



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA CLÍNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

TYCIANE DE SOUZA NASCIMENTO

**O RECEPTOR P2X₇ MICROGLIAL ORQUESTRA NEUROINFLAMAÇÃO,
DISFUNÇÃO AUTOFÁGICA E SINUCLEINOPATIA EM RATOS
PARKINSONIANOS**

FORTALEZA

2025

TYCIANE DE SOUZA NASCIMENTO

O RECEPTOR P2X₇ MICROGLIAL ORQUESTRA NEUROINFLAMAÇÃO, DISFUNÇÃO
AUTOFÁGICA E SINUCLEINOPATIA EM RATOS PARKINSONIANOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências Médicas. Área de concentração: Neurociência.

Orientador: Profa. Dra. Geanne Matos de Andrade.

FORTALEZA

2025

TYCIANE DE SOUZA NASCIMENTO

O RECEPTOR P2X₇ MICROGLIAL ORQUESTRA NEUROINFLAMAÇÃO, DISFUNÇÃO
AUTOFÁGICA E SINUCLEINOPATIA EM RATOS PARKINSONIANOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências Médicas. Área de concentração: Neurociências.

Aprovada em: / /.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Geanne Matos de Andrade (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dra. Raquel Carvalho Montenegro
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Henning Ulrich
Universidade de São Paulo (USP)

Prof. Dr. Alexandre dos Santos Rodrigues
Universidade Federal Fluminense (UFF)

Prof. Dra. Fernanda Martins Maia
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

Aos meus pais, pelo apoio incondicional,
que mesmo sem saber, e me ensinarem o essencial,
para seguir no mundo acadêmico:
persistência e ética.

AGRADECIMENTOS

Essa força multi nomeável que governa a natureza.

Aos meus pais, **Neldo** e **Nilda**, pelo apoio incondicional, pelo suporte, investimento, compreensão e amor, mas principalmente, mesmo sem conhecimento acadêmico, me ensinarem o essencial para essa jornada, força, determinação e ética. Tudo que eu sou, devo a vocês.

A minha irmã **Tycia** pelo imenso apoio, perturbação, divertimento e força. Aos meus sobrinhos **Arthur** e **Catharina** por sempre me trazerem perspectiva e serem minha fonte inesgotável de força, pelo carinho e apoio. Ao **Raul** pelo companheirismo e apoio.

Ao **Prof. Dra. Geanne Matos de Andrade**, por ter aberto as portas do laboratório para mim a 9 anos atrás e mudar minha vida. Agradeço por todas as oportunidades, pela confiança no meu trabalho, pela orientação e pela contribuição para a minha construção como profissional.

Ao **Alfa**, um dos bem mais valiosos que o LNC me deu, sem você, eu não conseguiria. Sou imensamente grata pelo apoio, compreensão, pela força, risadas e principalmente por desbravar comigo tantas ideias, padronizações de protocolos, jornadas de experimentos, com o entusiasmo digno que a ciência merece e que fez de mim a profissional que sou hoje.

Aos **Prof. Dr. Henning Ulrich**, **Prof. Dr. Alexandre Rodrigues**, **Profa. Dra. Adriana Maia**, **Profa. Dra. Raquel Montenegro** pelo tempo, disponibilidade, pelas valiosas sugestões para minha tese. **Dra Mariana Lima Vale** e **Prof. Dr. Diego Veras Wilke** pelo tempo, disponibilidade, pelas valiosas colaborações e sugestões na minha banca de qualificação. E ao

Gostaria de expressar minha sincera gratidão aos professores. **Dr. Reinaldo Barreto Oriá** e **Dr. Arménio Aguiar** coordenadores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas durante meu doutorado, pela parceria, apoio e dedicação ao longo de todo esse período. Bem como ao **Prof. Dr. Pedro Noronha Filho** pela parceria, disponibilidade e colaboração.

Aos demais colegas do LNC, **Albert**, **Marta**, **Amanda**, **Jéssica**, **Mayara**, **Carol**, **Gabi**, **Ellen**, **Caio**, **Arnaldo**, **João**, **Ana Paula**, por terem enriquecido minha jornada, pela amizade, incentivo e companheirismo.

Ao **Daniel** do LABICONTE pelos ensinamentos, conselhos, parceria, colaborações risadas.

Aos queridos amigos da UFRN que a pandemia me deu, que considero minha turma de doutorado. **Pedro Gabriel, Pedro Cescon, Joaquim e Natsumi**, obrigada pelo brilhantismo, apoio, risadas e entusiasmo.

Ao **Prof. Dr. Rodrigo Cunha**, por receber na Universidade de Coimbra, pela orientação, colaboração, ensinamentos e por engrandecer minha tese com suas ideias. Ao **prof. Dr. Ângelo Tomé, Dra. Samira Ferreira, Profa. Paula Agostinho**, pelos ensinamentos, contribuições e sugestões no meu período na UC.

Aos animais, meus maiores companheiros nessa jornada de descoberta, e os que mais se doaram no processo: eu prezo o sacrifício de cada um de vocês.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) pelo apoio financeiro.

Agradeço a todos aqueles que contribuíram de alguma forma para o engrandecimento deste trabalho e para minha formação. A todos, minha humilde e sincera gratidão.

“A educação é um ato de amor, por isso, um ato de coragem. Não pode temer o debate. A análise da realidade. Não pode fugir à discussão criadora, sob pena de ser uma farsa.”
(Paulo Freire, 1999)

RESUMO

A doença de Parkinson (DP) é uma desordem neurodegenerativa multissistêmica, caracterizada pela perda progressiva de neurônios dopaminérgicos na substância negra e pela presença de inclusões proteicas conhecidas como corpos de Lewy, compostos principalmente por α -sinucleína agregada. Em condições fisiológicas, essas proteínas são direcionadas para degradação autofágica. A hiperatividade dos receptores purinérgicos P2X₇ tem sido amplamente implicada na fisiopatologia da DP, com evidências crescentes de seu papel na disfunção autofágica e na agregação proteica. Assim o presente estudo teve como objetivo investigar o efeito neuroprotetor do antagonista dos receptores P2X₇ *Brilliant Blue G* (BBG), administrado em uma fase prodrômica da DP, com foco em seu impacto sobre o acúmulo de α -sinucleína e disfunção das vias autofágicas, em um modelo experimental de parkinsonismo induzido por rotenona. Para isso, ratos Wistar machos foram divididos em quatro grupos: controle, controle tratado, parkinsoniano (rotenona 2,75 mg/kg por 21 dias, via intraperitoneal) e parkinsoniano tratado com BBG (50 mg/kg por 15 dias, via intraperitoneal). Os animais foram submetidos a testes comportamentais e, ao final, eutanasiados para coleta do cérebro para análises imuno-histoquímicas e moleculares. O bloqueio dos receptores P2X₇ protegeu significativamente os animais contra déficits na detecção de odores voláteis, na atividade locomotora (teste de campo aberto), na coordenação motora (teste do rotarod), no comportamento do tipo depressivo (teste de preferência por sacarose) e na memória de trabalho (teste do labirinto em Y) induzidos pela exposição à rotenona. O BBG preveniu a perda de neurônios dopaminérgicos na substância negra e no estriado, diminuiu a neuroinflamação e reduziu o acúmulo de α -sinucleína total e fosforilada, além de regular as vias de autofagia e mitofagia, conforme evidenciado pela redução da densidade de proteínas como LC3 e PINK1. O efeito do BBG ocorreu pela diminuição do número de receptores P2X₇ micrógliais. Os resultados indicam que a hiperatividade purinérgica microglial induzida pela rotenona atua como um centro de integração patogênico multifacetado, amplificando a neuroinflamação, desregulando os processos autofágicos e promovendo o acúmulo de α -sinucleína patogênica, criando um ciclo vicioso que culmina na morte de neurônios dopaminérgicos. O bloqueio dos receptores P2X₇ surge, portanto, como uma abordagem terapêutica promissora no controle de múltiplas vias patológicas da DP.

Palavras-chave: Doença de Parkinson; BBG; receptores P2X₇; α -sinucleína; autofagia; neuroinflamação.

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is a multisystem neurodegenerative disorder characterized by the progressive loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra and the presence of protein inclusions known as Lewy bodies, which are primarily composed of aggregated α -synuclein. Under physiological conditions, these proteins are targeted for autophagic degradation. Hyperactivity of purinergic P2X₇ receptors has been extensively implicated in the pathophysiology of PD, with growing evidence supporting their role in autophagic dysfunction and protein aggregation. Thus, the present study aimed to investigate the neuroprotective effect of the P2X₇ receptor antagonist Brilliant Blue G (BBG), administered during a prodromal phase of PD, focusing on its impact on α -synuclein accumulation and dysfunction of autophagic pathways in an experimental model of rotenone-induced parkinsonism. For this purpose, male Wistar rats were divided into four groups: control, control treated, parkinsonian (rotenone 2.75 mg/kg for 21 days, intraperitoneally), and parkinsonian treated with BBG (50 mg/kg for 15 days, intraperitoneally). Animals were subjected to behavioral tests and, at the end of the protocol, euthanized for brain collection for immunohistochemical and molecular analyses. P2X₇ receptor blockade significantly protected the animals against deficits in volatile odor detection, locomotor activity (open field test), motor coordination (rotarod test), depressive-like behavior (sucrose preference test), and working memory (Y-maze test) induced by rotenone exposure. BBG prevented the loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra and striatum, reduced neuroinflammation, and decreased the accumulation of total and phosphorylated α -synuclein. Additionally, BBG modulated autophagic and mitophagic pathways, as evidenced by reduced expression of proteins such as LC3 and PINK1. The effect of BBG occurred by decreasing the number of microglial P2X₇ receptors. The results indicate that rotenone-induced microglial purinergic hyperactivity acts as a multifaceted pathogenic integration center, amplifying neuroinflammation, disrupting autophagic processes, and promoting the accumulation of pathogenic α -synuclein, thereby creating a vicious cycle that culminates in dopaminergic neuronal death. Thus, P2X₇ receptor blockade emerges as a promising therapeutic approach for targeting multiple pathological pathways in PD.

Keywords: Parkinson's disease; BBG; P2X₇ receptors; α -synuclein; autophagy; neuroinflammation

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Sintomas motores e não motores da DP.....	19
Figura 2	– Organização funcional dos núcleos da base.....	20
Figura 3	– Estrutura, dinâmica e patologia da α -sinucleína.....	24
Figura 4	– Subtipos hipotéticos <i>body-first</i> e <i>brain-first</i> de propagação da α -sinucleína na DP.....	28
Figura 5	– Mecanismo molecular da macroautofagia.....	31
Figura 6	– Mecanismos moleculares da mitofagia.....	33
Figura 7	– Estrutura tridimensional trimérica do receptor P2X ₇ e seus sítios de ligação.	39
Figura 8	– Estrutura química do BBG.....	44
Figura 9	– Protocolo Experimental.....	46
Figura 10	– Campo Aberto.....	47
Figura 11	– Rota rod.....	48
Figura 12	– Labirinto em Y.....	50
Figura 13	– O bloqueio dos receptores P2X ₇ pelo BBG protege animais parkinsonianos dos déficits na coordenação motora.....	59
Figura 14	– O bloqueio dos receptores P2X ₇ pelo BBG protege animais parkinsonianos do dano motor.....	60
Figura 15	– O bloqueio dos receptores P2X ₇ pelo BBG protege animais parkinsonianos do déficits olfatório.....	61
Figura 16	– O bloqueio dos receptores P2X ₇ pelo BBG protege animais parkinsonianos do comportamento do tipo depressivo.....	62
Figura 17	– O bloqueio dos receptores P2X ₇ pelo BBG protege animais parkinsonianos do déficit de memória operacional.....	63
Figura 18	– O bloqueio dos receptores P2X ₇ pelo BBG protege animais parkinsonianos da degeneração dopaminérgica.....	66
Figura 19	– O bloqueio dos receptores P2X ₇ pelo BBG protege animais parkinsonianos da astrogliose.....	68
Figura 20	– O efeito do bloqueio dos receptores P2X ₇ pelo BBG sobre a micróglia de animais parkinsonianos.....	69
Figura 21	– O efeito do bloqueio dos receptores P2X ₇ pelo BBG sobre a densidade de TNF- α de animais parkinsonianos.....	70
Figura 22	– O efeito do bloqueio dos receptores P2X ₇ pelo BBG sobre o acúmulo e a deposição de α -sinucleína total.....	72
Figura 23	– O efeito do bloqueio dos receptores P2X ₇ pelo BBG sobre a deposição de deposição de α -sinucleína fosforilada	73
Figura 24	– O efeito do bloqueio dos receptores P2X ₇ pelo BBG sobre a densidade de proteínas das via da autofagia e mitofagia no estriado de animais parkinsonianos.....	76
Figura 25	– O efeito do bloqueio dos receptores P2X ₇ pelo BBG sobre a densidade de proteínas das via da autofagia e mitofagia no mesencéfalo de animais	77

parkinsonianos.....	
Figura 26 O efeito do bloqueio dos receptores P2X ₇ pelo BBG sobre a deposição de ubiquitina	78
Figura 27 - O efeito do BBG sobre a densidade dos receptores P2X ₇ no estriado e mesencéfalo de animais parkinsonianos.....	80
Figura 28 - O efeito do BBG sobre a imunorreatividade dos receptores P2X ₇ no estriado e mesencéfalo de animais parkinsonianos.....	81
Figura 29 - A localização dos receptores P2X ₇ no modelo de parkinsonismo induzido pela exposição a rotenona.....	82
Figura 30 - Ampliação do merged da co-localização dos receptores P2X ₇ no modelo de parkinsonismo induzido pela exposição a rotenona	83
Figura 31 - Resumo gráfico.	102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Grupos Experimentais.....	47
Tabela 2 – Lista de anticorpos primários utilizados no western blotting.....	57
Tabela 3 – Efeito da exposição a rotenona e do antagonismo dos receptores P2X ₇ sobre os níveis de monoaminas (ng/mg tecido) de ratos parkinsonianos.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	microgramas
µl	microlitros
µm	micromolar
5-HT	Serotonina
6-OHDA	6-hidroxidopamina
ADP	adenosina-5'-difosfato
AMBRA1	<i>Activating Molecule in Beclin-1-Regulated Autophagy 1</i>
AMPK	<i>5'AMP-activated protein kinase</i>
ANOVA	Análise de variância
ATG	<i>autophagy-related proteins</i>
ATP	Trifosfato de Adenosina
BBG	Brilliant Blue G
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
BECN1	<i>Beclin-1</i>
BNIP3	<i>BCL2-interacting protein 3</i>
BSA	Albumina bovina
Ca ²⁺	Cálcio
CDNF	Fator Neurotrófico Derivado da Dopamina Cerebral
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
cm	centímetros
COMT	Catecol-O-metil transferase
CONCEA	Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal
CSF	líquido cérebro-espinhal
DA	Dopamina
DAB	3,3'-diaminobenzidina
DAMPs	<i>Damage-Associated Molecular Pattern</i>
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DAT	Transportador de dopamina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Doença de Parkinson
ELA	Esclerose lateral amiotrófica

