão representados como média ± EPM. a vs. CTL, b vs CTL BBG; $p < 0,05$, ANOVA de uma via e teste de Tukey.

Figura 4. Efeitos do BBG sobre a velocidade média em ratos parkinsonismos no teste no campo aberto.

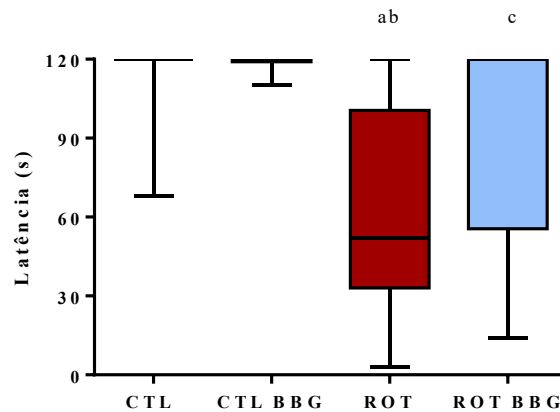


Os animais foram expostos à rotenona (2,75mg/Kg) durante 21 dias e tratados com BBG (50mg/Kg) a partir do sétimo dia de exposição. Após o 21 dia foram deixados para explorar o aparato do campo aberto por 5 minutos e a velocidade média foi medida através do *software* Any-maze, n =10. os valores estão representados como média \pm EPM. a vs. CTL, b vs CTL BBG, c vs ROT; $p < 0,05$, ANOVA de uma via e teste de Tukey.

4.2 Efeito do BBG sobre a coordenação motora dos animais (teste do *rotarod*).

Foi observado uma diminuição no tempo de latência para queda dos animais parkinsonianos quando comparados ao grupo controle e controle tratado. Os resultados obtidos no teste do *rotarod* mostram que o tratamento com BBG é capaz de prevenir o déficit na coordenação motora induzido pela rotenona em ratos, aumentando o tempo de latência para queda (CTL: mediana: 120s quartil 25: 120s quartil 75: 120s; CTL BBG: mediana: 120s quartil 25: 119s quartil 75: 120s ; ROT: mediana: 52s quartil 25: 33s quartil 75: 100,5s ; ROT BBG: mediana: 120s quartil 25: 55,5s quartil 75: 120s ; $p < 0,05$) (Figura 5).

Figura 5. Efeitos do BBG sobre a coordenação motora em ratos parkinsonianos no teste do rotarod.

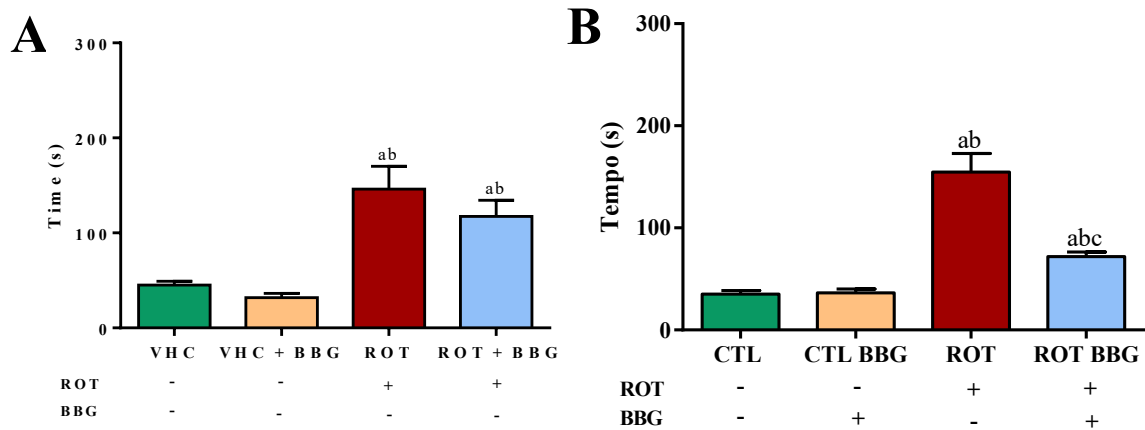


Os animais foram expostos à rotenona (2,75mg/Kg) durante 21 dias e tratados com BBG (50mg/Kg) a partir do sétimo dia de exposição. Após o 21 dia foram colocados no aparato do rotarod a velocidade constante de 20rpm e o tempo de latência para queda foi medido, n =10. os valores estão representados em mediana mais intervalo interquartil. **a** vs. CTL, **b** vs CTL BBG, **c** vs ROT; $p < 0,05$, Kruskal-Wallis e teste de Dunn.

4.3 Efeito do BBG sobre a detecção olfatória de cheiros voláteis dos animais (teste da procura do *pellet* enterrado).

Os resultados obtidos no teste do pellet enterrado mostram que a rotenona é capaz de induzir déficit na detecção de cheiros voláteis, um quadro de hiposmia, após 7 dias de exposição quando comparado aos grupos controles, (CTL: $45,2 \pm 3,97s$; CTL BBG: $31,9 \pm 4,53s$; ROT: $146,0 \pm 24,03s$; ROT BBG: $117,3 \pm 17,04$; $p < 0,05$) (Figura 6 A e B) e o BBG foi capaz de reverter esse déficit ao final do tratamento (CTL: $35,2 \pm 3,33s$; CTL BBG: $36,4 \pm 3,68s$; ROT: $154,6 \pm 18,32s$; ROT BBG: $71,9 \pm 4,54$; $p < 0,05$).

Figura 6. Efeitos do BBG sobre a hiposmia em ratos parkinsonianos no teste do pellet enterrado.

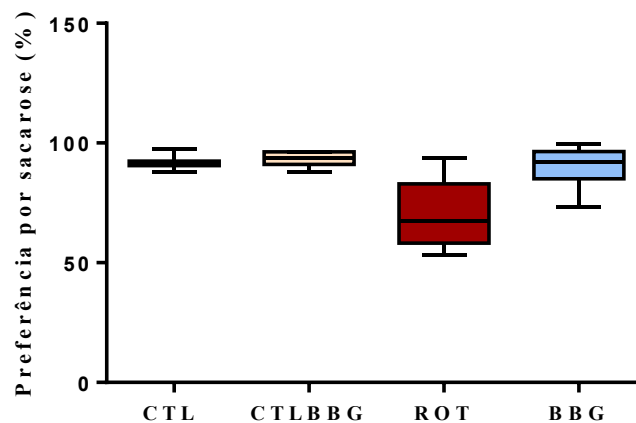


Após um jejum prévio de 16hrs os animais foram colocados em uma gaiola limpa com um pellet de comida enterrado na maravalha e o tempo para o animal encontrar o pellet foi medido, n=10. (A) Tempo para os animais encontrarem o pellet enterrado, após 7 dias de exposição a rotenona e anterior ao início do tratamento com o BBG. (B) Tempo para os animais encontrarem o pellet enterrado após 21 dias de exposição à rotenona e após o fim do tratamento com o BBG. Os valores estão representados como média \pm EPM. **a** vs. CTL, **b** vs CTL BBG; c vs ROT, $p < 0,05$, ANOVA de uma via e teste de Tukey.

4.4 Efeito do BBG sobre comportamento depressivo dos animais (teste de preferência por sacarose).

No teste de preferência por sacarose foi observada uma diminuição significativa no consumo de sacarose pelos animais parkinsonianos, assim como uma proteção nos animais parkinsonianos tratados, demonstrando que o modelo de exposição à rotenona por 21 dias é capaz de causar comportamentos do tipo depressivo e o tratamento com BBG foi capaz de proteger contra esse déficit (CTL: mediana: 91,26% quartil 25: 90,61 % quartil 75: 92,39 % ; CTL BBG: mediana: 93,76% quartil 25: 91,11 % quartil 75: 96,29 % ; ROT: mediana: 67,58 % quartil 25: 58,19 % quartil 75: 82,99 % ; ROT BBG: mediana: 92,20 % quartil 25: 85,02 % quartil 75: 96,48 % $p < 0,05$) (Figura 7).

Figura 7. Efeitos do BBG sobre o comportamento tipo depressivo anedonia, induzido pela rotenona no teste de preferência por sacarose.