EPM	Erro padrão médio
EUA	Estados Unidos da America
FUNDC1	<i>FUN14 domain-containing protein 1</i>
GABA	Ácido γ -amino butírico
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
HClO ₄	Ácido pérclórico
HOPS	<i>Homotypic fusion and vacuole protein sorting</i>
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
Hsc70	Heat Shock Cognate Protein 70
i.p.	Intraperitoneal
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IDH	Índice de Desenvolvimento Humano
IL-1 β	Interleucina-1 β
IP3	Trifosfato de inositol
K ⁺	Potássio
LIR	<i>LC3-interacting region</i>
MAO	Monoamina oxidase mg miligrama
MHC II	Complexo principal de histocompatibilidade II
mL	mililitro
mM	milimolar
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidroxipiridina
mTOR	<i>mechanistic target of rapamycin</i>
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
Na ⁺	Sódio
NADH	nicotinamida adenina dinucleotídeo desidrogenase
NDP52	<i>calcium-binding and coiled-coil domain 2</i>
NE	noradrenalina
NF- κ B	Fator nuclar kappa B
NIX	NIP-3-like protein X
NMDA	N-Metil-D-Aspartato
NPDM	Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos
p62/SQSTM1	<i>Sequestosome 1</i>
PBS	Tampão fosfato com salina 0,9%

PE	<i>fosfatidiletanolamina</i>
PI3P	<i>fosfatidilinositol 3-fosfato</i>
PIK3C3	<i>phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit type 3</i>
PINK1	<i>Phosphatase and tensin homologue (PTEN)-induced kinase 1</i>
PPADS	Ácido piridoxal-5'-fosfato-6-azofenil-2',4'-dissulfônico
RB1CC1	<i>RB1 inducible coiled-coil 1</i>
REM	<i>Rapid Eyes Movement</i>
RNAm	Ácido Ribonucléico mensageiro
ROS	Espécies reativas de oxigênio
rpm	rotações por minuto
SNARE	<i>Soluble NSF Attachment Receptor</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periferico
SNpc	Substância negra parte compacta
SPF	<i>Specific pathogen free</i>
SUS	Sistema Único de Saúde
TA	Temperatura ambiente
TBS-T	Tampão Tris-salina com 0,1% de Tween 20
TGF- β 1	fator transformador de crescimento beta 1
TH	Tirosina hidroxilase
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
UDP	uridina-5'-difosfato
UFC	Universidade Federal do Ceará
ULK1	<i>unc-51 like autophagy activating kinase 1</i>
UTP	uridina-5'-trifosfato
VMAT2	transportador vesicular de monoaminas 2
VPS15	<i>phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 4</i>
WIPI	<i>β-propellers that bind polyphosphoinositides</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
±	Mais ou menos
®	Marca registrada
°	Graus
α	Alpha
β	Beta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	16
2.1	A doença de Parkinson	16
2.1.1	<i>Epidemiologia</i>	16
2.1.2	<i>Etiologia</i>	17
2.1.3	<i>Os sintomas e a Fisiopatologia da DP</i>	18
2.1.3.1	<i>a Inflamação na DP</i>	21
2.1.3.2	<i>α-sinucleína e a DP</i>	23
2.1.3.3	<i>A disfunção autofágica na DP</i>	29
2.1.4	<i>Os Tratamentos para DP</i>	28
2.1.5	<i>Os modelos animais de DP</i>	35
2.1.5.1	<i>O modelo de DP induzido pela rotenona</i>	35
2.2	O sistema purinérgico e o ATP	36
2.2.1	<i>Os receptores P2X₇ e a DP</i>	38
2.2.2	<i>O Brilliant Blue G</i>	42
3	OBJETIVOS	44
3.1	Objetivos gerais	44
3.2	Objetivos específicos	44
4	MATERIAS E MÉTODOS	45
4.1	Animais	45
4.2	Drogas	45
4.3	Protocolo Experimental	45
4.4	Testes comportamentais.....	47
4.4.1	<i>Avaliação da atividade locomotora (Teste do Campo Aberto)</i>	47
4.4.2	<i>Avaliação da coordenação motora (Teste do Rota rod)</i>	48
4.4.3	<i>Avaliação da detecção de cheiros voláteis (Teste de procura do pellet de comida enterrado)</i>	48
4.4.5	<i>Avaliação do comportamento do tipo depressivo (Teste de preferência por Sacarose)</i>	49
4.4.6	<i>Avaliação da memória operacional (Teste do Labirinto em Y)</i>	49
4.5	Dosagem de monoaminas por HPLC	50
4.6	Análises imunohistopatológicas	50

4.6.1	<i>Imunomarcacão para tirosina hidroxilase</i>	51
4.6.2	<i>Imunomarcacão para GFAP</i>	52
4.6.3	<i>Imunomarcacão para iba-1</i>	52
4.6.4	<i>Imunomarcacão para α-sinucleína fosforilada</i>	53
4.6.5	<i>Imunomarcacão para α-sinucleína ubiquitina</i>	54
4.6.6	<i>Imunomarcacão para P2X₇</i>	55
4.6.7	<i>Co-localizacão dos receptores P2X₇/TH, P2X₇/GFAP, P2X₇/CD11b.....</i>	55
4.7	Western blotting	56
4.8	Análise estatística	57
5	RESULTADOS	58
5.1	O bloqueio dos receptores P2X₇ pelo BBG protege animais parkinsonianos dos déficits motores.....	58
5.2	O bloqueio dos receptores P2X₇ pelo BBG protege contra déficits olfatórios de animais parkinsonianos.....	61
5.3	O bloqueio dos receptores P2X₇ pelo BBG protege animais parkinsonianos do comportamento do tipo depressivo induzido pela rotenona.....	62
5.4	O bloqueio dos receptores P2X₇ pelo BBG protege animais parkinsonianos do déficit de memória operacional induzido pela rotenona.....	63
5.5	O bloqueio dos receptores P2X₇ pelo BBG protege animais parkinsonianos da degeneração dopaminérgica.....	64
5.6	O bloqueio dos receptores P2X₇ pelo BBG protege animais parkinsonianos da neuroinflamação.....	67
5.7	O efeito do bloqueio dos receptores P2X₇ pelo BBG sobre o acúmulo e a deposição de α-sinucleína.....	71
5.8	Efeito do Bloqueio dos Receptores P2X₇ pelo BBG na regulacão de proteínas autofágicas e mitofágicas.....	75
5.9	O efeito do BBG sobre a densidade e localizacão dos receptores P2X₇ em animais parkinsonianos.....	79
6	DISCUSSÃO	84
7	CONCLUSÃO	100
	REFERÊNCIAS	101

1 INTRODUÇÃO

A Doença de Parkinson (DP) é uma desordem neurodegenerativa progressiva multissistêmica, caracterizada pela perda progressiva e irreversível de neurônios dopaminérgicos mielinizados na substância negra *pars compacta* (SNpc) resultando na redução gradual nos níveis de dopamina estriatal, conduzindo a sintomas motores e não motores (Krawczuk, 2024 ; Yuan, 2021). A DP é a segunda condição neurodegenerativa mais comum no mundo, e nos últimos 30 anos, sua incidência e prevalência globais aumentaram mais de 150%, (Ou et al., 2021), afetando cerca de 0,3% da população mundial e mais de 1% das pessoas acima de 60 anos atualmente (Telarović, 2023 ; Yu et al., 2022).

A presença e o acúmulo de proteínas aberrantes, assim como de organelas disfuncionais, são comumente observados em doenças neurodegenerativas (Lizama & Chu, 2021). Em situações não patológicas, essas proteínas e organelas disfuncionais são direcionadas à degradação autofágica por lisossomos por meio de diferentes vias (Abyad, 2020; Raza, Anjum & Shakeel, 2019; Simon, Tanner & Brundin, 2020). De fato a desregulação do sistema autofágico desempenha um papel crítico na fisiopatologia da DP, com pacientes apresentando o acúmulo de mitocôndrias defeituosas dentro dos autofagossomos em neurônios dopaminérgicos (Anglade et al., 1997) e a presença de α -sinucleína aberrante em neuritos e corpúsculos de Lewy (Fonseca-Ornelas et al., 2021).

Estudos *in vitro* demonstraram que a neurotoxicidade da α -sinucleína envolve a participação dos receptores purinérgicos P2X₇, coma exposição à α -sinucleína aberrante induzindo a hiperatividade desses receptores, levando à liberação exacerbada de ATP (Wilkaniec et al., 2017), estresse oxidativo, redução da atividade autofágica e ao acúmulo de mitocôndrias disfuncionais (Wilkaniec et al., 2020).

Considerando que pacientes com DP apresentam a hiperexpressão sistêmica P2X₇, associada à exacerbação do inflamasoma NLRP3, e ao aumento dos níveis circulantes de α -sinucleína e à redução de marcadores associados à autofagia (Solini et al., 2020), o uso de antagonistas dos receptores P2X₇, como o *Brilliant Blue G* (BBG) tem despertado interesse como estratégia terapêutica promissora da doença.

Embora estudos anteriores tenham apontado o potencial neuroprotetor do BBG (Carmo et al., 2014), ainda são escassos os trabalhos que investigam seus efeitos quando administrado em fases iniciais após início da progressão da doença e com foco específico nas vias de acúmulo de α -sinucleína e disfunção autofágica.

Dessa forma, investigamos o efeito neuroprotetor do antagonismo dos receptores P2X₇ por meio da administração de BBG em uma fase prodrômica, com foco em seu impacto sobre o acúmulo de α -sinucleína e a disfunção das vias autofágicas, em um modelo experimental de parkinsonismo induzido por rotenona. Para isso, foram avaliados parâmetros comportamentais, neuroquímicos, e moleculares, a fim de elucidar os mecanismos pelos quais a modulação dos receptores P2X₇ pode interferir no curso da neurodegeneração dopaminérgica.

Os resultados obtidos reforçam o papel central e multifacetado dos receptores P2X₇ na patogênese do parkinsonismo, e fornecem evidências de que sua inibição, mesmo após o início do processo degenerativo, é capaz de atenuar a neuroinflamação, disfunção autofágica/mitofágica e de acúmulo de α -sinucleína, promovendo proteção estrutural e funcional ao sistema nigroestriatal, mostrando que o bloqueio dos receptores P2X₇, pode servir como uma abordagem terapêutica promissora no controle de múltiplas vias patológicas da DP.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A doença de Parkinson

Em 1817, o clínico geral inglês James Parkinson descreveu pela primeira vez a Doença de Parkinson (DP) em seu ensaio intitulado “*An Essay on the Shaking Palsy*” como uma doença de início insidioso, curso progressivo e incapacitante, caracterizada por tremor de repouso, postura flexionada e festinação (Obeso et al., 2017). Em 1861, o francês Jean-Martin Charcot descreveu e acrescentou a bradicinesia e a rigidez como características principais da doença (Walusinski, 2018).

Dois séculos após sua identificação, muitas incertezas sobre a DP ainda persistem. Atualmente, a doença é definida como uma desordem neurodegenerativa multissistêmica, caracterizada pela perda progressiva e irreversível de neurônios dopaminérgicos mielinizados na substância negra *pars compacta* (SNpc) resultando na redução gradual nos níveis de dopamina estriatal, e pela deposição aberrante de proteínas mal dobradas, como α -sinucleína, em neuritos de Lewy e corpúsculos de Lewy, conduzindo a sintomas motores e não motores (Krawczuk, 2024 ; Yuan, 2021).

2.1.1 Epidemiologia

A DP é a segunda condição neurodegenerativa mais comum no mundo, ficando atrás apenas da Doença de Alzheimer. Nos últimos 30 anos, sua incidência e prevalência globais aumentaram em 159% e 155%, respectivamente (Ou et al., 2021). Atualmente, a DP afeta cerca de 0,3% da população mundial e mais de 1% das pessoas acima de 60 anos (Telarović, 2023 ; Yu et al., 2022), sendo considerada a doença neurológica de crescimento mais rápido globalmente (Deuschl et al., 2020). Em 2019, foram atribuídas 329 mil mortes à DP, um aumento de 100% em relação ao ano 2000 (WHO, 2022).

Embora a maior prevalência de DP seja observada na Europa, em estreita relação com o Índice de Desenvolvimento Humano (IDH), o maior aumento de casos ocorre em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento. Esse crescimento é atribuído ao aumento da expectativa de vida, impulsionado pelos avanços da medicina nesses locais (Ben-Shlomo et al., 2024 ; Zhu et al., 2024).

No Brasil, mesmo com subnotificação, o censo de 2010 estimou cerca de 220 mil pessoas vivendo com DP, com uma incidência anual de 36 mil novos casos (IBGE, 2012).

Dados recentes do Sistema de Informação sobre Morbidade Hospitalar do Sistema Único de Saúde (SUS) apontam um aumento progressivo nas internações por DP entre 2021 e 2023, com maior prevalência entre homens e nas regiões Sul e Sudeste do país (Trinca et al., 2024). Uma metanálise de dados prévios estimou uma taxa de prevalência de 15 casos para cada 1.000 habitantes no Brasil (Zhu et al., 2024).

Homens são mais afetados pela DP do que mulheres. A taxa de prevalência masculina (129,33 por 100.000 habitantes) é quase o dobro da observada entre mulheres (87,59 por 100.000). Além disso, os homens apresentam quase o dobro da taxa de mortalidade por complicações da DP (6,66 contra 3,51 por 100.000) (Chen et al., 2023).

2.1.2 Etiologia

Apesar do rápido crescimento da DP, sua etiologia ainda não está completamente elucidada, apresentando um caráter multifatorial. A forma familiar, de origem genética, representa apenas de 5% a 10% dos casos, enquanto a forma esporádica, não familiar, é a mais prevalente, correspondendo de 90% a 95% dos casos. Esta última parece envolver uma interação complexa entre fatores genéticos e ambientais e o envelhecimento. (Simon et al., 2020).

O envelhecimento continua sendo o principal fator de risco para a DP, com um aumento significativo na prevalência, que passa de 41 para 1.900 casos a cada 100.000 indivíduos entre os 60 e os 80 anos, respectivamente (Telarović, 2023). Isso parece estar relacionado ao fato de que o envelhecimento envolve fenômenos semelhantes aos observados na fisiopatologia da DP, como alterações na função de núcleos dos gânglios da base, diminuição de neurônios dopaminérgicos, que parecem ser mais suscetíveis aos efeitos do envelhecimento, além da deposição de proteínas citoplasmáticas, disfunção mitocondrial, inflamação, comunicação intercelular alterada e senescência celular (Chen et al., 2022 ; Drori et al., 2022 ; Rocha et al., 2024).

Existem sete genes relacionados à forma monogenética da DP e entre eles, destaca-se o *SNCA*, que codifica a α -sinucleína, e o *LRRK2*, que codifica a dardarina, ambos com herança autossômica dominante. Outros genes, como o *VPS35*, que codifica a proteína vacuolar VPS35, e o *RAB32*, que codifica a GTPase RAB32 da família Rab, também apresentam herança autossômica dominante. Além disso, há os genes *PRKN*, que codifica a Parkin, *PINK1*, que codifica a quinase mitocondrial induzida por PTEN, e *PARK7/DJ-1*, que codifica a proteína DJ-1, os quais apresentam herança autossômica recessiva. É importante destacar que o gene *GBA1*,

que codifica a β -glucocerebrosidase, tem se mostrado um dos principais fatores de risco genéticos para o desenvolvimento da DP e da demência dos corpúsculos de Lewy (Khani et al., 2024 ; Lim ; Klein, 2024).

Diante do crescente aumento da DP e da baixa incidência de sua forma familiar, os fatores ambientais parecem desempenhar um papel significativo na etiologia da forma esporádica da doença. Nas últimas décadas, evidências têm se acumulado, reforçando a ideia de que o risco de desenvolver DP é modulado por fatores ambientais (Ball et al., 2019). Entre eles, a exposição a pesticidas se destaca como o principal. Estudos indicam uma alta prevalência de parkinsonismo entre trabalhadores rurais, demonstrando uma relação estreita a exposição à esses produtos e o aumento do risco de desenvolvimento da doença (Ball et al., 2019).