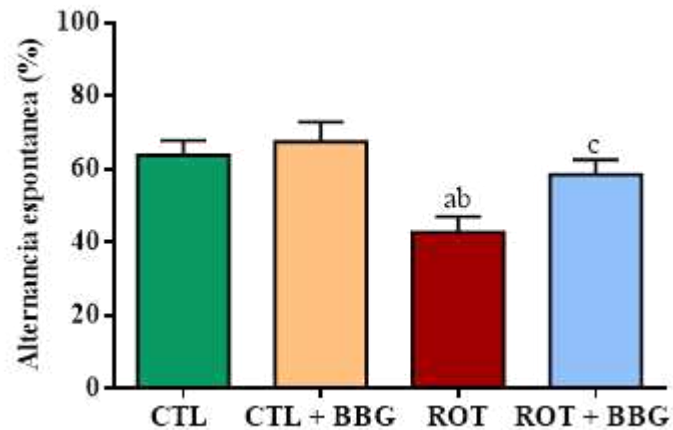


Foi oferecida uma solução de 2% de sacarose por 24hrs para os animais e o percentual de preferência em relação ao consumo total: água e solução de sacarose, n =10. Os valores estão representados como mediana mais intervalo interquartil. a vs. CTL, b vs CTL BBG, c vs ROT; $p < 0,05$, Kruskal-Wallis e teste de Dunn.

4.5 Efeito do BBG sobre a memória de trabalho dos animais (Teste do labirinto em Y).

Foi observada uma diminuição no percentual de alternâncias espontâneas no teste do - labirinto em Y, indicando um déficit na memória de trabalho dos animais, após 21 dias de administração de rotenona no grupo parkinsoniano em relação ao grupo controle e controle tratado. Além disto, o grupo parkinsoniano tratado apresentou um aumento significativo no número de alternâncias espontâneas, demonstrando que houve proteção ao déficit causado pela rotenona (CTL: $63,77 \pm 3,98$ %; CTL BBG: $67,5 \pm 5,37$ %; ROT: $42,83 \pm 4,18$ %; ROT BBG: $58,54 \pm 4,00$ %; $p < 0,05$) (Figura 8).

Figura 8. Efeitos do BBG sobre a memória de trabalho no teste do labirinto em Y.

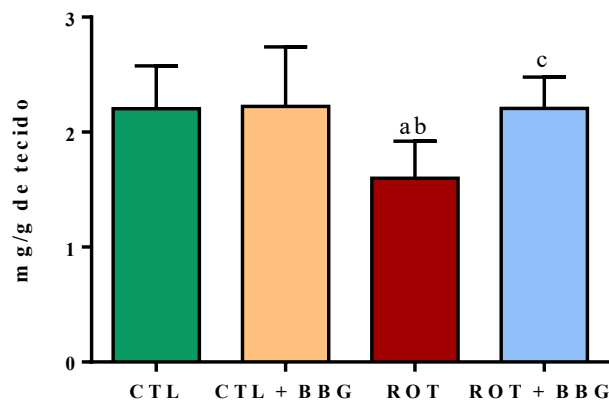


Os animais foram expostos à rotenona (2,75mg/Kg) durante 21 dias e tratados com BBG (50mg/Kg) a partir do sétimo dia de exposição. Após o 21 dia foram deixados para explorar labirinto em Y por 8 minutos e a % do número alternâncias foi calculado, n =10. Os valores estão representados como média \pm EPM. a vs. CTL, b vs CTL BBG; $p < 0,05$, ANOVA de uma via e teste de Tukey.

4.6 Efeito do BBG sobre as concentrações de dopamina no estriado.

Os resultados demonstraram que houve uma diminuição significativa nos níveis de dopamina no corpo estriado dos animais parkinsonianos. O tratamento com BBG foi capaz de proteger contra esse déficit monoaminérgico, quando comparado ao grupo parkinsoniano (CTL: $2,20 \pm 0,15$ mg/g; CTL BBG: $2,22 \pm 0,21$ mg/g; ROT: $1,60 \pm 0,13$ mg/g; ROT BBG: $2,20 \pm 0,11$ mg/g; $p < 0,05$) (Figura 9).

Figura 9. Efeitos do BBG sobre a concentrações de dopamina no estriado de ratos parkinsonianos.

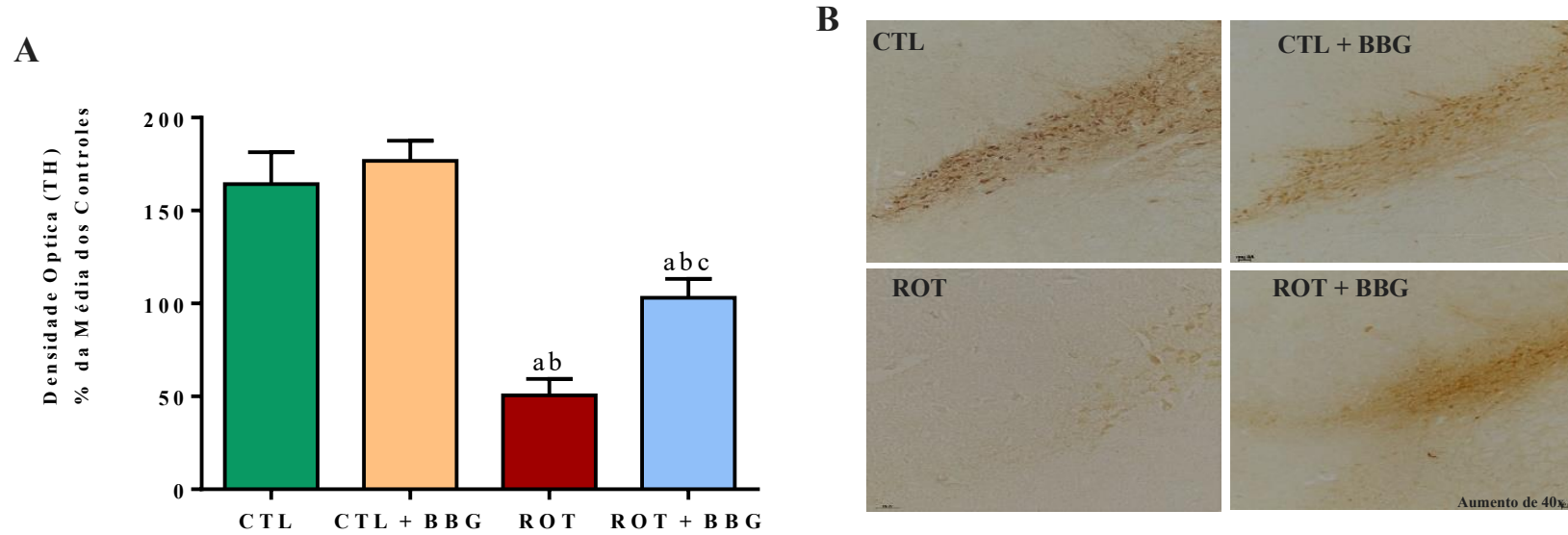


Os animais foram expostos à rotenona (2,75mg/Kg) durante 21 dias e tratados com BBG (50mg/Kg) a partir do sétimo dia de exposição. Os níveis de monoaminas e metabolitos foram medidos após 21 dias de protocolo, n=8. Os valores estão representados como média \pm EPM. a vs. CTL, b vs CTL BBG; $p < 0,05$, ANOVA de uma via e teste de Tukey.

4.7 Efeitos do BBG sobre a imunorreatividade para TH em animais parkinsonianos.

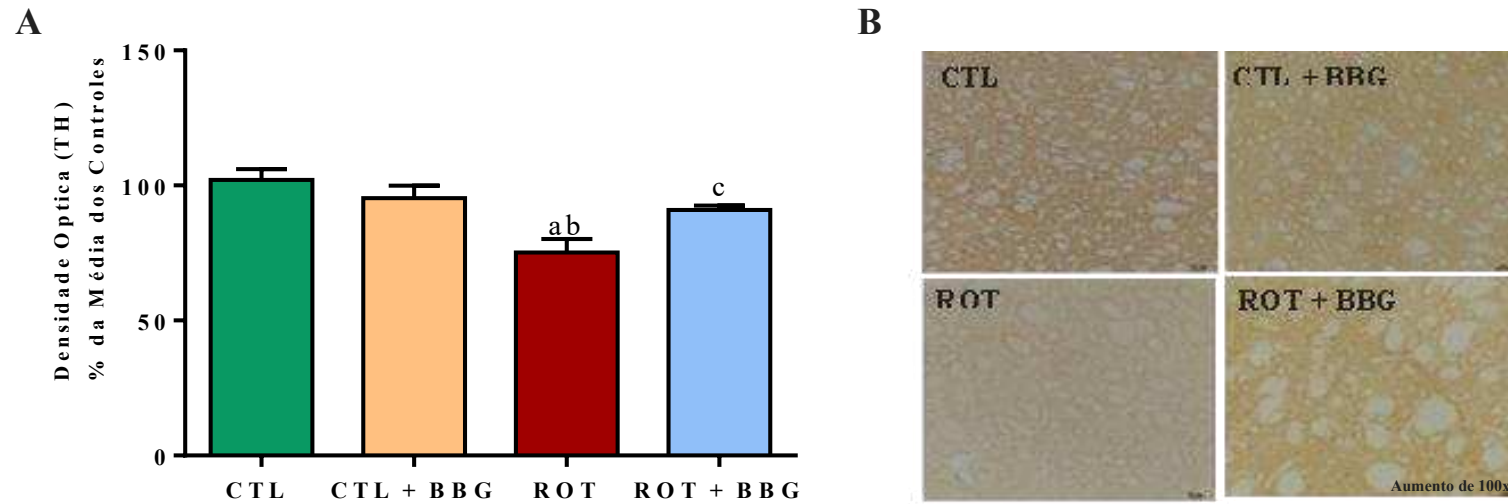
Os resultados mostraram uma diminuição significativa na imunorreatividade para tirosina hidroxilase no estriado e mesencéfalo, em relação aos grupos controle e controle tratado, demonstrando a lesão que a exposição à rotenona é capaz de causar aos neurônios dopaminérgicos. O BBG demonstrou uma proteção significativa aos danos causados pela rotenona no mesencéfalo (% da média dos controles: CTL: $164,3 \pm 17,08\%$; CTL BBG: $176,8 \pm 10,85\%$; ROT: $50,63 \pm 8,712\%$; ROT BBG: $103,1 \pm 10,19\%$, $p < 0,05$) (Figura 10) como no corpo estriado média dos controles: CTL: $102,0 \pm 4,075\%$; CTL BBG: $95,25 \pm 4,642\%$; ROT: $75,24 \pm 4,901\%$; ROT BBG: $90,97 \pm 1,592\%$, $p < 0,05$) (Figura 11).

Figura 10: BBG atenua a perda da imunorreatividade de tirosina hidroxilase (TH) no mesencéfalo de ratos parkinsonianos.



(A) Análise semiquantitativa por densidade óptica de imunorreatividade para TH no mesencéfalo. (B) Fotomicrografias mostrando imunorreatividade para TH em cortes coronais do cérebro (aumento de 40x). a vs. CTL, b vs. CTL + BBG, c vs. ROT + BBG, $p < 0,05$, ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Tukey, $n = 4$.

Figura 11: BBG atenua a perda estriatal de Tirosina Hidroxilase em ratos parkinsonianos.



(A) Análise semiquantitativa por densidade óptica de imunorreatividade para TH no estriado. (B) Fotomicrografias mostrando imunorreatividade para TH em seções coronais do cérebro (aumento de 100x). a vs. CTL, b vs. CTL + BBG, c vs. ROT + BBG, $p < 0,05$, ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Tukey, $n = 4$.

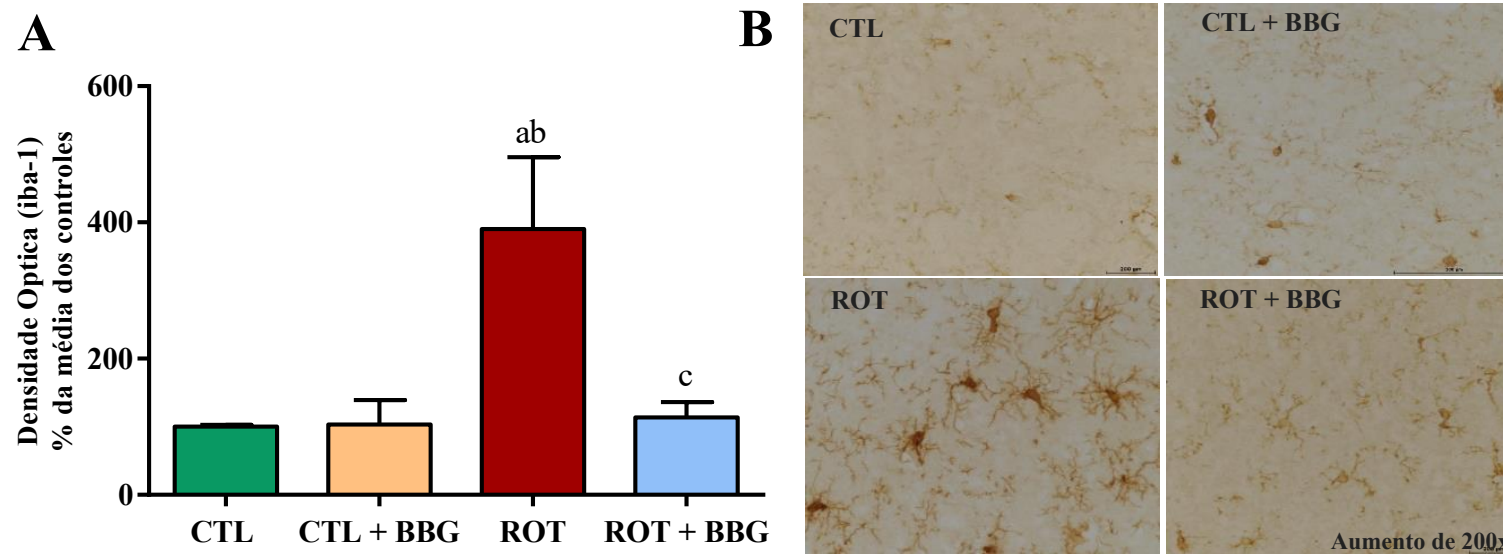
4.8 Efeitos do BBG sobre a imunorreatividade para iba-1 em ratos parkinsonianos.

O BBG conseguiu prevenir a microgliose induzida pela rotenona no estriado, observado pela imunomarcção para iba-1 (% da média dos controles: CTL: $100,0 \pm 2,655$ %; CTL BBG: $103,3 \pm 35,75$ %; ROT: $390,1 \pm 105,5$ %; ROT BBG: $113,6 \pm 22,45$ %, $p < 0,05$) (Figura 12 A e B).

4.9 Efeitos do BBG sobre a imunorreatividade para GFAP em ratos parkinsonianos.

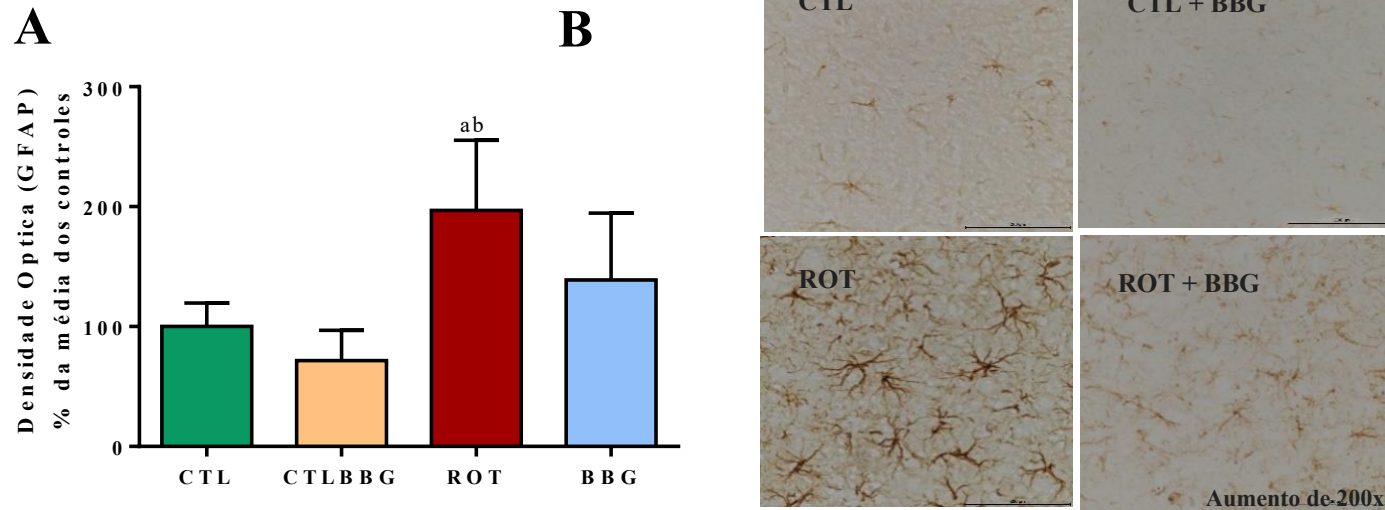
O BBG não conseguiu prevenir a astrogliose induzida pela rotenona, evidenciada pela densidade de astrócitos marcados com GFAP no estriado (% da média dos controles: CTL: $100,0 \pm 9,85$ %; CTL BBG: $71,67 \pm 12,65$ %; ROT: $196,9 \pm 29,21$ %; ROT BBG: $138,8 \pm 27,97$ %, $p < 0,05$) (Figura 13 A e B).