Além disso, outros fatores também se destacam, como lesões traumáticas no cérebro, exposição a metais como ferro e manganês, poluentes do ar e infecções virais. O estilo de vida também exerce influência, uma vez que a prática de exercícios físicos, o consumo de café e o hábito de fumar parecem estar associados a um menor risco de desenvolvimento da doença em algumas populações (Huang et al., 2022 ; Mercado et al., 2024 ; Ullah et al., 2021 ; Yuan et al., 2021).

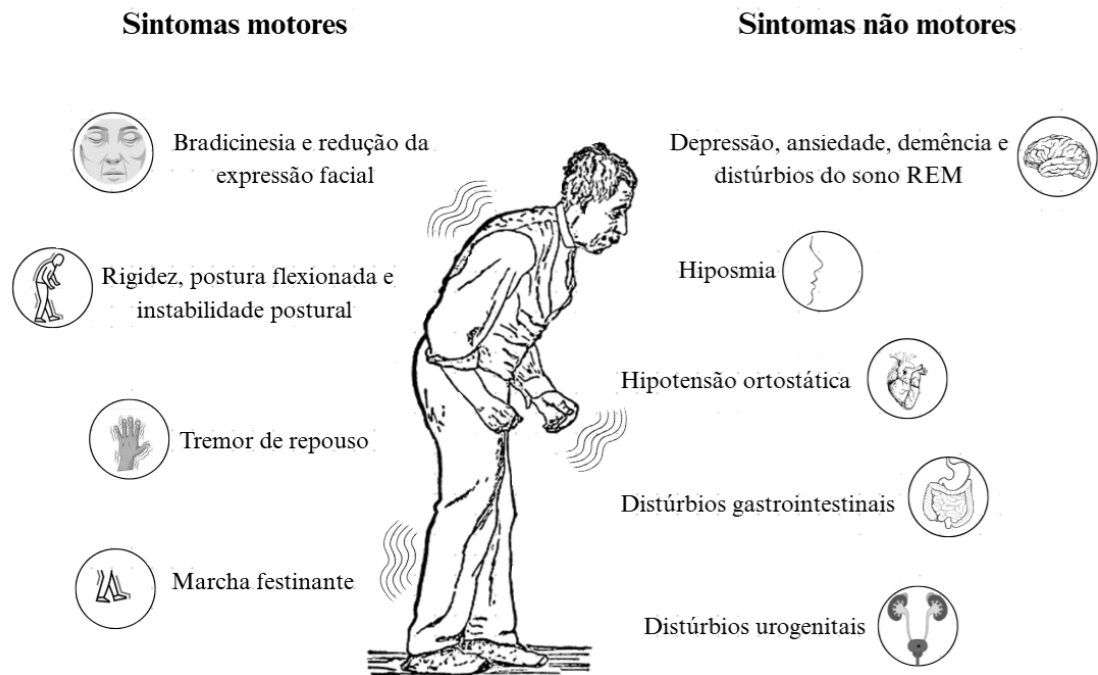
Um indício da influência ambiental na DP surge em estudos com imigrantes provenientes de regiões com menor prevalência da doença, como África e Japão. Esses indivíduos apresentam uma maior prevalência de DP em comparação aos grupos étnicos residentes em seus países de origem, sugerindo que a exposição a fatores ambientais nos países de destino pode ser um elemento relevante no aumento do risco (Ben-Shlomo et al., 2024).

Um número crescente de estudos aponta para o sinergismo entre fatores genéticos e ambientais, no qual a predisposição genética modula o risco individual em resposta à exposição a toxinas ambientais. Por exemplo, no desenvolvimento de modelos animais, os animais portadores de mutações em *GBA1* são particularmente vulneráveis a exposição à pesticidas como o 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina (MPTP) ou rotenona em comparação ao portadores do gene na sua forma selvagem (Bogers et al., 2023).

2.1.3 Os sintomas e a Fisiopatologia da DP

Na prática clínica, a DP é caracterizada principalmente pela presença de rigidez muscular e tremor, considerados os sinais cardinais da doença. Outros sintomas comuns incluem marcha festinante, redução da expressão facial e postura flexionada (Kandel, 2014) (Figura 1).

Figura 1. Sintomas motores e não motores da DP.

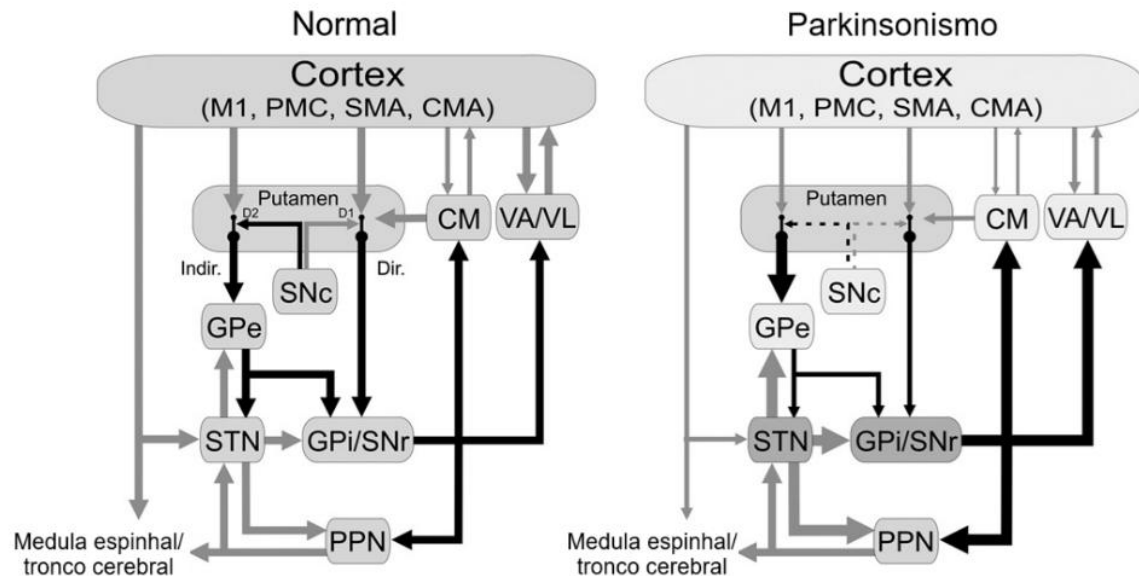


Fonte: Adaptado de (Gowers, 1899)

Esses sintomas resultam principalmente da morte progressiva dos neurônios dopaminérgicos mielinizados da parte compacta da Substância Negra (SNpc) que se projetam para o estriado. A consequente redução nos níveis de dopamina compromete a integridade da via dopaminérgica nigroestriatal, fundamental para a iniciação do movimento voluntário (Balestrino ; Schapira, 2020 ; Costa et al., 2023).

A diminuição da dopamina afeta a atividade das vias motoras, reduzindo a atividade das vias inibitórias diretas e aumentando a atividade das vias excitatórias indiretas que convergem para o globo pálido interno. Isso resulta em inibição predominante do tálamo, comprometendo a funcionalidade da via corticotalâmica, essencial para o controle motor voluntário (Figura 2) (Graybiel et al, 1994). Tais alterações contribuem para sintomas como bradicinesia, rigidez muscular, instabilidade postural e anormalidades na postura (Bergman ; Deuschl, 2002).

Figura 2. Organização funcional dos núcleos da base



CM: núcleo centromediano do tálamo; CMA: área motora do cíngulo; Dir.: via direta; D1 e D2: subtipos de receptores de dopamina; GPe: segmento externo do globo pálido; GPi: segmento interno do globo pálido; Indir.: via indireta; M1: córtex motor primário; PMC: córtex pré-motor; PPN: núcleo pedunculopontino; SMA: área motora suplementar; SNc: substância negra pars compacta; SNr: substância negra pars reticulata; STN: núcleo subtalâmico; VA: núcleo ventral anterior do tálamo; VL: núcleo ventrolateral do tálamo. As setas pretas indicam conexões inibitórias e as setas cinzas indicam conexões excitatórias e a espessura das setas corresponde à intensidade da atividade. **Fonte:** (Galvan & Wichmann, 2008).

Além dos sintomas motores, a DP também apresenta um amplo espectro de manifestações não motoras, como hiposmia e anosmia, constipação intestinal, retardo no esvaziamento gástrico, depressão, ansiedade, distúrbios do sono REM (*Rapid Eyes Movement*), demência, disfunções geniturinárias e sexuais, hipotensão ortostática, disfagia e sialorreia (Balestrino ; Schapira, 2020). A fisiopatologia dessas manifestações não motoras vai além da disfunção dopaminérgica, uma vez que elas demonstram pouca ou nenhuma resposta à reposição de dopamina. Essas alterações envolvem disfunções em múltiplos sistemas monoaminérgicos, afetando regiões como o tronco encefálico e o córtex, além da deposição de α -sinucleína em áreas fora dos gânglios da base, como o bulbo olfatório e o trato gastrointestinal (Aarsland et al., 2021 ; Gu et al., 2024 ; Song et al., 2023 ; Takeda et al., 2014). Alterações na via dopaminérgica mesolímbica, que se origina na área tegmental ventral no mesencéfalo e projeta-se ao *núcleo accumbens*, parte do estriado dorsal, são responsáveis pelas alterações de humor, como apatia, anedonia e depressão, observadas na doença, principalmente na fase prodrômica da doença (Fuente-Fernández, 2013 ; Hammes et al., 2019 ; Nyberg et al., 2015).

A DP idiopática pode ser dividida em quatro estágios distintos. A **fase de risco** ocorre antes do início da neurodegeneração, sendo indicada pelo acúmulo de ferro na substância negra. No **estágio pré-clínico**, a neurodegeneração começa a se manifestar, mas sem sintomas clínicos evidentes. A **fase prodrômica** é caracterizada pelo aparecimento dos primeiros sinais de neurodegeneração, como distúrbio do sono REM, hiposmia e disfunção autonômica, os quais podem ser detectados por meio de marcadores de imagem do sistema dopaminérgico pré-sináptico. Finalmente, o **estágio clínico** é caracterizado pela neurodegeneração significativa e pela sinucleinopatia nigroestriatal, o que leva ao desenvolvimento de bradicinesia, tremor em repouso e/ou rigidez (Berg et al., 2021 ; Rees et al., 2024).

A fase prodrômica precede o estágio clínico por um período de 10 a 20 anos e tem sido amplamente estudada na pesquisa clínica sobre a DP, com investigações focadas em marcadores clínicos, como distúrbio do sono REM e hiposmia, e biomarcadores, incluindo análises de imagem do sistema nigroestriatal, do transportador de dopamina (DAT), nigrosoma-1 e neuromelanina, além de níveis de alfa-sinucleína patogênica no líquido cefalorraquidiano e na pele (Katunina et al., 2023 ; Mahlknecht et al., 2022 ; Theis et al., 2024). Recentemente, também se tem investigado biomarcadores no sebo (Sarkar et al., 2022). O principal objetivo das pesquisas nesta fase é compreender os mecanismos patológicos subjacentes à doença e testar terapias que possam modificar sua progressão, com o intuito de atrasar ou prevenir o início do estágio clínico.

As causas exatas da morte neuronal na DP permanecem não elucidadas, diversos eventos celulares e moleculares parecem estar envolvidos. Entre eles, destaca-se a deposição citoplasmática de proteínas insolúveis, como a α -sinucleína e a ubiquitina, que levam à formação dos corpúsculos de Lewy, um dos principais achados fisiopatológicos da doença. Além disso, disfunção mitocondrial, estresse oxidativo, neuroinflamação e alterações nos mecanismos de descarte e dobramento de proteínas desempenham papéis significativos na progressão da doença (Simon et al., 2020).

2.1.3.1 A Inflamação na DP

A neuroinflamação é uma resposta imune natural do sistema nervoso central (SNC) a estímulos patogênicos ou danos teciduais, com o objetivo de proteger o SNC, promover o reparo dos tecidos e restaurar a homeostase local. No entanto, a ativação crônica ou exacerbada das células imunes e liberação continuada de mediadores inflamatórios pode resultar em um

desequilíbrio nos processos neuroquímicos, comprometendo a função neuronal e levando à morte celular (Zhang, 2023).

A neuroinflamação desempenha um papel central na fisiopatologia da DP tanto em sua forma esporádica como a familiar. Essa resposta inflamatória, que envolve tanto o SNC quanto no sistema nervoso periférico (SNP) (Eser, 2024), está relacionada à superativação da micróglia e dos astrócitos (Knott; Wilkin; Stern, 1999 ; McGeer et al., 1988), à liberação de citocinas pró-inflamatórias (Reale et al., 2009), óxido nítrico (Gatto et al., 2000), prostaglandinas (Corwin et al., 2018), ao aumento de linfócitos T reativos no SNP (Fischer et al., 1994) e ao aumento das moléculas do Complexo Maior de Histocompatibilidade II (MHCII) no SNC e no SNP (Kurkowska-Jastrzebs et al., 1999), criando um ambiente neurotóxico que perpetua a neuronal.

A micróglia é a principal mediadora da resposta imune inata do SNC, atuando como os macrófagos residentes do cérebro. Essas células constituem a primeira linha de defesa contra danos e infecções e desempenham um papel crucial na fisiopatologia da DP (Grotemeyer, 2022). Exames *post mortem* e análises do líquido cérebro-espinhal (CSF) de pacientes com DP demonstram a presença de microgliose (Knott et al., 1999) e níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (Mogi et al., 1994), interleucinas-1 β (IL-1 β), IL-2, IL-4, IL-6 (Mogi et al., 1996) e o fator transformador de crescimento beta 1 (TGF- β 1) (Mogi et al., 1995).

A micróglia parece ser inicialmente ativada em resposta à presença de agregados extracelulares de α -sinucleína (Austin et al., 2006; Hoffmann et al., 2016) e outros componentes intracelulares provenientes da morte de neurônios dopaminérgicos, como adenosina trifosfato (ATP), DNA mitocondrial, proteínas de choque térmico e espécies reativas de oxigênio (ROS) que atuam como DAMPs (*Damage-Associated Molecular Pattern*) (Minchev et al., 2022). Além disso, mutações genéticas associadas à doença de Parkinson, como DJ-1 (*PARK7*), *PINK1*, *SNCA*, *GBA1* e *ATG5*, têm sido relacionadas à interferência na habilidade da micróglia de recuperar a viabilidade e a função neuronal (Yao et al., 2021). Uma vez ativadas, as micróglias liberam mediadores inflamatórios que não apenas causam danos diretos aos neurônios dopaminérgicos, cuja morte libera mais DAMPs no meio extracelular, mas também promovem a ativação de mais micróglias e astrócitos, criando um ciclo vicioso de inflamação e morte celular agravando a progressão da doença (Kam, 2020).

Estudos mais recentes apontam que a micróglia parece aumentar o número de conexões intercelulares, facilitando a transferência de α -sinucleína e mitocôndrias entre micróglias doadoras e receptoras em uma tentativa de resgate, aumentando a eliminação dessa proteína e resgatando micróglias disfuncionais, no entanto esse mesmo mecanismo também parece estar

envolvido no espalhamento da α -sinucleína do SNP para SNC, por meio de um transporte de glia a glia (Chakraborty et al., 2023 ; Scheiblich et al., 2021).