Figure 12: BBG atenua a microgliose no estriado de ratos parkinsonianos.



(A) Análise semiquantitativa por densidade óptica de imunoreatividade para Iba-1 no corpo estriado. (B) Fotomicrografias mostrando imunoreatividade para Iba-1 em cortes coronais do cérebro (aumento de 200x). a vs. CTL, b vs. CTL + BBG, c vs. ROT + BBG, $p < 0,05$, ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Tukey, $n = 4$.

Figure 13: BBG não protege o estriado de ratos parkinsonianos da astrogliose.



(A) Análise semi-quantitativa por densidade óptica da imunoreatividade para GFAP no estriado. (B) Fotomicrografias demonstrando a imunomarcagem para astrócitos (GFAP) em seções cerebrais coronais (10 μ M) do estriado dos animais (aumento 200x), n=4Os valores estão representados como média \pm EPM. a vs. CTL, b vs. CTL BBG, $p < 0,05$, ANOVA de uma via e teste de Tukey.

5. DICUSSÃO

Os resultados do presente trabalho mostraram que o bloqueio dos receptores P2X₇ pelo antagonista *Brilliant Blue G* (BBG) é capaz de proteger animais da neurodegeneração causada pela rotenona, após 7 dias do início da lesão, antes do surgimento dos sintomas motores. O BBG protegeu os animais de déficits motores na exploração vertical, horizontal, velocidade média e coordenação motora, bem como do comportamento tipo depressivo, déficit de memória operacional, diminuição dos níveis de dopamina estriatal, degeneração dopaminérgica no estriado e substância negra e microgliose estriatal.

A doença de Parkinson (DP) é caracterizada pela depleção progressiva dos neurônios dopaminérgicos, desencadeando sintomas motores e não motores (HAYES, 2019)(LATIF et al., 2021). O modelo animal utilizando rotenona, consegue reproduzir déficits motores, principalmente devido seu mecanismo de inibição do complexo I mitocondrial causando citotoxicidade e neuroinflamação, assim como na DP (DODIYA et al., 2020)(RADAD et al., 2019).

Um dos mecanismos associados a neurodegeneração é o ATP, funcionando como mediador inflamatório, principalmente por meio da ativação dos receptores purinérgicos P2X₇ (CALZAFERRI et al., 2020). Esses receptores estão presente, em sua maioria, nas células do sistema imune, como os macrófagos, células dendríticas e as linhagens B e T, onde o ATP vai atuar ativando essas células por meio da abertura de canais iônicos com influxo de Ca⁺² e Na⁺ e efluxo de K⁺ (ADINOLFI et al., 2017)(LINDEN; KOCH-NOLTE; DAHL, 2019).

O déficit motor progressivo é o principal achado clínico DP e engloba tremor de repouso, acinesia, rigidez muscular, instabilidade e anormalidades posturais que acarretam problemas de marcha, levando à dificuldade de iniciar e realizar movimentos e se locomover, comprometendo a autonomia e qualidade de vida dos pacientes(KATUAL; HARIKUMAR, 2017). Os testes campo aberto e *rotarod* foram utilizados para avaliar déficits na atividade locomotora e coordenação motora, respectivamente.

A exposição a rotenona foi capaz de induzir déficits motores na atividade exploratória horizontal, vertical e velocidade média, um indicativo de um quadro de bradicinesia, bem como no coordenação motora, assim como já descrito na literatura (TSENG et al., 2019) (WANG et al., 2020). O tratamento com BBG foi capaz de proteger os animais dos déficits motores causados pela rotenona. Ren e colaboradores (2021), demonstraram que o BBG, administrado anteriormente à lesão, por via intraperitoneal na concentração de 100mg/kg, é capaz de proteger

camundongos C57BL/6, contra danos motores causados pela exposição intraperitoneal de MPTP e protocolo de estresse crônico durante 4 semanas num modelo de parkinsonismo e depressão. A proteção contra déficits motores observada foi associada a proteção contra a perda de neurônios dopaminérgicos na substância negra *pars compacta* e uma diminuição da atividade microglial (MUSTAPHA; TAIB, 2021)(REN et al., 2021).

A DP engloba ainda diversos sintomas não motores que pioram com a progressão da doença e podem ser mais incapacitantes que a sintomatologia motora, esses sintomas geralmente com início anterior ao surgimento de sintomas motores em 10 a 20 anos, compreendendo um período designado fase prodrômica (FERESHTEHNEJAD et al., 2019). Dentre os sintomas mais recorrente estão os déficits olfatórios, que podem anteceder alguns anos aos sintomas mais característicos, são caracterizados por hiposmia e anosmia, que são perda parcial e total do olfato, respectivamente (DECOURT et al., 2021).

O déficit olfatório foi avaliado neste trabalho por meio da análise da capacidade de detecção de cheiros voláteis com o teste de *pellet* enterrado (BALESTRINO; SCHAPIRA, 2020) (SULPHATE, 1971). O modelo utilizado foi capaz de induzir hiposmia nos animais após 7 dias de exposição, assim como já descrito na literatura, com camundongos expostos a rotenona que se estendeu pelos 21 dias de exposição (LIU et al., 2015). Vale ressaltar que esses déficits precedem o surgimento dos problemas motores, assim como observado em pacientes com DP (SCHAPIRA; CHAUDHURI; JENNER, 2017) e foi utilizado como marco para início do tratamento.

O antagonismo do BBG foi capaz de reverter os déficits olfatórios, sendo este um estudo pioneiro, demonstrando que o antagonismo de P2X₇ foi capaz de reverter esses déficits. Na literatura já se sabe da existência de receptores P2X₇ no bulbo olfatório. Gao e colaboradores (2019) demonstraram em um estudo com ratos *knockout* P2X₇R o papel importante dos receptores nos processos inflamatórios do bulbo olfatório, de modo que os animais com receptores possuem muito mais citocina pró-inflamatórias como IL-1 β , podendo associar a reversão dos déficits olfatórios a uma diminuição do processo inflamatório no bulbo (YU et al., 2008)(GAO et al., 2019).

A depressão é considerada um dos sintomas não motores que mais afetam os pacientes com doença de Parkinson, e é apontada como um mal prognóstico para a evolução da doença, estando associada a evolução mais rápida do comprometimento motor (RAVINA et al., 2007)(TRAN et al., 2020)(JANKOVIC; TAN, 2020). O presente trabalho avaliou o comportamento do tipo depressivo dos animais através do teste de preferência por sacarose. A literatura já relata que a administração intraperitoneal de rotenona é capaz de causar

diminuição na preferência por sacarose, indicando um quadro de anedonia (MADIHA; HAIDER, 2019). O tratamento com o BBG foi capaz de proteger esses animais da anedonia causada pela exposição à rotenona. Nossos achados corroboram como o de Ren e colaboradores (2021), que mostram que o tratamento com o antagonismo dos receptores P2X₇ pelo BBG protegeu camundongos da depressão causados pela exposição intraperitoneal de MPTP e protocolo de estresse crônico durante 4 semanas num modelo de parkinsonismo e depressão, a proteção conferida pelo BBG foi associada à diminuição do processo neuroinflamatório. Já se sabe que a depressão possui uma forte relação a um estado superativado do sistema imune o que justifica a sua presença em muitas doenças neurodegenerativas como Parkinson e Alzheimer, assim como as desordens monoaminérgicas presentes na fisiopatologia dessas condições (RÉUS et al., 2016)(REN et al., 2021)(TROUBAT et al., 2021).

O pacientes com DP podem apresentar certo comprometimento cognitivo, assim como em outras doenças neurodegenerativas, como Alzheimer, isso se deve principalmente ao papel desempenhado pela dopamina no processo de consolidação da memória e aprendizado, alguns estudos sugerem que a dopamina possui um importante papel na consolidação de memórias, através do circuito entorrinal-hipocampal (LEE et al., 2022) onde a dopamina facilita a inserção de informações nesse circuito. Sabe-se que quando liberada no hipocampo dorsal, a dopamina se liga a receptores D1 e D5 e promove ações importantes como formação de memória episódica, aprendizado espacial e plasticidade. (KEMPADOO et al., 2016)(YAMASAKI; TAKEUCHI, 2017).

Investigou-se ainda a memória de trabalho dos animais, que é considerada um processo de armazenamento de informações a curto prazo para o desenvolvimento de determinada atividade, como no processo de leitura, estes que são afetados em pacientes com parkinsonismo (D'ESPOSITO, 2015)(WILLIAMS; STÖRMER, 2021). Utilizou-se o teste do labirinto em Y, que utiliza a atividade exploratória dos roedores para a avaliação da memória de trabalho e observou-se que a administração de rotenona, por via intraperitoneal, foi capaz de comprometer a memória operacional dos animais, assim como já descrito na literatura (DONG-JUN, 2019) (JIA et al., 2014).

O tratamento com BBG foi capaz de proteger os animais contra os danos na memória de trabalho causados pela exposição à rotenona. Trabalhos mostram que o bloqueio dos receptores P2X₇ pode contribuir para a proteção contra danos à memória. Carmo e colaboradores (2014) mostraram que o BBG na dose de 50mg/kg foi capaz de proteger ratos *Wistar* de déficits na memória aversiva de curto e longo prazo e a memória espacial no modelo hemi-parkinsonismo induzido pela injeção intraestriatal de 6-hidroxi-dopamina, e essa melhora

pode estar relacionada com a diminuição do processo neuroinflamatório, além da proteção contra morte dos neurônios dopaminérgicos (CARMO et al., 2014).

A dopamina é um elemento central na fisiopatologia da DP, sendo seu principal marco fisiopatológico a neurodegeneração dopaminérgica progressiva, com morte dos neurônios dopaminérgicos na substância negra, acarretando em uma diminuição das concentrações de dopamina do corpo estriado (JANKOVIC; TAN, 2020)(RIETDIJK et al., 2017)(STOESSL et al., 2020).

Neste trabalho, a transmissão dopaminérgica foi avaliada sob duas perspectivas: através da quantificação de dopamina por HPLC e por meio de análise imuno-histoquímica para tirosina hidroxilase (TH), que é uma enzima responsável pela conversão de tirosina em L-3,4-di-hidroxfenilalanina (L-DOPA) e é utilizada como um marcador de atividade dos neurônios dopaminérgicos (NAGATSU et al., 2022)(DIETER; FEIXUE; KHALED, 2022). A rotenona foi capaz de induzir a morte dos neurônios dopaminérgicos no estriado e substância negra no mesencéfalo com consequente diminuição das concentrações de dopamina no corpo estriado, assim como na DP. A rotenona causa a morte dos neurônios dopaminérgicos principalmente devido o dano mitocondrial e consequente quadro de estresse oxidativo e inflamação (ARAB; SAFAR; SHAHIN, 2021)(BALAKRISHNAN et al., 2021)(DODIYA et al., 2020).

O antagonismo do receptor purinérgico P2X₇ pelo BBG protegeu os animais da neurodegeneração dopaminérgica do estriado e substância negra e consequente diminuição do conteúdo de dopamina. Já se sabe que a super ativação dos receptores P2X₇ é responsável por uma série de eventos responsáveis pela morte neuronal em processos neurodegenerativos. Trabalhos anteriores, como o de Ferrasoli e colaboradores (2017) e Fonteles e colaboradores (2020), mostraram que a administração intraperitoneal de 50mg/kg por 7 dias e 45mg/kg por 22 dias de BBG, respectivamente, é capaz de proteger ratos *Wistar* da degeneração dopaminérgica no modelo de hemi-parkinsonismo induzido por 6-OHDA (FERRAZOLI et al., 2017; FONTELES et al., 2020).

No contexto atual, não se sabe exatamente qual o fator responsável por essa vulnerabilidade dos neurônios dopaminérgicos, mas acredita-se que o dobramento inadequado de proteínas, como a α -sinucleína, a neuroinflamação e o estresse oxidativo estariam relacionados com essa perda neuronal (MASATO et al., 2019)(ABRAHAM et al., 2021)(SEGURA-AGUILAR et al., 2014)(LATIF et al., 2021).

O processo neuroinflamatório é um dos principais processos fisiopatológicos envolvidos nas doenças neurodegenerativas, não sendo diferente na DP. A neuroinflamação foi avaliada por meio de imuno-histoquímica para iba-1, uma proteína que é expressa em grande

quantidade em células de micróglia e macrófagos para a avaliação da microgliose e GFAP, uma proteína constituinte dos filamentos intermediários expressa em abundância por astrócitos, para avaliação da astrogliose. Na literatura, é possível identificar que diversos trabalhos mostrando que a exposição à rotenona induz astrogliose e microgliose significativas, assim como neste trabalho (DODIYA et al., 2020) (DONG-XIN et al., 2020) (SUN et al., 2020).

O tratamento com BBG foi capaz de atenuar a microgliose causada pela rotenona, de maneira significativa, demonstrando a importância da ativação do receptor P2X₇ para a estimulação do processo inflamatório, esses achados corroboram com o que já foi descrito na literatura em alguns estudos (OLIVEIRA-GIACOMELLI et al., 2019) (CARMO et al., 2014). Muito embora não tenha sido observado significância estatística, foi observado que o BBG foi capaz de reduzir consideravelmente a ativação de astrócitos quando comparados aos animais apenas expostos a rotenona. Já se sabe que essa estimulação imunológica ocorre, pois o receptor P2X₇ funciona como um canal iônico e quando ativado, sob altas concentrações de ATP, funciona como um poro, permitindo a passagem de diversas moléculas e exerce um processo de despolarização celular ativando as mais diversas células do sistema imune. (ILLES et al., 2020)(JIMENEZ-MATEOS et al., 2019)(SLUYTER, 2017)(ILLES, 2020).

Além disso, os receptores possuem um importante papel na liberação de substâncias pró-inflamatórias como IL-1 β , pois a ativação do P2X₇ causa efluxo de K⁺ fazendo com que a caspase 1, presente no inflamassoma NLRP3, converta o mediador pró-IL-1 β em IL-1 β na forma ativa e essa cascata é responsável pela superativação do sistema imune, gerando um dos principais achados nas doenças neurodegenerativas, a neuroinflamação (KELLEY et al., 2019)(HUANG; XU; ZHOU, 2021)(BIASIZZO; KOPITAR-JERALA, 2020).

Assim, os resultados obtidos neste trabalho demonstram que o bloqueio dos receptores P2X₇ pelo antagonista *Brilliant Blue G* possui papel neuroprotetor contra déficits motores e não motores, degeneração dopaminérgica pelo controle da neuroinflamação mesmo quando iniciado numa fase similar a fase prodrômica da DP, podendo servir como uma nova estratégia medicamentosa para a DP, bem como para outras doenças neurodegenerativas, uma vez que o processo inflamatório está envolvido na fisiopatologia de diversas doenças neurodegenerativas. O trabalho demonstrou que o BBG foi capaz de proteger os animais contra danos motores e não motores, quando tratados no início do protocolo, antes do surgimento dos sintomas motores, esse é um dos achados inéditos deste trabalho, enfatizando a importância do sistema purinérgico para a consolidação e evolução da DP. Assim como o fato de o BBG conseguir reverter os déficits olfatórios que são um dos principais achados iniciais da DP na clínica.

6. CONCLUSÃO

O *Brilliant Blue G* (BBG), antagonista dos receptores P2X₇, demonstrou efeito neuroprotetor contra a neurotoxicidade induzida pela exposição a rotenona, um modelo de parkinsonismo experimental.