Os astrócitos são o tipo mais abundante de célula glial no SNC, exercendo funções essenciais para o funcionamento do SNC, atuando na regulação sináptica e neuronal, no suporte metabólico de neurônios, na integridade na barreira hematoencefálica e no fluxo sanguíneo cerebral, e desempenham um papel multifacetado na fisiopatologia da DP (Chiareli et al., 2021). Pacientes com DP apresentam astrócitos reativos (Knott et al., 1999) associado a níveis reduzidos de fatores neurotróficos, como o BDNF (fator neurotrófico derivado do cérebro) (Hernández-Vara et al., 2020) e o CDNF (fator neurotrófico derivado da dopamina cerebral) (Virachit et al., 2019), além de níveis elevados de citocinas inflamatórias (Mogi et al., 1996) e alterações no metabolismo do glutamato (Gerlach et al., 1996), conforme evidenciado em análises *post mortem* e no líquido CSF.

Os astrócitos podem ser ativados para um perfil inflamatório via citocinas pró-inflamatórias secretadas pela micróglia (Liddel et al., 2017), agregados de α -sinucleína (Chou et al., 2021), disfunção mitocondrial e frente a mutações genéticas ligadas a DP (Kim, 2023). Uma vez ativados, esses astrócitos perpetuam o ciclo inflamatório ao liberar citocinas pró-inflamatórias, ativar micróglias e comprometer o metabolismo do glutamato (Rosenberg; Aizenman, 1989; Szpakowski et al, 2022) , criando um ambiente neurotóxico para os neurônios dopaminérgicos. Além disso, a ativação dos astrócitos reduz o suprimento de fatores neurotróficos e antioxidantes, prejudicando a capacidade de reparo neuronal e agravando a degeneração neuronal (Wang et al., 2023).

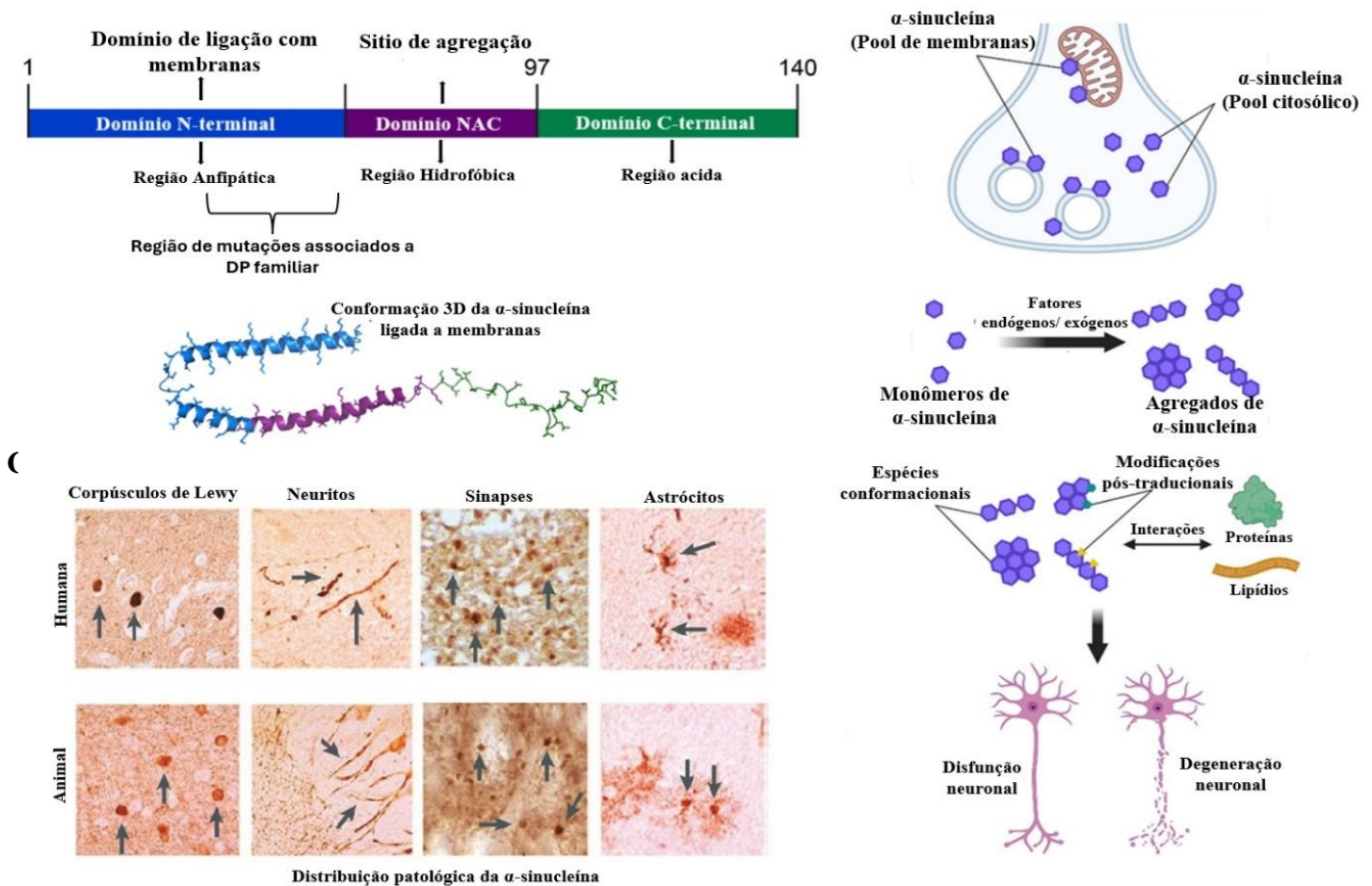
2.1.3.2 α -sinucleína e a DP

Os corpúsculos de Lewy são o principal achado histopatológico da doença da DP. Eles consistem em inclusões citoplasmáticas eosinofílicas formadas por proteínas mal dobradas e insolúveis, localizadas no corpo celular, nos axônios e nos dendritos de neurônios dopaminérgicos (Hartmann, 2004). Esses corpúsculos são constituídos principalmente de α -sinucleína, mas também contém uma ampla variedade de outras proteínas, incluindo ubiquitina, Parkin e tau, PINK1 entre diversas outras (Galloway; Bergeron; Perry, 1989 ; Leverenz et al., 2007 ; Murakami et al., 2007 ; Schlossmacher et al., 2002 ; Xia et al., 2008; Koeglsperger et al., 2023), essas proteínas estão em geral inadequadamente fosforiladas, truncadas e ubiquitinadas (Goodheart ; Blackstone, 2024).

A α -sinucleína é um proteína de 140 aminoácidos altamente carregados, sem estrutura

3D estável, expressa predominantemente no núcleo e em terminais pré-sinápticos de neurônios, mitocôndrias, retículo endoplasmático e sistema lisossomal por todo o SNC (Tanaka et al., 2019 ; Yang et al., 2022) (Figura 3), existindo num equilíbrio entre a forma citosólica solúvel desestruturada, um estrutura rica em α -hélices ligadas a membranas fosfolipídicas e uma estrutura rica em folhas β , propensa a oligomerizar e formar fibrilas (Holec et al., 2022).

Figura 3. Estrutura, dinâmica e patologia da α -sinucleína.



Estrutura da α -sinucleína (A). Função fisiológica e dinâmica de modificações da α -sinucleína formando agregados e inclusões que levam a degeneração neuronal (B). Presença de inclusões de α -sinucleína em tecido nervoso humano e animal. **Fonte:** Adaptado de (Burré et al., 2024 ; Holec et al., 2022 ; Lashuel et al., 2012).

A função fisiológica dessa proteína ainda não é completamente elucidada, mas acredita-se que ela participe na mediação de funções fisiológicas envolvidas na atividade e plasticidade sinápticas, liberação de neurotransmissores (Sharrad; Gai; Brookes, 2013), metabolismo da dopamina, manutenção do pool de reserva de vesículas sinápticas (Wang et al., 2014) e transporte vesicular na sinapse, atuando em processos como ancoragem, preparação, fusão à membrana plasmática (Wang et al., 2018) e curvatura das vesículas, mediando essas funções por meio da sua ampla capacidade de interação com membranas e diversas proteínas (Li ; Dettmer, 2024 ; Sharma ; Burré, 2023) (Figura 3). Entre essas, destacam-se a interação com as proteínas envolvidas no carregamento de vesículas, como o transportador vesicular de monoaminas 2 (VMAT2) (Phan et al., 2017), e as proteínas associadas ao processo de exocitose, como a Rab3a (Lv et al., 2022). Além disso, interage com a sinaptobrevina-2, juntamente com outras proteínas do complexo SNARE (*Soluble NSF Attachment Receptor*), que desempenham um papel fundamental na modulação e promoção da formação desse complexo (Burré et al., 2010).

A α -sinucleína é particularmente importante na regulação da transmissão dopaminérgica, uma vez que ela é responsável por controlar a síntese de dopamina através da ligação com a enzima tirosina hidroxilase (TH) (Perez et al., 2002), do carregamento dessa monoaminas nas vesículas através do VMAT2, bem como a recaptção de dopamina através da reciclagem do DAT (Wersinger; Sidhu, 2003; Nordengen ; Morland, 2024). Essa proteína também parece estar envolvida em outras diversas funções, como a diferenciação neuronal, regulação dos níveis de glicose e de ácidos graxo poli-insaturado, supressão de apoptose, e desempenhar atividade antioxidante e de chaperona (Emamzadeh et al., 2016).

As mutações no gene *SNCA*, que codifica a α -sinucleína, foram as primeiras alterações genéticas associadas à forma familiar da DP. Atualmente, diversas mutações pontuais, ou seja a troca de um único aminoácido, assim como duplicações e triplicações desse gene, já foram descritas e estão associadas ao aumento da produção da proteína (Magistrelli et al., 2021). Pacientes com mutações pontuais patogênicas, como *G51D*, *A53E* e *A53T*, além de duplicações e triplicações do *SNCA*, apresentam início precoce da DP, com parkinsonismo severo e demência. Por outro lado, mutações pontuais como *A30P* e *H50Q* também levam ao início precoce da doença, porém com sintomas mais parecidos aqueles observados da DP idiopática (Y. Guo et al., 2021). Além do *SNCA*, mutações em genes associados à forma monogênica da DP, como *GBA*, *Parkin*, *PINK1*, *DJ-1* e *LRRK2*, também estão relacionadas ao aumento da produção e ao mau dobramento da α -sinucleína (Brockmann et al., 2021).

O acúmulo de α -sinucleína mutante e sua deposição em corpúsculos de Lewy são aspectos fisiopatológicos fundamentais tanto na forma familiar quanto na idiopática da DP. O papel central desses agregados e da α -sinucleína mal dobrada na fisiopatologia da doença, cada vez mais evidente com o avanço das tecnologias de biomarcadores, redefiniu a DP como uma doença neuronal associada à α -sinucleína, em vez de uma síndrome clínica (Simuni et al., 2024).

O aumento dos níveis de α -sinucleína mutante é amplamente conhecido por estar relacionada à disfunção sináptica e morte neuronal progressiva por diferentes vias de patogenicidade ainda não completamente elucidadas.

Níveis elevados de α -sinucleína patogênica, devido a sua maior capacidade de interação com membranas lipídicas, causam desordens nos terminais sinápticos, alterando o tamanho dos pools de vesículas e prejudicando seu tráfego. A interação alterada com proteínas do complexo SNARE afeta processos essenciais como ancoragem, fusão e reciclagem das vesículas, comprometendo a liberação de neurotransmissores e a comunicação neuronal (Diao et al., 2013 ; Phan et al., 2017 ; Sharrad et al., 2013 ; Sun et al., 2019 ; Wang et al., 2018 ; Wang et al., 2014) . Além disso, a superexpressão de α -sinucleína aumenta a permeabilização das membranas, prejudicando o armazenamento de neurotransmissores e a integridade das membranas plasmática, mitocondrial e do retículo endoplasmático (Bridi ; Hirth, 2018 ; B. Li ; Dettmer, 2024).

As mitocôndrias têm sido apontadas como um dos principais alvos do dano induzido pelo acúmulo e agregação de α -sinucleína, uma vez que essas condições provocam alterações funcionais e morfológicas nas mitocôndrias (Geibl et al., 2023). O aumento de α -sinucleína no interior das mitocôndrias compromete a função do complexo I da cadeia respiratória, prejudicando a produção de ATP e resultando em uma crise bioenergética e acúmulo de espécies reativas de ROS (Hsu et al., 2000). O estresse oxidativo subsequente exacerba a agregação e a propagação da α -sinucleína, criando um ciclo vicioso de danos celulares oxidativos e acúmulo de α -sinucleína tóxica (La Vitola et al., 2024). Além disso, o acúmulo de α -sinucleína desencadeia a abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial, levando ao comprometimento do equilíbrio iônico e ao vazamento de citocromo C, o que culmina na morte neuronal (Choi et al., 2022). A mitofagia, processo pelo qual mitocôndrias defeituosas são seletivamente eliminadas, também é inibida pelos níveis elevados de α -sinucleína (Kinnart et al., 2024).

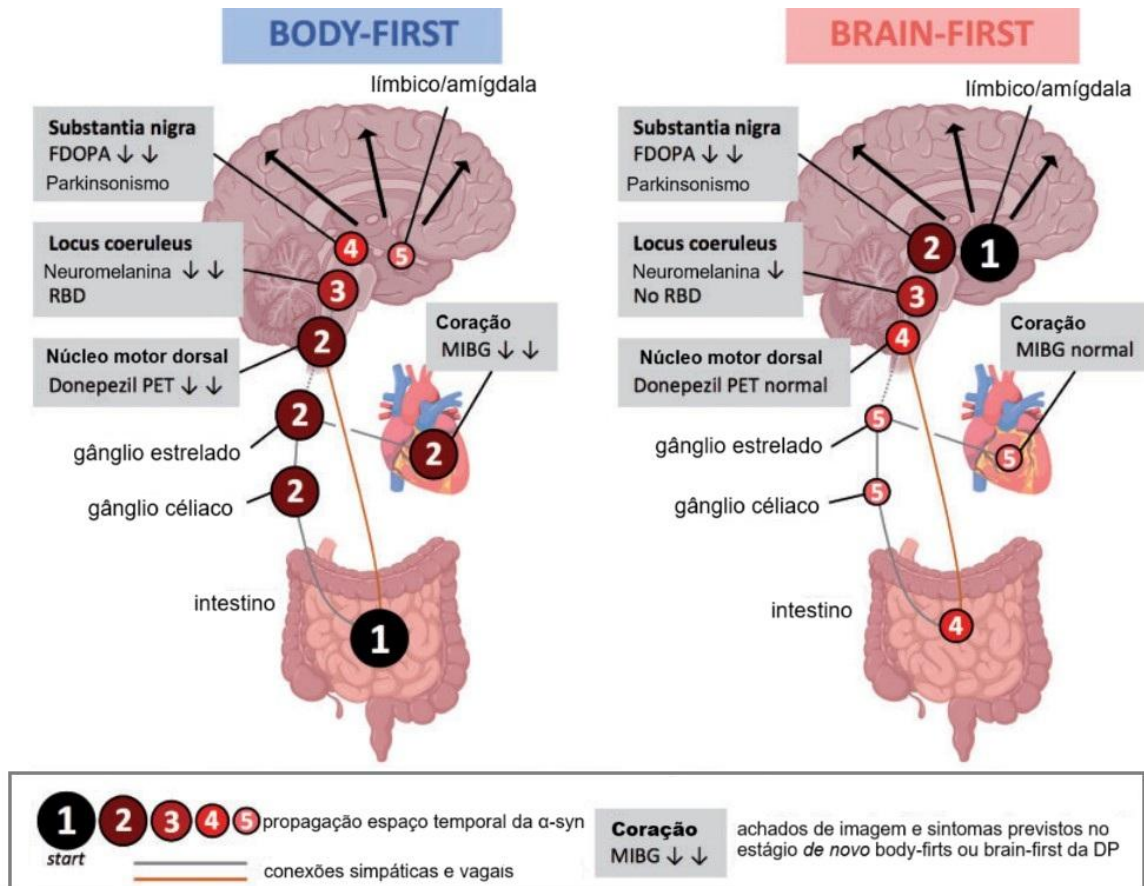
Os neurônios dopaminérgicos são particularmente vulneráveis ao acúmulo de α -sinucleína patogênica devido à sua extensa arborização axonal e ao grande número de terminais sinápticos, associados a potenciais de ação largos, atividade rítmica lenta, baixa capacidade

intrínseca de tamponamento de Ca^{2+} e níveis elevados de Ca^{2+} citosólico (Calabresi et al., 2023). Esses fatores resultam em uma alta demanda energética, tornando-os especialmente suscetíveis à disfunção mitocondrial e ao estresse oxidativo induzidos pela α -sinucleína. Além disso, a interação direta da α -sinucleína com a enzima TH reduz a síntese de dopamina, enquanto sua interferência com o VMAT2 compromete o armazenamento da dopamina em vesículas sinápticas. Simultaneamente, o aumento do efluxo de dopamina mediado pelo DAT contribui para a disfunção da sinalização dopaminérgica, exacerbando a degeneração neuronal (Pedersen et al., 2021 ; Xu et al., 2002 ; J. Zhang et al., 2021).