Os resultados obtidos com o protocolo sugerem que o bloqueio dos receptores P2X₇, mesmo quando iniciado numa fase similar a fase prodrômica da DP é capaz de proteger do desenvolvimento de déficits motores, déficits olfatórios, comportamento tipo depressivo e de memória através do controle da neurodegeneração por vias relacionadas a neuroinflamação.

Assim, os resultados indicam que o bloqueio dos receptores P2X₇ pode ser uma estratégia terapêutica promissora para o tratamento da Doença de Parkinson.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, M. E. et al. Intrathecal and intracerebroventricular dopamine for Parkinson's disease. **Clinical Neurology and Neurosurgery**, v. 200, n. November 2020, p. 106374, 2021.
- ADINOLFI, E. et al. The P2X7 receptor: a main player in inflammation Address correspondence to Francesco Di Virgilio: Department of Morphology , Surgery and. **Biochemical Pharmacology**, 2017.
- ALAM, M.; SCHMIDT, W. . Rotenone destroys dopaminergic neurons and induces parkinsonian symptoms in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 136, n. 1, p. 317–324, out. 2002.
- ARAB, H. H.; SAFAR, M. M.; SHAHIN, N. N. Targeting ROS-Dependent AKT/GSK-3 β /NF- κ B and DJ-1/Nrf2 Pathways by Dapagliflozin Attenuates Neuronal Injury and Motor Dysfunction in Rotenone-Induced Parkinson's Disease Rat Model. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 12, n. 4, p. 689–703, 2021.
- ARMSTRONG, M. J.; OKUN, M. S. Diagnosis and Treatment of Parkinson Disease: A Review. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, v. 323, n. 6, p. 548–560, 2020.
- BABA, M. et al. Aggregation of alpha-synuclein in Lewy bodies of sporadic Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. **The American journal of pathology**, v. 152, n. 4, p. 879–84, 1998.
- BADANJAK, K. et al. The contribution of microglia to neuroinflammation in parkinson's disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 9, 2021.
- BALAKRISHNAN, R. et al. Isolongifolene mitigates rotenone-induced dopamine depletion and motor deficits through anti-oxidative and anti-apoptotic effects in a rat model of Parkinson's disease. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 112, n. November, p. 101890, 2021.
- BALESTRINO, R.; SCHAPIRA, A. H. V. Parkinson disease. **European Journal of Neurology**, v. 27, n. 1, p. 27–42, 2020.
- BALL, N. et al. Parkinson's disease and the environment. **Frontiers in Neurology**, v. 10, n. March, 2019.
- BELARBI, K. et al. Glycosphingolipids and neuroinflammation in Parkinson's disease. **Molecular Neurodegeneration**, v. 15, n. 1, p. 1–16, 2020.
- BERNDT, N.; HOLZHÜTTER, H. G.; BULIK, S. Implications of enzyme deficiencies on mitochondrial energy metabolism and reactive oxygen species formation of neurons involved in rotenone-induced Parkinson's disease: A model-based analysis. **FEBS Journal**, v. 280, n. 20,

p. 5080–5093, 2013.

BETARBET, R. et al. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. **Nature Neuroscience**, v. 3, n. 12, p. 1301–1306, 2000.

BIASIZZO, M.; KOPITAR-JERALA, N. Interplay Between NLRP3 Inflammasome and Autophagy. **Frontiers in Immunology**, v. 11, n. October, p. 1–14, 2020.

BURNSTOCK, G. Purine and purinergic receptors. **Brain and Neuroscience Advances**, v. 2, p. 239821281881749, 2018.

CABREIRA, V.; MASSANO, J. Parkinson's disease: Clinical review and update. **Acta Medica Portuguesa**, v. 32, n. 10, p. 661–670, 2019.

CALZAFERRI, F. et al. The purinergic P2X7 receptor as a potential drug target to combat neuroinflammation in neurodegenerative diseases. **Medicinal Research Reviews**, v. 40, n. 6, p. 2427–2465, 2020.

CARMO, M. R. S. et al. The P2X7 receptor antagonist Brilliant Blue G attenuates contralateral rotations in a rat model of Parkinsonism through a combined control of synaptotoxicity, neurotoxicity and gliosis. **Neuropharmacology**, v. 81, p. 142–152, 2014.

CHURCH, F. C. Treatment Options for Motor and Non-Motor Symptoms of Parkinson ' s Disease. 2021.

CLARKE, L. E. et al. Normal aging induces A1-like astrocyte reactivity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, n. 8, p. E1896–E1905, 2018.

D'ESPOSITO, M. D'Esposito 2015. **Annual Review of Psychology**, v. 66, n. 1, p. 115–142, 2015.

DAN-DAN, Z. et al. ce pt. **International Journal of Neuroscience**, v. 0, n. 0, p. 000, 2021.

DAYEL, A. BIN; EVANS, R. J.; SCHMID, R. Mapping the site of action of human P2X7 receptor antagonists AZ11645373, Brilliant Blue G, KN-62, calmidazolium, and Zinc58368839 to the intersubunit allosteric pocket. **Molecular Pharmacology**, v. 96, n. 3, p. 355–363, 2019.

DECOURT, M. et al. Neuropsychiatric and cognitive deficits in parkinson's disease and their modeling in rodents. **Biomedicines**, v. 9, n. 6, 2021.

DIETER, W.; FEIXUE, R.; KHALED, W. From the tyrosine hydroxylase hypothesis of Parkinson ' s disease to modern strategies : a short historical overview. **Journal of Neural Transmission**, n. 0123456789, 2022.

DODIYA, H. B. et al. Chronic stress-induced gut dysfunction exacerbates Parkinson's disease phenotype and pathology in a rotenone-induced mouse model of Parkinson's disease. **Neurobiology of Disease**, v. 135, p. #pagerange#, 2020.

- DONG-JUN, LV , LING-XI LIA, B, 1, JING CHENA, SHI-ZHUANG WEIB, FEN WANGB, HUA HUA, AN-MU XIEC, C.-F. L. **10.1016@j.bbr.2019.112031.pdf**, 2019.
- DONG-XIN, W. et al. Ac ce pt cr t. **Toxicology Mechanisms and Methods**, v. 0, n. 0, p. 000, 2020.
- DRILL, M. et al. Antagonism of the ATP-gated P2X7 receptor: a potential therapeutic strategy for cancer. **Purinergic Signalling**, v. 17, n. 2, p. 215–227, 2021.
- DROLET, R. E. et al. Chronic rotenone exposure reproduces Parkinson’s disease gastrointestinal neuropathology. **Neurobiology of Disease**, v. 36, n. 1, p. 96–102, out. 2009.
- DU, X.; XIE, X.; LIU, R. The Role of α -Synuclein Oligomers in Parkinson ’ s Disease. 2020.
- DUTY, S.; JENNER, P. Animal models of Parkinson’s disease: A source of novel treatments and clues to the cause of the disease. **British Journal of Pharmacology**, v. 164, n. 4, p. 1357–1391, 2011.
- ELSWORTH, J. D. HHS Public Access. v. 127, n. 5, p. 785–791, 2021.
- FERESHTEHNEJAD, S. M. et al. Evolution of prodromal Parkinson’s disease and dementia with Lewy bodies: A prospective study. **Brain**, v. 142, n. 7, p. 2051–2067, 2019.
- FERRAZOLI, E. G. et al. Brilliant blue G, but not fenofibrate, treatment reverts hemiparkinsonian behavior and restores dopamine levels in an animal model of parkinson’s disease. **Cell Transplantation**, v. 26, n. 4, p. 669–677, 2017.
- FERREIRA, L. G. B. et al. Brilliant Blue Dyes in Daily Food: How Could Purinergic System Be Affected? **International Journal of Food Science**, v. 2016, p. 5–8, 2016.
- FONTELES, A. A. et al. ATP Signaling Controlling Dyskinesia Through P2X7 Receptors. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 13, n. August, p. 1–11, 2020.
- FRIES, G. R.; DA SILVA MAGALHÃES, P. V. A pesquisa básica na Revista de Psiquiatria do Rio Grande do Sul. **Revista de Psiquiatria do Rio Grande do Sul**, v. 32, n. 2, p. 33–34, 2010.
- GAO, L. et al. Age-specific effects of P2X7 receptors on olfactory function in mice. **NeuroReport**, v. 30, n. 16, p. 1055–1061, 2019.
- GLASER, T. et al. Antagonistic Roles of P2X7 and P2Y2 Receptors in Neurodegenerative Diseases. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, n. April, p. 1–7, 2021.
- GRANDI, L. C.; DI GIOVANNI, G.; GALATI, S. Animal models of early-stage Parkinson’s disease and acute dopamine deficiency to study compensatory neurodegenerative mechanisms. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 308, n. August, p. 205–218, 2018.
- GREENAMYRE, J. T. et al. Lessons from the rotenone of Parkinson’s disease. **Trends in pharmacological sciences**, v. 31, n. 4, p. 141–142, 2011.
- HAYES, M. T. Parkinson’s Disease and Parkinsonism. **American Journal of Medicine**, v. 132,

n. 7, p. 802–807, 2019.