A propagação da α -sinucleína se dá célula-a-célula entre células da glia e neurônios se espalhando no modelo “príon like” (Wu ; Schekman, 2024) e dois modelos de disseminação inicial dos agregados dessa proteína definem subtipos clínicos distintos da DP. No modelo “*brain-first*”, a degeneração neuronal tem início no SNC, particularmente no bulbo olfatório ou na amígdala, propagando-se posteriormente para os núcleos da base antes do comprometimento significativo do sistema nervoso autônomo. Pacientes com esse perfil apresentam neurodegeneração assimétrica, resultando em sintomas motores assimétricos e menor comprometimento autonômico na fase inicial da doença (Borghammer; Van Den Berge, 2019; Horsager; Knudsen; Sommerauer, 2022) (Figura 4). No entanto, esse subtipo pode ser subdividido em dois padrões de progressão: um que envolve comprometimento precoce das áreas límbicas e pré-frontais, levando a demência, distúrbios do humor e alucinações em fases avançadas; e outro, mais brando, caracterizado pelo predomínio de sintomas motores tremor-dominantes e menor impacto cognitivo (Horsager et al., 2020 ; Mastenbroek et al., 2024).

Já no modelo “*body-first*”, a patologia origina-se no sistema nervoso periférico, especificamente no sistema nervoso entérico, e se propaga ao SNC de forma mais simétrica através do nervo vago (Braak et al., 2003) (Figura 4). Esse subtipo apresenta uma fase prodrômica marcada por disfunção autonômica, distúrbios do sono REM e hiposmia, seguida pelo surgimento de sintomas motores predominantemente simétricos. Esse modelo está associado à progressão típica da doença, conforme descrito por Braak (Borghammer ; Van Den Berge, 2019 ; Mastenbroek et al., 2024).

Figura 4. Subtipos hipotéticos *body-first* e *brain-first* de propagação da α -sinucleína na DP



Os quadros resumem os sintomas previstos e os achados de imagem nos dois subtipos da DP, quando os sintomas motores surgem pela primeira vez. Os círculos numerados representam o ponto de partida e a propagação subsequente da patologia nos dois subtipos. FDOPA: 18F-di-hidroxi-fenilalanina. MIBG: 123I-metaiodobenzilguanidina. PET: tomografia por emissão de pósitrons. RBD: Transtorno comportamental do sono REM. **Fonte:** Adaptado de (Horsager et al., 2020).

Apesar dos avanços tecnológicos e das intensas pesquisas ao longo de mais de um quarto de século, que resultaram em importantes descobertas sobre o papel da α -sinucleína na fisiopatologia e progressão da DP, ainda não há estratégias terapêuticas bem estabelecidas direcionadas a essa proteína. A principal dificuldade reside na instabilidade de sua estrutura e na falta de consenso sobre sua forma patogênica. Estudos indicam que a α -sinucleína pode apresentar toxicidade em diferentes conformações, incluindo sua forma monomérica, oligomérica e fibrilar (Emin et al., 2022 ; Lázaro et al., 2014 ; Sant'Anna et al., 2023 ; Weish et al., 2021). Além disso, análises *post mortem* revelam o acúmulo da α -sinucleína em diferentes conformações nos corpúsculos de Lewy (Weish et al., 2021). Diversas modificações pós-traducionais também têm sido associadas ao ganho de função dessa proteína. Notavelmente,

aproximadamente 90% da α -sinucleína presente nos corpúsculos de Lewy está fosforilada na serina 129, enquanto, em condições fisiológicas, apenas 5% da proteína sofre essa modificação, sugerindo uma relação estreita entre sua fosforilação e sua patogenicidade (Park et al., 2024).

2.1.3.3 A disfunção autofágica na DP

O acúmulo e deposição de proteínas aberrantes bem como de organelas defeituosas são pontos chave da fisiopatologia das doenças neurodegenerativas, que em situação não patológicas são direcionadas para degradação autofágica (Hara et al., 2006; Lizama ; Chu, 2021).

Autofagia é uma via altamente conservada evolutivamente que degrada componentes celulares, como organelas defeituosas e agregados de proteínas mal dobradas, através de lisossomos. Esse processo desempenha funções importantes na sobrevivência celular, homeostase metabólica, inflamação e imunidade, desenvolvimento e diferenciação e está intimamente envolvida na fisiopatologia de diversas doenças (Aman et al., 2021).

Nos mamíferos a autofagia pode ser classificada em três tipos: (1) a macroautofagia, que degrada macromoléculas e organelas defeituosas envolvendo a formação do autofagossomo (Takeshige, 1992); (2) a microautofagia que degrada pequenos componentes citosólico capturados diretamente por invaginação da membrana lisossomal (Ashford & Porter, 1962); (3) a autofagia mediada por chaperonas, que degrada proteínas que contém uma sequência KFERQ e são importadas diretamente para os lisossomos com auxílio da proteína LAMP2 (Cuervo; Dice, 1996; Yamamoto ; Matsui, 2024).

A autofagia pode ser ativada em resposta a diversas condições de estresse, como privação de nutrientes, estresse oxidativo e hipóxia. O mecanismo molecular da autofagia foi inicialmente descrito por Ohsumi em 1999, e é amplamente estudado até hoje. Em resumo esse processo ocorre por meio da inibição do mTOR (*mechanistic target of rapamycin*) ou ativação da AMPK (*5'AMP-activated protein kinase*), que estimulam o complexo ULK1 (Figura 5). Esse complexo é composto pelas proteínas ULK1 (*unc-51 like autophagy activating kinase 1*), RB1CC1/FIP200 (*RBI inducible coiled-coil 1*), ATG13 e ATG101, sendo ativado por fosforilação (Kamada et al., 2000 ; Noda; Ohsumi, 1998; Lu et al, 2022).

Uma vez ativado, o complexo ULK1 estimula a atividade do complexo PIK3C3, formado pelas proteínas PIK3C3 (*phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit type 3*), VPS15 (*phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 4*), BECN1 (*Beclin-1*), ATG14 e AMBRA1 (*Activating Molecule in Beclin-1-Regulated Autophagy 1*) (Liang et al., 1999). Esse

complexo é responsável pela produção de um pool de PI3P (*fosfatidilinositol 3-fosfato*), que recruta as proteínas WIPI (*β -propellers that bind polyphosphoinositides*). Essas proteínas, por sua vez, reciclam vesículas ATG9-positivas e recrutam o complexo ATG12–ATG5–ATG16L1 (E3) (Figura 5) (Funakoshi et al., 1997 ; Kametaka et al., 1998 ; Mizushima et al., 2001).

O complexo E3 medeia, junto com ATG7 e ATG3, a conjugação da proteína LC3, que, antes de ser incorporada à membrana do autofagossomo, é clivada por ATG4 em sua forma citosólica LC3-I. Posteriormente, LC3-I é conjugada à PE (*fosfatidiletanolamina*), originando LC3-II, que participa do alongamento e fechamento do autofagossomo (Kabeya, 2000). LC3-II também serve como ponto de ancoragem para proteínas que possuem motivos LIR (*LC3-interacting region*), como p62/SQSTM1 (*Sequestosome 1*), que se liga a proteínas ubiquitinadas destinadas à degradação (Komatsu et al., 2007) (Figura 5).

A etapa final da autofagia envolve a fusão do autofagossomo com o lisossomo, formando o fagolisossomo. Esse processo é mediado por diversos fatores, incluindo pequenas GTPases, como RAB7, fatores de ancoragem, como o complexo HOPS (*Homotypic fusion and vacuole protein sorting*), e proteínas do complexo SNARE. Após a fusão, o conteúdo do fagolisossomo é degradado por hidrolases lisossomais, e os produtos resultantes podem ser reutilizados pela célula. Por fim, o LC3-II presente na membrana externa do autofagossomo é clivado novamente por ATG4, permitindo sua reciclagem e reinício do ciclo autofágico (Figura 5) (Kametaka et al., 1998 ; Mizushima et al., 1998).

A autofagia é iniciada pelo complexo quinase ULK1, regulado positivamente pela AMPK e negativamente pela mTOR. O complexo ULK1 estimula o complexo BECN1 que produz fosfatidilinositol 3-fosfato (PtdIns3P). Esse lipídio recruta proteínas WIPI, que mobilizam vesículas ATG9 e o complexo ATG5–ATG12–ATG16L1 (E3). A LC3 é clivada por ATG4 em LC3-I, que é conjugada à fosfatidiletanolamina (PE), formando LC3-II. Esta se liga a receptores de autofagia (como p62) acoplados às cargas a serem degradadas. A fusão de autofagossomos com lisossomos ocorre via proteínas RAB, SNARE e o complexo HOPS, permitindo a degradação da carga e a reciclagem dos componentes. A LC3-II da membrana externa é reciclada pela clivagem por ATG4. **Fonte:** adaptado de (Aman et al., 2021).

Sob condições fisiológicas as mitocôndrias defeituosas são destinadas a degradação ou reparo através de um processo de macroautofagia seletivo denominado mitofagia (Lemasters, 2005). A mitofagia pode ser agrupada como dependente de PINK1–Parkin e independente de PINK1–parkin.

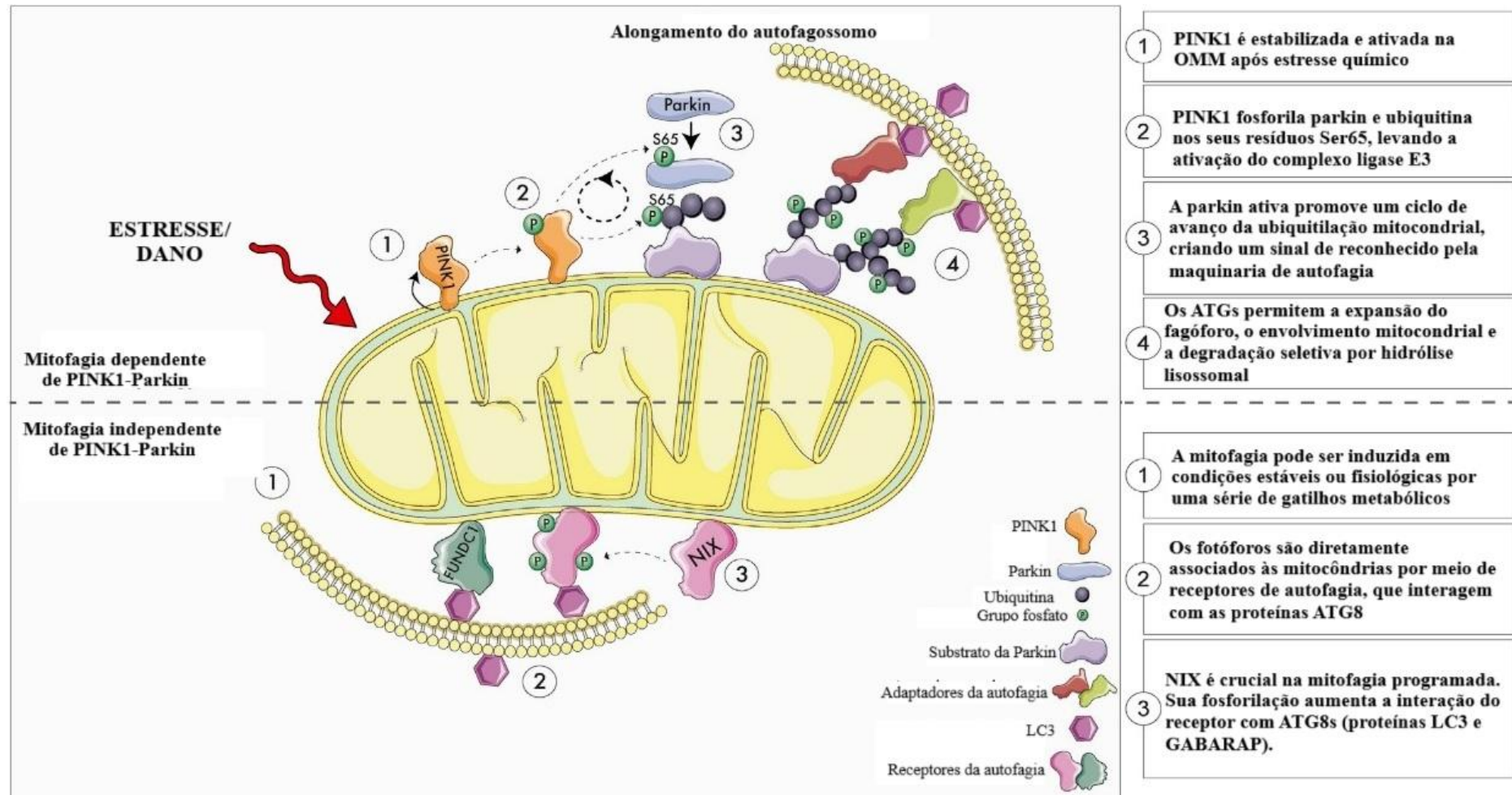
A via dependente PINK1–Parkin envolve a PINK1 (*Phosphatase and tensin homologue (PTEN)-induced kinase1*), localizada na membrana mitocondrial externa, é continuamente clivada e inativada em condições basais. Sob estresse mitocondrial, a redução do potencial de membrana impede sua degradação, permitindo sua acumulação. Isso leva ao recrutamento e fosforilação da ligase de ubiquitina E3 Parkin, que promove a ubiquitinação de proteínas da membrana externa mitocondrial. A PINK1 também fosforila cadeias de fosfo-ubiquitina, que recrutam proteínas adaptadoras, como optineurina e NDP52 (*calcium-binding and coiled-coil domain 2*) (Narendra et al., 2008 ; Valente et al., 2004). A proteína p62 é essencial para a remoção final, facilitando, via LC3, a formação do mitofagossomo, que envolve a mitocôndria e a direciona para degradação nos lisossomos (Rappe ; McWilliams, 2022) (Figura 6).