HOU, Y. et al. Ageing as a risk factor for neurodegenerative disease. **Nature Reviews Neurology**, v. 15, n. october, p. 565–581, 2019.

HUANG, Y.; CHAN, P.; HALLIDAY, G. Genetics of Parkinson's disease. **Oxidative Stress and Neurodegenerative Disorders**, p. 663–697, 2007.

HUANG, Y.; XU, W.; ZHOU, R. NLRP3 inflammasome activation and cell death. **Cellular and Molecular Immunology**, v. 18, n. 9, p. 2114–2127, 2021.

IAKOVENKO, E. V et al. The SNCA -Rep1 Polymorphic Locus : Association with the Risk of Parkinson ' s Disease and SNCA Gene Methylation. v. 12, n. 45, p. 105–110, 2020.

ILLES, P. P2x7 receptors amplify cns damage in neurodegenerative diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 17, p. 1–31, 2020.

ILLES, P. et al. Regulation of Microglial Functions by Purinergic Mechanisms in the Healthy and Diseased CNS. **Cells**, v. 9, n. 5, p. 1–23, 2020.

JAMES, L. M.; GEORGOPOULOS, A. High Correlations Among Worldwide Prevalences of Alzheimers, Parkinsons, Multiple Sclerosis, and Motor Neuron Diseases: Evidence for Common Causative Factors. **SSRN Electronic Journal**, n. April, p. 1–21, 2020.

JANKOVIC, J.; TAN, E. K. Parkinson's disease: Etiopathogenesis and treatment. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, v. 91, n. 8, p. 795–808, 2020.

JIA, F. et al. Unexpected improvements of spatial learning and memory abilities in chronic rotenone intoxicated mice. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, p. 1–7, 2014.

JIMENEZ-MATEOS, E. M. et al. Regulation of P2X7 receptor expression and function in the brain. **Brain Research Bulletin**, v. 151, n. November 2018, p. 153–163, 2019.

JOHNSON, M. E.; BOBROVSKAYA, L. An update on the rotenone models of Parkinson's disease: Their ability to reproduce the features of clinical disease and model gene–environment interactions. **NeuroToxicology**, v. 46, p. 101–116, jan. 2015.

JOST, W. H.; REICHMANN, H. “An essay on the shaking palsy” 200 years old. **Journal of Neural Transmission**, v. 124, n. 8, p. 899–900, 2017.

KARMAKAR, M. et al. in response to ATP. **Nature Communications**, v. 7, p. 1–13, 2016.

KATUAL, M. K.; HARIKUMAR, S. L. RECENT ADVANCEMENTS IN PARKINSON'S MANAGEMENT. **JOURNAL OF DRUG DELIVERY RESEARCH**, v. 6, n. 2, p. 1–10, 2017.

KELLEY, N. et al. Nlrp3 炎症小体的激活和调控机制综述. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 13, p. 1–24, 2019.

KEMPADOO, K. A. et al. Dopamine release from the locus coeruleus to the dorsal hippocampus promotes spatial learning and memory. **Proceedings of the National Academy**

- of **Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 51, p. 14835–14840, 2016.
- LANG, A. E. Reflection and Reaction Neuroprotection in Parkinson's disease : and now for something completely different ? **The Lancet Neurology**, v. 5, n. December, p. 990–991, 2006.
- LATIF, S. et al. Dopamine in Parkinson's disease. **Clinica Chimica Acta**, v. 522, n. June, p. 114–126, 2021.
- LEE, J. Y. et al. Dopamine facilitates associative memory encoding in the entorhinal cortex. **Nature**, v. 598, n. 7880, p. 321–326, 2022.
- LEITE, C. Governo Bolsonaro já registrou 745 novos agrotóxicos; número é o maior em 15 anos. **O povo**, p. 1, ago. 2020.
- LEVY, O. A.; MALAGELADA, C.; GREENE, L. A. Cell death pathways in Parkinson's disease: proximal triggers, distal effectors, and final steps. **Apoptosis**, v. 14, n. 4, p. 478–500, 2009.
- LEWIS, M. M. et al. Differential involvement of striato- and cerebello-thalamo- cortical pathways in tremor-and akinetic/rigid-predominant Parkinson's disease. **Neuroscience**, v. 177, p. 230–239, 2011.
- LINDEN, J.; KOCH-NOLTE, F.; DAHL, G. Purine Release, Metabolism, and Signaling in the Inflammatory Response. **Annual Review of Immunology**, v. 37, p. 325–347, 2019.
- LIU, Y. et al. Environment-contact administration of rotenone: A new rodent model of Parkinson's disease. **Behavioural Brain Research**, v. 294, p. 149–161, 2015.
- MACMAHON COPAS, A. N. et al. The Pathogenesis of Parkinson's Disease: A Complex Interplay Between Astrocytes, Microglia, and T Lymphocytes? **Frontiers in Neurology**, v. 12, n. May, 2021.
- MADIHA, S.; HAIDER, S. Curcumin restores rotenone induced depressive-like symptoms in animal model of neurotoxicity: assessment by social interaction test and sucrose preference test. **Metabolic Brain Disease**, v. 34, n. 1, p. 297–308, 2019.
- MASATO, A. et al. Impaired dopamine metabolism in Parkinson's disease pathogenesis. **Molecular Neurodegeneration**, v. 14, n. 1, p. 1–21, 2019.
- MEREDITH, G. E. G. E.; SONSALLA, P. K. P. K.; CHESSELET, M. F. M. Animal Models of Parkinson's Disease Progression. **Acta neuropathologica**, v. 115, n. 4, p. 385–398, 2008.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, P. E A. (BR). **Estabelece os prazos para aprovação tácita para os atos públicos de liberação de responsabilidade da Secretaria de Defesa Agropecuária, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, conforme caput do art. 10 do Decreto nº 10.178, de 18 de dezemb.**
- MORAIS, L. H. et al. Characterization of motor, depressive-like and neurochemical alterations

- induced by a short-term rotenone administration. **Pharmacological Reports**, v. 64, n. 5, p. 1081–1090, 2012.
- MORGAN M. ROGERS-CARTER^{1, 2}, J. A. V. ² K. B. G. A. F. P. M. T. M. M. R.; CHRISTIANSON¹, J. P. 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. **Physiology & behavior**, v. 176, n. 12, p. 139–148, 2017.
- MUSTAPHA, M.; TAIB, C. N. M. MPTP-induced mouse model of Parkinson's disease: A promising direction for therapeutic strategies. **Bosnian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 21, n. 4, p. 422–433, 2021.
- NAGATSU, T. et al. Neuromelanin in Parkinson ' s Disease : Tyrosine Hydroxylase and Tyrosinase. 2022.
- NORTH, R. A.; BUELL, G. Identified as a P2x Receptor (P2X7). n. May, p. 5–8, 1996.
- OBESO, J. A. et al. Past, present, and future of Parkinson's disease: A special essay on the 200th Anniversary of the Shaking Palsy. **Movement Disorders**, v. 32, n. 9, p. 1264–1310, 2017.
- OLANOW, C. W.; KIEBURTZ, K.; SCHAPIRA, A. H. V. Why have we failed to achieve neuroprotection in Parkinson's disease? **Annals of Neurology**, v. 64, n. SUPPL. 2, p. 101–110, 2008.
- OLIVEIRA-GIACOMELLI, Á. et al. P2Y6 and P2X7 Receptor Antagonism Exerts Neuroprotective/ Neuroregenerative Effects in an Animal Model of Parkinson's Disease. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 13, n. November, p. 1–13, 2019.
- PATRITTI-CRAM, J. et al. Purinergic signaling in peripheral nervous system glial cells. **Glia**, v. 69, n. 8, p. 1837–1851, 2021.
- RADAD, K. et al. Rotenone: From modelling to implication in Parkinson's disease. **Folia Neuropathologica**, v. 57, n. 4, p. 317–326, 2019.
- RAVINA, B. et al. The impact of depressive symptoms in early Parkinson disease. **Neurology**, v. 69, n. 4, p. 342–347, 2007.
- REICH, S. G.; SAVITT, J. M. Parkinson's Disease. **Medical Clinics of North America**, v. 103, n. 2, p. 337–350, 2019.
- REN, C. et al. Depression Induced by Chronic Unpredictable Mild Stress Increases Susceptibility to Parkinson's Disease in Mice via Neuroinflammation Mediated by P2X7 Receptor. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 12, n. 7, p. 1262–1272, 2021.
- RÉUS, G. Z. et al. Neurochemical correlation between major depressive disorder and neurodegenerative diseases. **Life Sciences**, v. 158, p. 121–129, 2016.
- RIBEIRO, D. E. et al. Purinergic receptors in neurogenic processes. **Brain Research Bulletin**, v. 151, n. December 2018, p. 3–11, 2019.