As vias de mitofagia independentes de PINK1–parkin envolvem fatores como BNIP3 (*BCL2-interacting protein 3*), NIX (NIP-3-like protein X) e FUNDC1 (*FUN14 domain-containing protein 1*), que recrutam LC3 para formar o mitofagossomo. A BNIP3 ajuda na estabilização da PINK1 e tanto BNIP3 quanto NIX podem modular o recrutamento de Parkin, indicando interação entre as vias dependentes e independentes de PINK1–Parkin (Komatsu et al., 2007; D’Arcy, 2024) (Figura 6).

Desregulação do sistema autofágico desempenha um papel central na DP, uma vez que o acúmulo de proteínas mal dobradas e de mitocôndrias defeituosas são características fisiopatológicas preponderantes da doença (Chu et al., 2009). De fato, exames *post mortem* de pacientes com DP revelam a presença de mitocôndrias defeituosas dentro dos autofagossomos em neurônios dopaminérgicos (Anglade et al., 1997), além da formação de agregados proteicos na forma de corpúsculos de Lewy (Tu et al., 2022).

Ao analisar as alterações moleculares em tecidos *post mortem*, observam-se mudanças nos níveis de diversas proteínas-chave da maquinaria de múltiplas vias autofágicas, incluindo aumento de ubiquitina e proteínas ubiquitinadas, LC3, PINK1 e BECN1 envolvidas na macroautofagia e mitofagia, bem como a redução dos níveis de LAMP2 e de chaperonas como Hsc70 (Heat Shock Cognate Protein 70) envolvidas na autofagia mediadas por chaperonas (Toulogre et al., 2016).

Figura 6. Mecanismos moleculares da mitofagia.



OMM: Membrana mitocondrial. **Fonte:** Adaptado de (Rappe ; McWilliams, 2022)

Vários genes envolvidos na etiologia da DP também foram identificados como reguladores da autofagia. Entre eles, os genes *LRRK2* e *DJ-1* que desempenham papéis na regulação da autofagia, mitofagia e autofagia mediada por chaperonas; *PINK1* está envolvido especificamente na regulação da mitofagia; *GBA* e *PARK9* afetam a atividade lisossomal; e *VPS35* atua na fase de nucleação da autofagia (Erekat, 2022). Além disso, mutações no gene *SNCA* resultam na inibição das etapas de nucleação e maturação da autofagia e mitofagia, devido à ação direta da α -sinucleína (Nechushtai et al., 2023).

2.1.4 Os Tratamentos para DP

O tratamento da DP ainda é baseado na melhora dos sintomas, não existindo atualmente medicamentos disponíveis capazes de barrar a progressão da doença. Desde a década de 1960, quando se descobriu a relação entre a perda de dopamina na via nigroestriatal e os sintomas motores, até hoje, o tratamento da DP é essencialmente baseado na reposição dopaminérgica, sendo a levopoda, uma precursora da dopamina, ainda considerada o padrão ouro para o tratamento dos sintomas motores da doença (Stocchi et al., 2024)

Ao longo dos anos outras drogas de ação dopaminérgica começaram a ser utilizadas junto a levodopa, para compensar sua curta meia-vida, assim, fármacos agonistas de receptores dopaminérgicos, como a bromocriptina e piribedil, inibidores da monoamina oxidase B (MAO-B), como a selegilina, que inibem o metabolismo da dopamina no cérebro, como a carbidopa e inibidores da catecol-O-metil transferase (COMT), como o tolcapone, que inibem a degradação da levodopa são amplamente utilizados na clínica da DP (Frazer et al., 2023 ; Tan et al., 2022). Inibidores anticolinérgicos e anti-glutamatergicos também são utilizados no manejo sintomatológico da DP (Höglinger et al., 2024).

Entretando o tratamento baseado na reposição de dopamina pode causar sérios efeitos adversos, como flutuações clínicas e discinesia. A levodopa, por exemplo, leva a flutuações em cerca de 80% dos pacientes após cinco anos, devido ao encurtamento ou inconsistência de seu efeito e 40% desenvolvem discinesia no mesmo período, caracterizada por movimentos involuntários que podem ser mais incapacitantes que a própria doença (Pechevis et al., 2005 ; Stocchi et al., 2008).

Intervenções cirúrgica são utilizadas em casos resistentes a terapia farmacológica, pacientes com flutuações motoras com ou sem discinesia ou tremor refratário, onde geralmente se opta pela estimulação cerebral profunda, que consiste na implantação de eletrodos,

geralmente núcleo subtalâmico ou no globo pálido interno, no que geram impulsos elétricos de alta frequência, entretanto sua indicação é restrita e sua eficácia a longo prazo limitada (Barbosa et al., 2024 ; Oehr et al., 2024 ; Rajamani et al., 2024).

O tratamento dos sintomas não motores da DP ainda possui um manejo limitado, utilizando abordagem farmacológica diversas, que podem incluir uso de antidepressivos, antipsicóticos, ansiolíticos e medicamentos para melhorar o sono, função cognitiva e diurese (Seppi et al., 2019). As intervenções não farmacológicas, como a fisioterapia, terapia ocupacional, terapia cognitivo-comportamental e fonoaudiologia, também desempenham papéis importantes no manejo dos sintomas da DP, auxiliando na melhora da mobilidade, comunicação, deglutição, depressão e ansiedade (Stocchi et al., 2024).

2.1.5 Os modelos animais de DP

O avanço progressivo da DP ressalta a importância dos modelos animais, que desempenham um papel essencial no aprofundamento do conhecimento sobre a etiologia e a complexa fisiopatologia da doença. Além disso, esses modelos são fundamentais para a investigação e o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para a DP.

A maioria dos modelos da DP é desenvolvida em roedores e primatas não humanos, sendo classificados em três principais categorias: modelos induzidos por exposição a neurotoxinas, como MPTP, 6-Hidroxidopamina (6-OHDA) e pesticidas agrícolas, como rotenona e paraquat; modelos farmacológicos, que utilizam fármacos com ação no sistema dopaminérgico, como a reserpina e o haloperidol; e modelos genéticos, baseados em mutações em genes associados à forma familiar da DP, como *SNCA*, *LRRK2*, *DJ-1*, *PINK-1* e *Parkin* (Lal et al., 2024).

2.1.5.1 O modelo de DP induzido pela rotenona

O modelo de DP induzido pela rotenona foi inicialmente proposto por Greenamyre e colaboradores nos anos 2000. Eles demonstraram que a exposição crônica à rotenona leva ao desenvolvimento de comportamento hipocinético e rigidez, associados à degeneração dopaminérgica nigroestriatal seletiva, relacionados à inibição do complexo I da cadeia transportadora de elétrons, à formação de inclusões citoplasmáticas fibrilares de ubiquitina e α -sinucleína (Betarbet et al., 2000). Desde então, diversos trabalhos explorando a capacidade da rotenona em gerar um modelo robusto de DP foram desenvolvidos.

A rotenona é um potente inibidor do complexo I da cadeia transportadora de elétrons. Devido à sua alta lipossolubilidade, atravessa facilmente a barreira hematoencefálica e as membranas celulares, acumulando-se em organelas intracelulares, como as mitocôndrias (Cenci ; Björklund, 2020). A inibição da cadeia transportadora de elétrons ocorre devido ao bloqueio da transferência de elétrons do complexo I para a ubiquinona, diminuindo a produção de ATP pela enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo desidrogenase (NADH), esse processo aumenta a geração de radicais livres, leva ao acúmulo de ROS e desencadeia estresse oxidativo (Sanders ; Greenamyre, 2013). A crise bioenergética resulta em peroxidação lipídica, entrada excessiva de cálcio na célula e ativação de micróglias e astrócitos, desencadeando um quadro inflamatório (Lawana ; Cannon, 2020). A rotenona também induz agregação citoplasmática de α -sinucleína e sua fosforilação na serina 129 anterior a morte de neurônios dopaminérgicos (Rocha et al., 2022).

Juntos esses achados levam a morte progressiva dos neurônios dopaminérgicos na SN e estriado (Troshev et al., 2022), perda de neurônios noradrenérgico no *locus coeruleus* (Duty ; Jenner, 2011) além de causar danos nas fibras serotoninérgicas estriatais e interneurônios colinérgicos (G. U. Höglinger et al., 2003) resultando em diversas alterações motoras, como hipocinesia, problemas de marcha, coordenação motora alterada e rigidez (Johnson et al., 2019 ; Miyazaki ; Asanuma, 2020) e não motoras como distúrbios gastrointestinais, depressão, hiposmia e distúrbios do sono REM (Babatunde et al., 2023 ; Darbinyan et al., 2017 ; Johnson et al., 2018).

Recentemente nosso grupo caracterizou temporalmente o surgimento de alterações comportamentais e fisiopatológicas em ratos após 21 dias de administração intraperitoneal de uma dose baixa de rotenona (2,75 mg/kg). Observamos déficits motores a partir do 14º dia, associados à degeneração dopaminérgica e ao acúmulo de α -sinucleína patogênica nigroestriatal, características-chave da DP. Além disso, identificamos alterações pré-motoras, como disfunção olfativa e distúrbios gastrointestinais ligados a modificações monoaminérgicas, descrevendo um período pródromo que representa uma oportunidade para investigar os mecanismos iniciais da DP e testar novas estratégias neuroprotetoras (Nascimento et al., 2025).

2.2 O sistema purinérgico e o ATP

O sistema purinérgico é um mecanismo de sinalização extracelular que utiliza purinas e pirimidinas como moléculas sinalizadoras. Sua ação ocorre por meio de receptores específicos, conhecidos como receptores purinérgicos. Esse sistema foi descrito pela primeira vez em 1972

pelo fisiologista Geoffrey Burnstock, que propôs o papel do ATP como neurotransmissor (Z. Huang et al., 2021).

As purinas, como ATP, adenosina-5'-difosfato (ADP) e adenosina, e as pirimidinas, como uridina-5'-trifosfato (UTP) e uridina-5'-difosfato (UDP), são moléculas sinalizadoras amplamente distribuídas nos organismos vivos. Elas surgiram precocemente na história evolutiva e desempenham papéis essenciais na comunicação célula-a-célula, na formação do RNA e DNA, no fornecimento de energia para processos metabólicos e na composição de uma ampla variedade de cofatores (Lazarowski et al, 2011).

O ATP foi selecionado muito cedo na história evolutiva como a principal fonte de energia biológica e molécula sinalizadora, tornando-se uma característica essencial da vida e estando amplamente presente em todos os tecidos dos organismos vivos, participando de mais reações químicas que qualquer outra molécula, com exceção da água (Burnstock ; Verkhratsky, 2009).

Como mensageiro químico, o ATP é liberado de forma controlada por células vivas através de diversos mecanismos fisiológicos, incluindo exocitose, difusão por canais de membrana e transporte mediado por proteínas (Lazarowski et al., 2011) bem como é liberado por células danificadas ou mortas, funcionando como um sinal precoce e universal de dano celular (Rodrigues et al., 2015). Após a liberação, o ATP sofre rápida degradação enzimática pelas ectonucleotidases, e seus metabólitos, como a adenosina, que também atuam como mensageiros fisiológicos (Deaglio ; Robson, 2011)

O ATP também exerce um papel fundamental como neurotransmissor e cotransmissor na maioria dos nervos do sistema nervoso central e periférico, estando presente em todos os tipos de vesículas sinápticas, sozinho ou empacotado com outros neurotransmissores como acetilcolina, noradrenalina e glutamato (Kennedy, 2021a; Sperlágh ; Vizi, 1996).

No sistema nervoso periférico, o ATP atua como neurotransmissor excitatório ou inibitório. No sistema nervoso central, media correntes sinápticas excitatórias e funciona como cotransmissor e modulador pré e pós-sináptico, muitas vezes após sua degradação em adenosina. Também age como gliotransmissor, mediando ondas de Ca^{2+} entre astrócitos e participando da sinalização neurônio-glia. Além disso, atua regulando a microgliose, a astrogliose e a resposta inflamatória, desempenhando um papel essencial na imunomodulação e na remodelação tecidual (Abbracchio et al., 2009; Burnstock, 2009; Sperlágh ; Illes, 2007).

O ATP extracelular exerce sua função através dos receptores purinérgicos do tipo P2, que são divididos em dois subtipos, os receptores metabotrópicos P2Y e os receptores inotrópicos P2X (Burnstock ; Kennedy, 2011).

Os receptores P2Y são receptores que respondem a purinas e pirimidinas, de resposta mais lenta, acoplados a proteína G e subdivididos em receptores acoplados a proteína $G_{\alpha/11}$, que compreendem os receptores P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆ e P2Y₁₁, os receptores acoplados a $G_{\alpha_{i/o}}$, P2Y₁₂, P2Y₁₃ e P2Y₁₄ e o receptor P2Y₁₁ acoplado a proteína G_{α_H} (Erlinge, 2011 ; Kennedy, 2021b). Os receptores P2Y estão presentes em células epiteliais e endoteliais, plaquetas, células imunológicas, osteoclastos, cérebro, túbulos renais, osteoblastos, placenta, baço, timo, células epiteliais das vias respiratórias e intestino, além de células T e micróglia ativada (Burnstock, 2018).

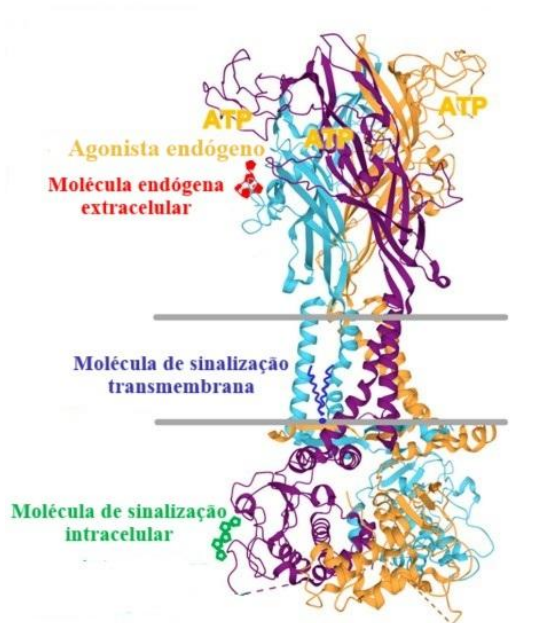
Os receptores P2X são canais iônicos de resposta rápida que compreendem os receptores P2X₁₋₇ (Burnstock ; Kennedy, 2011; Kennedy, 2021b). Os receptores P2X estão amplamente distribuídos no organismo, sendo encontrados no músculo liso, SNC, retina, gânglios autonômicos e sensoriais, pâncreas, neurônios sensoriais e simpáticos, testículos, cólon, intestino, bexiga, timo, coração, medula espinhal e adrenal. Além disso, estão presentes em células endoteliais e células do sistema imune, incluindo células dendríticas, mastócitos, macrófagos e micróglia (Burnstock, 2018).

2.2.1. Os receptores P2X₇ e a DP

Os receptores P2X₇ representam o subtipo mais distinto da família de receptores P2X. Sua configuração funcional é formada por uma estrutura trimérica, composta por três subunidades, cada uma contendo uma longa porção intracelular, duas regiões transmembrana e um longo domínio extracelular em forma de loop com uma longa cauda C-terminal. Esses receptores possuem três sítios de ligação para ATP (Figura 7) e são ativados exclusivamente sob altas concentrações extracelulares desse nucleotídeo, condição que geralmente é associada a processos patológicos ou lesões celulares. (Martínez-Cuesta et al, 2020).

Apesar da resposta molecular à ativação dos receptores P2X₇ ainda não esteja completamente elucidada, sabe-se que na fase inicial da ativação, esses receptores funcionam como canais iônicos seletivos cuja abertura permite o influxo de Na⁺ e Ca²⁺ e o efluxo de K⁺, desencadeando cascatas de sinalização intracelular dependentes de quinases (como as vias das MAP quinases) associadas a processos de proliferação e sobrevivência celular (Ugur ; Ugur, 2019).

Figura 7. Estrutura tridimensional trimérica do receptor P2X₇ e seus sítios de ligação



Fonte: Adaptado de (Martínez-Cuesta et al., 2020)

Contudo, em condições de estímulo prolongado, ocorre uma transição funcional onde os receptores P2X₇ induzem a permeabilização da membrana plasmática mediante a formação de poros de grande diâmetro. Esse fenômeno pode ocorrer tanto pela dilatação estrutural do próprio receptor quanto por sua interação com proteínas acessórias, como a panexina-1. A consequência é a entrada não seletiva de moléculas de até 900 Da, um processo intimamente ligado à ativação da inflamassoma NLRP3, piroptose e exacerbação de dano tecidual em patologias crônicas (Di Virgilio et al., 2019; Di Virgilio et al., 2017).

O gene que codifica o receptor P2X₇ possui 13 éxons e origina 10 isoformas por *splicing* alternativo (designadas de P2X₇A a P2X₇K). Destas, oito são expressas em humanos e quatro em ratos, com a isoforma P2X₇K sendo exclusiva de roedores. A isoforma P2X₇A corresponde à forma canônica e funcionalmente plena do receptor, enquanto as demais apresentam alterações estruturais (como deleções ou truncamentos) que resultam na formação de canais iônicos com funcionalidade distinta – incluindo perda de atividade, modulação alterada ou dominância negativa sobre a isoforma P2X₇A (De Salis et al., 2022 ; Pegoraro et al., 2024).

A formação de heterotrímeros entre os receptores P2X₇ e P2X₄ é descrita na literatura, porém sua relevância funcional permanece controversa. Estudos demonstram que essas subunidades podem interagir fisicamente, no entanto, divergências persistem quanto às

consequências funcionais dessa associação. Enquanto alguns trabalhos identificam propriedades eletrofisiológicas distintas em heterotrímeros, outros estudos não detectam fenótipos funcionais únicos, indicando que os heterotrímeros P2X₄/P2X₇ podem não diferir significativamente dos homômeros em termos de resposta a ATP ou antagonistas (Antonio et al., 2011; Craigie et al., 2013; Guo et al., 2007; Schneider et al., 2017).

Embora sua localização em determinadas regiões cerebrais e tipos celulares seja controversa, o receptor P2X₇ está já foi identificado em diversos tipos celulares, como células-tronco, sanguíneas, gliais, neurais, oculares, ósseas, dentárias, exócrinas, endoteliais, musculares, renais e cutâneas. Sua ativação está associada a processos como o a liberação de glutamato e moléculas pró-inflamatórias, proliferação e morte celular, metabolismo celular e fagocitose (Collo et al., 1997 ; Sluyter, 2017).

Além disso, o P2X₇ desempenha um papel essencial na resposta inflamatória. Em casos de dano celular, ocorre a liberação de ATP para o meio extracelular, cujos níveis elevados ativam esses receptores que estão presentes na superfície de basicamente todas as células do sistema imune, como células dendríticas, osteoclastos e gliais. Essa ativação desencadeia a despolarização celular por meio do influxo de Ca²⁺. O P2X₇ também participa da liberação de interleucinas pró-inflamatórias, como a IL-1 β , e TNF- α sendo um dos mais potentes ativadores do inflamassoma NLRP3, um processo dependente do efluxo de K⁺ e da presença de ATP. Como resultado, há um aumento do perfil inflamatório, maior produção de espécies reativas de oxigênio e indução de estresse oxidativo, culminando na morte celular (Burnstock, 2016 ; Di Virgilio et al., 2017; Wang et al., 2020).

Os receptores P2X₇ têm despertado crescente interesse científico devido ao seu papel central na modulação de processos fisiopatológicos associados a diversas doenças. Sua expressão ampla em regiões cerebrais críticas, como estriado, córtex frontal, hipocampo, amígdala e cerebelo, combinada à participação em cascatas inflamatórias, posiciona esses receptores como alvos promissores para o estudo de patologias neurodegenerativas e psiquiátricas. Entre as condições associadas, destacam-se a DP, a Doença de Alzheimer, a Doença de Huntington, a esclerose lateral amiotrófica (ELA) e a esclerose múltipla, além de transtornos psiquiátricos como esquizofrenia, transtorno bipolar e depressão (Andrejew et al., 2020; Deussing ; Arzt, 2018; Sperlág ; Illes, 2014; Zheng et al., 2024).

O papel do receptor P2X₇ na fisiopatologia da DP tem ganhado cada vez mais evidencia. O polimorfismo rs3751143 no gene do receptor P2X₇, por exemplo, foi identificado como um fator de risco para a forma esporádica da DP (Liu et al., 2013). Além disso, estudos demonstram um aumento na expressão sistêmica desse receptor em pacientes com a doença, associado ao

aumento do inflamassoma NLRP3 e α -sinucleína circulante, sugerindo uma relação direta entre sua ativação e a progressão patológica (Solini et al., 2020).

Em modelos experimentais da DP diversos estudos evidenciam o aumento da expressão e atividade dos receptores P2X₇ e sua associação com eventos patológicos centrais da doença, como neuroinflamação, estresse oxidativo e disfunção mitocondrial. Esses processos, mediados pela hiperativação do P2X₇, culminam na morte dos neurônios dopaminérgicos da substância negra. Além disso, o bloqueio dos receptores P2X₇ demonstra efeitos neuroprotetores, como controle da neuroinflamação, melhora da disfunção sináptica e redução da morte neuronal (Andrejew et al., 2020; Carmo et al., 2014; Crabbé et al., 2019; Friedle et al., 2010; Gao et al., 2011; Jamali-Raeufy et al., 2020; Oliveira-Giacomelli et al., 2019; Wang et al., 2017; Zheng et al., 2024).

Frente ao papel central da α -sinucleína na fisiopatologia da DP, a relação entre essa proteína e os receptores P2X₇ tem sido cada vez mais investigada. Wilkaniec e colaboradores (2017) demonstraram que a neurotoxicidade da α -sinucleína aberrante está diretamente associada à sua interação com os receptores P2X₇. Essa interação induz a ativação dos P2X₇, resultando em mobilização de cálcio em células neuronais e terminais nervosos, liberação exacerbada de ATP e redução da atividade da ecto-ATPase extracelular (Wilkaniec et al., 2017).

Os receptores P2X₇ também desempenham um papel crucial na ativação da micróglia em resposta à exposição à α -sinucleína. A interação entre a α -sinucleína e os receptores P2X₇ desencadeia a estimulação de vias de ativação microglial, resultando em aumento do estresse oxidativo e indução de apoptose e o bloqueio farmacológico dos receptores P2X₇ interrompe essa cascata patogênica (Jiang et al., 2015). Além disso, a estimulação dos P2X₇ pela α -sinucleína está envolvida no estresse oxidativo, na ativação de vias de morte celular programada e na diminuição da expressão da proteína Parkin, levando à inibição da mitofagia e ao acúmulo de mitocôndrias disfuncionais (Wilkaniec et al., 2020).

A ativação dos receptores P2X₇ também pode contribuir para ampliação da patogenicidade da α -sinucleína através da desregulação de vias autofágicas. Apolloni e colaboradores (2021) demonstraram que o bloqueio dos receptores P2X₇ confere ganhos motores em um modelo genético murino de ELA através do controle da inflamação e modulação de marcadores da autofagia como LC3 e p62 (Apolloni et al., 2021).

Além disso, os receptores P2X₇ desempenham um papel na modulação da eliminação de resíduos extracelulares pelas células micróglia e na mediação de danos lisossomais. A ativação dos P2X₇ em micróglia está associada ao aumento da expressão de LC3, fosforilação de AMPK e redução da função lisossomal, o que resulta em retardo na formação e prejuízo na

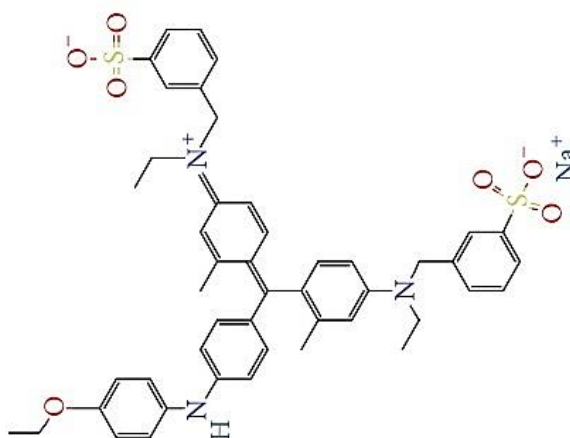
maturação do autofagossomo (Campagno ; Mitchell, 2021 ; Takenouchi et al., 2009) e o bloqueio farmacológico desses receptores restaura a função lisossomal e a autofagia em condições patológicas da micróglia (Fabbrizio et al., 2017).

Os receptores P2X₇ também parecem mediar o controle da mitofagia. Sekar e colaboradores (2018) demonstraram que a ativação farmacológica dos receptores P2X₇ em micróglia induziu a ativação de AMPK dependente de ROS, desregulação de proteínas relacionadas a mitofagia como PINK1 e Parkin, fissão mitocondrial e inibição da função respiratória (Sekar et al., 2018), demonstrando seu papel no controle de qualidade e dinâmica mitocondrial. Contudo, ainda não existem estudos que explorem de forma conclusiva a relação entre os receptores P2X₇, a modulação das vias autofágicas e a deposição de α -sinucleína na DP.

2.2.2 O Brilliant Blue G

O Brilliant Blue G (BBG) é um corante da família dos trifenilmetanos (Figura 8), amplamente utilizado nas indústrias têxtil, alimentícia e cosmética devido à sua baixa toxicidade, intensa coloração azul e bom custo-benefício. Além disso, desempenha um papel importante na pesquisa científica, sendo empregado na quantificação e visualização de proteínas, tanto como componente do reagente de Bradford quanto na eletroforese (Ferreira et al., 2016). Na prática clínica, o BBG é amplamente utilizado em cirurgias oftalmológicas, sendo empregado como corante para auxiliar na remoção da membrana limitante interna durante procedimentos de vitrectomia (Komiya et al., 2022).

Figura 8. Estrutura química do BBG.



Fonte: Ferreira et al., 2016

Na pesquisa biomédica, o BBG é largamente utilizado em estudos experimentais por atuar como um potente inibidor seletivo e não competitivo dos receptores P2X₇, especialmente em ratos (Bin Dayel et al., 2019; Jiang et al., 2000). No entanto, em tecidos humanos, sua atividade e seletividade pelo P2X₇ são menores em comparação com ratos, apresentando interações fracas com outros receptores P2X e canais de sódio (Jiang et al., 2000 ; Jo ; Bean, 2011). Além disso, devido à sua capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica, tem sido amplamente empregado em estudos experimentais para investigar o papel dos receptores P2X₇ em diversas patologias neurológicas e psiquiátricas (Irwin et al., 2016; Abdel-Salam et al, 2022 ; Bartlett et al., 2017; Chen et al., 2014; Ma et al., 2014 ; Ren et al., 2021; Wang et al., 2017).

Nosso grupo já demonstrou previamente o efeito neuroprotetor do antagonismo dos receptores P2X₇ por meio do BBG em um modelo de hemi-parkinsonismo induzido por 6-OHDA, controlando sinaptotoxicidade, neurotoxicidade e gliose (Carmo et al., 2014), bem como a discinesia induzida por L-DOPA (Fonteles et al., 2020).

Assim, diante dos avanços nas tecnologias de biomarcadores e sobre o conhecimento sobre o papel dos receptores P2X₇ na regulação da autofagia e da toxicidade da α -sinucleína, testamos o efeito neuroprotetor do tratamento com BBG iniciado em uma fase tipo prodômica e seu impacto sobre o acúmulo de α -sinucleína e disfunção das vias autofágicas num modelo de parkinsonismo induzido por rotenona.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Investigar o efeito neuroprotetor do antagonismo dos receptores P2X₇ administrado em uma fase prodrômica, com foco em seu impacto sobre o acúmulo de α -sinucleína e a disfunção das vias autofágicas em um modelo experimental de parkinsonismo induzido por rotenona.

3.2 Objetivos específicos

Em animais expostos à administração intraperitoneal subcrônica de rotenona e tratados com BBG, avaliar:

- Alterações comportamentais motoras (atividade exploratória e coordenação motora).
- Alterações comportamentais não motoras: (função olfatória, comportamento depressivo e memória operacional).
- Concentração de monoaminas no bulbo olfatório, estriado e mesencéfalo.
- Degeneração dopaminérgica no estriado e substância negra.
- Neuroinflamação no estriado e substância negra (ativação glial e níveis de TNF- α).
- O acúmulo de α -sinucleína total no estriado e substância negra.
- Deposição de α -sinucleína fosforilada no bulbo olfatório, estriado, substância negra e *núcleo accumbens*.
- Níveis das proteínas da via autofágica LC3, LAMP2, p62 e ubiquitina no estriado e substância negra.
- Níveis de proteínas da via mitofágica PINK1 e parkin no estriado e substância negra.
- O padrão de expressão dos receptores P2X₇.

4 MATERIAS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados ratos *Wistar* albinos (*Rattus norvegicus*) "*specific pathogen free*" (SPF), machos, pesando entre 280-400 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.

4.2 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.

4.3 Protocolo Experimental

Para a indução do parkinsonismo, os animais receberam 2,75mg/kg de rotenona por via intraperitoneal (i.p), diluída em 98% de óleo de girassol e 2% de DMSO (Dimetilsulfóxido), cinco dias por semana, somando 21 dias de aplicação (Cannon et al, 2000).

Para o estudo do efeito do bloqueio dos receptores P2X₇, em ratos parkinsonianos foi administrado 50mg/kg de BBG diluído em solução salina 9% (c), 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 tipo prodrômico (Nascimento et al., 2025).