- RIETDIJK, C. D. et al. Exploring Braak's Hypothesis of Parkinson's Disease. v. 8, n. February, 2017.
- SALARI, S.; BAGHERI, M. In vivo, in vitro and pharmacologic models of Parkinson's disease. **Physiological Research**, v. 68, n. 1, p. 17–24, 2019.
- SALAWU, F. K.; DANBURAM, A.; OLOKOBA, A. B. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management. **Nigerian journal of medicine : journal of the National Association of Resident Doctors of Nigeria**, v. 19, n. 2, p. 126–131, 2010.
- SANTOS, G. F. et al. Doença de Parkinson: Padrão epidemiológico de internações no Brasil. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 1, p. e13511124535, 2022.
- SARAVANAN, K. S.; SINDHU, K. M.; MOHANAKUMAR, K. P. Acute intranigral infusion of rotenone in rats causes progressive biochemical lesions in the striatum similar to Parkinson's disease. **Brain Research**, v. 1049, n. 2, p. 147–155, 2005.
- SAVICA, R. Livin' on the edge Risky behaviors and Parkinson disease: Genes, environment, or both? **Neurology**, v. 93, n. 15, p. 657, 2019.
- SCHAPIRA, A. H. V; CHAUDHURI, K. R.; JENNER, P. Non-motor features of Parkinson disease. **Nature Publishing Group**, v. 18, n. 7, p. 435–450, 2017.
- SCHOBBER, A. Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. **Cell and Tissue Research**, v. 318, n. 1, p. 215–224, 2004.
- SEGURA-AGUILAR, J. et al. Protective and toxic roles of dopamine in Parkinson's disease. **Journal of Neurochemistry**, v. 129, n. 6, p. 898–915, 2014.
- SIMON, D. K.; TANNER, C. M.; BRUNDIN, P. Parkinson Disease Epidemiology, Pathology, Genetics, and Pathophysiology. **Clinics in Geriatric Medicine**, v. 36, n. 1, p. 1–12, 2020.
- SLUYTER, R. The P2X7 receptor. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1051, n. July, p. 17–53, 2017.
- SOLINI, A. et al. P2X7 receptor / NLRP3 inflammasome complex and a-synuclein / parkin balance in neo-diagnosed , treatment-naïve Parkinson disease : a prospective study. **Research square**, n. july, p. 1–23, 2020.
- SONIA ANGELINE, M. et al. Rotenone-induced parkinsonism elicits behavioral impairments and differential expression of parkin, heat shock proteins and caspases in the rat. **Neuroscience**, v. 220, p. 291–301, set. 2012.
- STOESSL, J. et al. HHS Public Access. v. 34, n. 10, p. 1406–1422, 2020.
- SULPHATE, Z. Acute Anosmia in the Rat: A Behavioral Test of a Peripherally-induced Olfactory Deficit 1. v. 6, p. 619–621, 1971.
- SUN, C. et al. Neuroscience Letters Immunoproteasome is up-regulated in rotenone-induced

- Parkinson ' s disease rat model. **Neuroscience Letters**, v. 738, n. April, p. 135360, 2020.
- SVEINBJORNSDOTTIR, S. The clinical symptoms of Parkinson's disease. **Journal of Neurochemistry**, p. 318–324, 2016.
- TITOVA, N. et al. **Nonmotor Symptoms in Experimental Models of Parkinson's Disease**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2017. v. 133
- TRAN, A. A. et al. Investigating the Convergent Mechanisms between Major Depressive Disorder and Parkinson's Disease. **Complex Psychiatry**, v. 6, n. 3–4, p. 47–61, 2020.
- TRIGO-DAMAS, I.; DEL REY, N. L. G.; BLESAS, J. Novel models for parkinson's disease and their impact on future drug discovery. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 13, n. 3, p. 229–239, 2018.
- TROUBAT, R. et al. Neuroinflammation and depression: A review. **European Journal of Neuroscience**, v. 53, n. 1, p. 151–171, 2021.
- TSENG, H. et al. Protective Effect of (–) Epigallocatechin-3-gallate on Rotenone-Induced Parkinsonism-like Symptoms in Rats. 2019.
- VENDEROVA, K.; PARK, D. S. Programmed Cell Death in Parkinson's Disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 2, n. 8, p. a009365–a009365, ago. 2012.
- VINGILL, S.; CONNOR-ROBSON, N.; WADE-MARTINS, R. Are rodent models of Parkinson's disease behaving as they should? **Behavioural Brain Research**, v. 352, p. 133–141, 2018.
- VON KÜGELGEN, I. Molecular pharmacology of P2Y receptor subtypes. **Biochemical Pharmacology**, v. 187, p. 114361, 2021.
- VON MUECKE-HEIM, I. A. et al. P2X7R antagonists in chronic stress-based depression models: a review. **European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience**, v. 271, n. 7, p. 1343–1358, 2021.
- WANG, T. et al. Neuroprotective effects of Danshensu on rotenone-induced Parkinson ' s disease models in vitro and in vivo. v. 7, p. 1–10, 2020.
- WILLIAMS, J.; STÖRMER, V. S. Working Memory: How Much Is It Used in Natural Behavior? **Current Biology**, v. 31, n. 4, p. R205–R206, 2021.
- WU, Y. N.; JOHNSON, S. W. Rotenone potentiates NMDA currents in substantia nigra dopamine neurons. **Neuroscience Letters**, v. 421, n. 2, p. 96–100, 2007.
- YAMASAKI, M.; TAKEUCHI, T. Locus Coeruleus and Dopamine-Dependent Memory Consolidation. **Neural Plasticity**, v. 2017, 2017.
- YU HERTZ, A. L. et al. Astrocytes and Parkinson's disease (PDF) Look at Forno paper. **Progress in Brain Research**, v. 94, 1992.

- YU, Y. et al. Cellular localization of P2X7 receptor mRNA in the rat brain. **Brain Research**, v. 1194, p. 45–55, 2008.
- YUAN, Y. HE et al. The molecular mechanism of rotenone-induced α -synuclein aggregation: EMPHASIZING the role of the calcium/GSK3 β pathway. **Toxicology Letters**, v. 233, n. 2, p. 163–171, 2015.
- ZENG, X. S.; GENG, W. S.; JIA, J. J. Neurotoxin-Induced Animal Models of Parkinson Disease: Pathogenic Mechanism and Assessment. **ASN Neuro**, v. 10, 2018.
- ZHANG, Q. S. et al. Reassessment of subacute MPTP-treated mice as animal model of Parkinson's disease. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 38, n. 10, p. 1317–1328, 2017a.
- ZHANG, Z. N. et al. Subcutaneous rotenone rat model of Parkinson's disease: Dose exploration study. **Brain Research**, v. 1655, n. June 2016, p. 104–113, 2017b.
- ZHOU, X. et al. Brilliant blue G inhibits inflammasome activation and reduces disruption of blood-spinal cord barrier induced by spinal cord injury in rats. **Medical Science Monitor**, v. 25, p. 6359–6366, 2019.