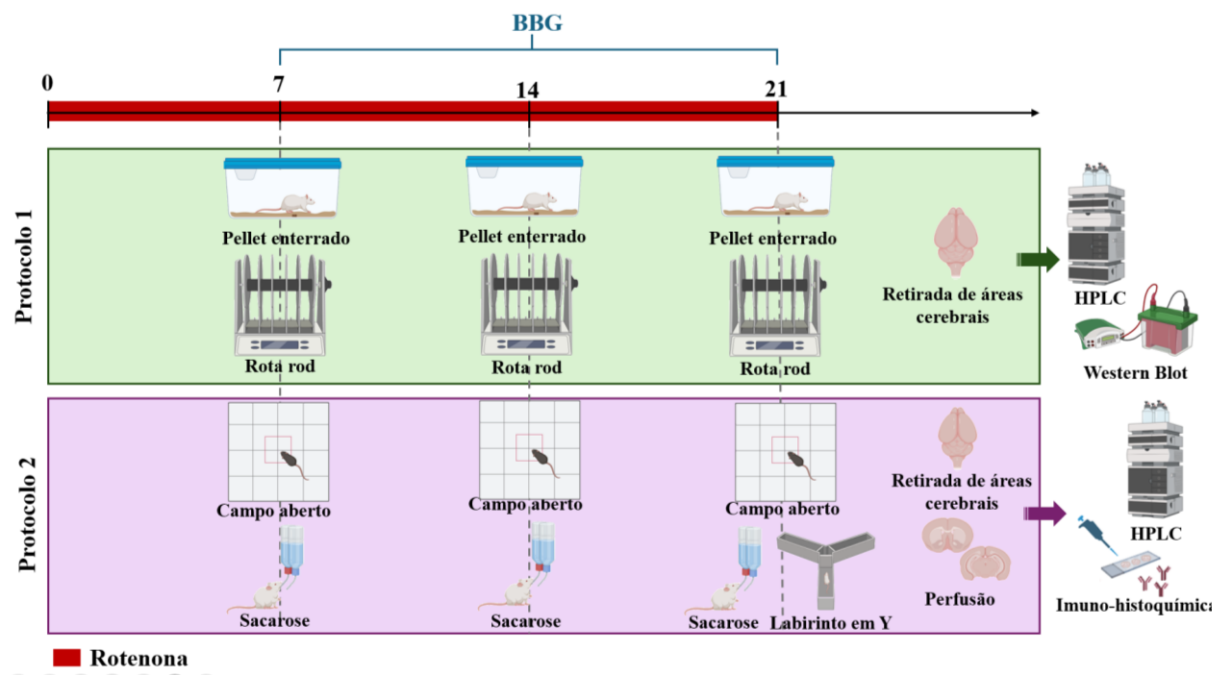
Foram utilizados 84 animais divididos em quatro grupos experimentais de acordo com a tabela 1.

Tabela 1: Grupos Experimentais

GRUPO	PROTOCOLO
Controle (n=20)	Veículo da rotenona (98% de óleo de girassol e 2% de DMSO, 1ml/kg) por 21 dias + veículo do BBG (solução salina 9%) por 15 dias (i.p)
Controle + BBG (n=20)	Veículo da rotenona por 21 dias + 50mg/kg de BBG por 15 dias (i.p)
Parkinsoniano (n=24)	2,75 mg/kg de rotenona (i.p.) por 21 dias + veículo do BBG por 15 dias (i.p)
Parkinsoniano + BBG (n=20)	2,75 mg/kg de rotenona (i.p.) por 21 dias + 50mg/kg de BBG por 15 dias (i.p)

Após 21 dias de administração de rotenona, os animais foram submetidos à testes motores e não-motores subsequentes no 7^a, 14^a e 21^o dias de exposição a rotenona, com exceção do teste de 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 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) e western blotting. No protocolo II, os animais foram submetidos aos testes de campo aberto, preferência por sacarose e labirinto em Y e parte dos animais foram eutanasiados por decapitação para retirada das áreas cerebrais western blotting e outros perfundidos com paraformaldeído 4% para realização da avaliação histopatológica (Figura 9).

Figura 9: Protocolo Experimental



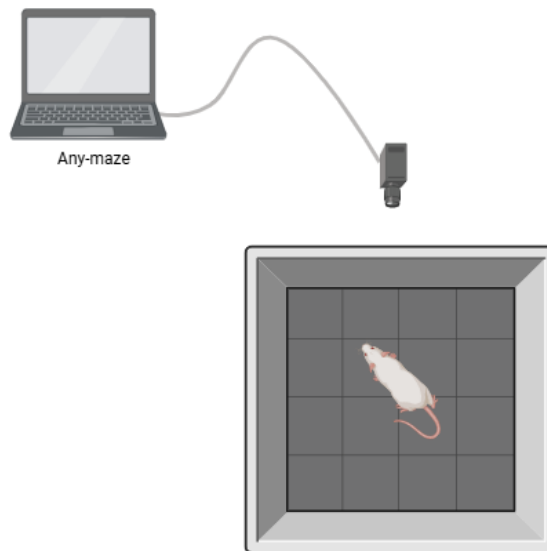
4.4 Testes comportamentais

Todos os testes comportamentais ocorreram entre as 10 e às 17 horas, em condições de luz vermelha de baixa intensidade, entre um animal e outro, aparato foi limpo com uma solução de álcool a 10%, para evitar que o cheiro de urina e fezes interferissem nos testes. O comportamento foi captado em vídeo e analisado em tempo real, ou a posteriori.

4.4.1 Avaliação da atividade locomotora (Teste do Campo Aberto)

O teste do campo aberto avalia a atividade locomotora e exploratória dos animais (Walsh ; Cummins, 1976). O campo aberto consiste em uma arena quadrada de acrílico preto (100cm x 100 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 em tempo real com o software Any-maze (Stoelting Co. EUA) (Figura 10).

Figura 10. Campo Aberto

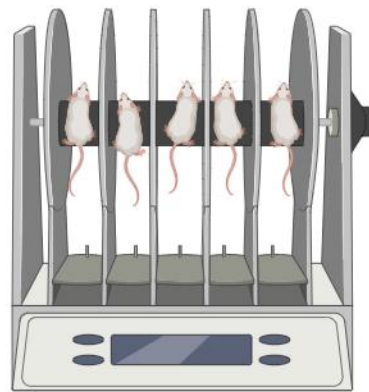


Fonte: Criado com BioRender.com

4.4.2 Avaliação da coordenação motora (*Teste do Rota rod*)

A fim de avaliar a coordenação motora e as alterações de equilíbrio dos animais, foi realizado o teste do rota rod (Padovan-Neto et al., 2009). O aparato do rotarod consiste em uma haste de 30cm de diâmetro dividida em quatro compartimentos de 5cm de largura e 20cm de altura (Figura 11). Os animais foram treinados antes do início da indução do modelo 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 de latência para queda registrado, com tempo de permanência máxima de 120s.

Figura 11. Rota rod.



Fonte: Criado com BioRender.com

4.4.3 Avaliação da detecção de cheiros voláteis (*Teste de procura 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 normalmente utilizado em sua alimentação enterrado na maravalha da gaiola do animal (Liu et al., 2015). Anteriormente ao teste, os animais foram mantidos em jejum por 16 horas, com livre acesso a água. O teste consistiu em enterrar um *pellet* de comida abaixo de 3cm de maravalha, foi então registrado a latência entre a introdução do animal na gaiola e o momento em que o animal tocou o *pellet* com as duas patas dianteiras, com a máxima de permanência de 300 segundos. Uma gaiola com maravalha nova

foi utilizada para cada animal e o local do *pellet* foi trocado a cada repetição do teste a fim de evitar acomodação.

4.4.5 Avaliação do comportamento do tipo depressivo (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 (Papp e al., 1991; Pothion et al., 2004). 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 a seguir:

$$\text{Preferência por sacarose (\%)} = \left(\frac{\text{Ingestão de sacarose} * 100}{\text{Ingestão total}} \right)$$

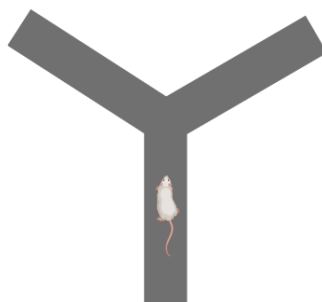
Antes do início do protocolo, os animais passaram por um teste basal, permanecendo no experimento apenas os animais que apresentaram uma preferência por sacarose superior a 60%.

4.4.6 Avaliação da memória operacional (Teste do Labirinto em Y)

Esse teste objetiva avaliar a memória operacional (Sarter et al., 1988). No teste, o animal foi colocado no labirinto contendo três braços, em forma de Y (Figura 12), onde puderam alternar espontaneamente entre 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 (acertos). O resultado foi expresso em porcentagem e obtido através de uma fórmula:

$$\text{Alternação espontâneas (\%)} = \left(\frac{\text{Número de acertos}}{\text{Número total de entradas} - 2} \right) \times 100$$

Figura 12. Labirinto em Y.



Fonte: Criado com BioRender.com

4.5 Dosagem de monoaminas por HPLC

O hemisfério direito do corpo estriado, mesencéfalo e bulbo olfatório frescos, dissecados, foram utilizados para preparar homogenatos a 10%. Os tecidos cerebrais foram sonicados em ácido pérclorico (HClO_4) por 30 segundos e centrifugados por 15 minutos em centrífuga refrigerada a 12000 rpm. O sobrenadante foi então separado e filtrado através de uma membrana (Millipore- 0,2 μm) e uma alíquota de 20 μl foi retirada e injetada no equipamento de HPLC para a análise eletroquímica. Para a análise, uma coluna CLC-ODS (M) com comprimento de 25cm, calibre 4,6mm e diâmetro da partícula de 3 μm da (Shimadzu, Japão) foi utilizada. A fase móvel foi composta por tampão ácido cítrico 0,163M, pH 3,0, contendo ácido octasulfônico sódico, 0,69M, como reagente formados do par iônico, acetonitrila 4% v/v. Dopamina (DA), noradrenalina (NE) e serotonina (5-HT) foram eletricamente detectados usando um detector amperométrico (Modelo L-ECD52 6A da Shimadzu, Japão) pela oxidação em um eletrodo de carbono vítreo fixado em 0,85V relativo a um eletrodo de referência de Ag-AgCl. A partir da área dos picos das soluções com concentrações padrões de DA, 5-HT e NE, as concentrações das amostras foram calculadas e os resultados expressos em $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tecido.

4.6 Análises imunohistopatológicas

Para as análises imunohistoquímicas, os animais foram anestesiados com cetamina (300 mg/kg i.p., Cetamin®, Syntec, Brasil) e xilazina (30 mg/kg i.p., Xilazin®, Syntec, Brasil) e perfundidos com paraformaldeído a 4% em PBS (tampão fosfato 0,1 M contendo salina 0,9 %, pH 7,4). Os cérebros foram removidos, fixados em formol tamponado a 10% por 24 hs e

posteriormente crioprotégidos em sacarose a 30% em PBS a 4° C. Em seguida, o cérebro foi congelado e seções coronais de 30 µm foram preparadas em criostato (Leica CM3050 S, Heidelberg, Alemanha), armazenadas em *free-floating* em solução em solução *anti-freezing* de Walter (etilenoglicol e glicerol em tampão fosfato) a -20°C até análise.

4.6.1 Imunomarcação para tirosina hidroxilase

A tirosina hidroxilase (TH) é uma enzima envolvida na síntese de dopamina e um marcador molecular de neurônios dopaminérgicos. A marcação para TH foi realizada em fatias (30 µm de espessura e espaçamento de 300 µm) representativas do estriado e substância negra. As seções foram lavadas três vezes por 10 minutos com PBS e incubadas com PBS suplementado com 10% de metanol e 1,05% de peróxido de hidrogênio por 40 minutos à temperatura ambiente (TA), para bloqueio de atividades semelhantes à peroxidase endógena. Após três lavagens de 10 minutos com PBS e bloqueio de ligações inespecíficas com 10% de soro normal de cabra em PBS suplementado com Triton X-100 (solução de bloqueio) por 2 horas à TA, as seções foram incubadas durante a noite a 4 °C com anticorpo primário anti-TH (rabbit, 1:200; Sigma-Aldrich, EUA) diluído na solução de bloqueio.

As seções foram então lavadas com PBS e incubadas com polímero marcado com HRP conjugado a anticorpos anti-camundongo e anti-coelho (Dako EnVision + Dual Link System-HRP, Dako, Califórnia, EUA) por 30 minutos à TA e lavadas três vezes por 5 minutos com PBS. O sinal foi revelado com 3,3'-diaminobenzidina (Kit de Substrato de Peroxidase DAB; Dako, Califórnia, EUA). Após secagem, as fatias foram desidratadas em gradiente de etanol e clarificadas com xileno, sendo finalmente cobertas com lamínulas utilizando-se o meio de montagem *entellan* (Merck, Alemanha).

Os cortes foram visualizados no microscópio (Nikon Elipse E200, Nova York, EUA) e a imunorreatividade para TH mensurada pela análise semi-quantitativa da densidade óptica utilizando-se o software Image J (NIH, Bethesda, EUA). Foram utilizados 3 campos, de 3 fatias por animal de 4 animais de cada grupo e feita uma média da densidade ótica para os valores obtidos para o grupo controle e todos os outros foram calculados como percentagem desse valor.

4.6.2 Imunomarcação para GFAP

Para a análise da astrogliose foi empregado o marcador de astrócitos GFAP (*Glial fibrillary acidic protein*). A marcação para GFAP foi realizada em fatias (30 µm de espessura e espaçamento de 300 µm) representativas do estriado e substância negra. As seções foram lavadas três vezes por 10 minutos PBS com 0,1% de Triton-X100 a TA, seguido do bloqueio de ligações inespecíficas com 10% de soro normal de cabra em PBS suplementado com Triton X-100 (solução de bloqueio) por 2 horas à TA, as seções foram incubadas durante a noite a 4 °C com anticorpo primário anti-GFAP (mouse, 1:200; Synaptic Systems, Alemanha).

As fatias foram então lavadas 3 vezes por 10 minutos em PBS com 0,1% de Triton-X100 e subsequentemente incubadas por 2 horas a TA com o anticorpo secundário donkey anti-mouse IgG conjugado com Alexa Fluor 488 (Invitrogen, EUA), diluídos 1:1000 em solução de bloqueio. Após lavar 3 vezes em PBS por 5 minutos cada, os núcleos foram corados com 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) por 15 minutos. Após lavar 3 vezes em PBS as fatias foram montadas em lâmina silanizadas com meio de montagem fluorescente Dako (Dako, EUA).

Os cortes foram visualizados em microscópio de fluorescência (Imager Z2, Zeiss, Alemanha). A quantificação da média de intensidade de fluorescência utilizada para mensurar a imunorreatividade foi calculada através do programa Image J. Foram utilizados 3 campos, de 3 fatias por animal de 4 animais de cada grupo e feita uma média da intensidade de fluorescência para os valores obtidos para o grupo controle e todos os outros foram calculados como percentagem desse valor. O valor de background foi obtido pela realização da técnica sem a presença do anticorpo primário e o valor foi descontado das análises.

4.6.3 Imunomarcação para iba-1

Para a análise da micróglia foi empregado o marcador de micróglia iba-1. A marcação para iba-1 foi realizada em fatias (30 µm de espessura e espaçamento de 300 µm) representativas do estriado e substância negra. As seções foram lavadas três vezes por 10 minutos PBS com 0,1% de Triton-X100 a TA, seguido do bloqueio de ligações inespecíficas com 10% de soro normal de cabra em PBS suplementado com Triton X-100 (solução de bloqueio) por 2 horas à TA, as seções foram incubadas durante a noite a 4 °C com anticorpo primário anti-iba (rabbit, 1:200; WAKO, Japão).

As fatias foram então lavadas 3 vezes por 10 minutos em PBS com 0,1% de Triton-X100 e subsequentemente incubadas por 2 horas a TA com o anticorpo secundário (goat anti-rabbit IgG conjugado com Alexa Fluor 488, 1:1000, Sigma-Aldrich, EUA) em solução de bloqueio. Após lavar 3 vezes em PBS por 5 minutos cada, os núcleos foram corados com DAPI por 15 minutos. Após lavar 3 vezes em PBS as fatias foram montadas em lâmina silanizadas com meio de montagem fluorescente Dako (Dako, EUA).

Os cortes foram visualizados no sistema de imagem multi-espectral *in vitro* Cytation 3 (Biotek, Vermont, EUA). A quantificação do número de células utilizada para mensurar a imunorreatividade foi calculada através do programa Image J. Foram utilizados 3 campos, de 2 fatias por animal de 4 animais de cada grupo e feita uma média para os valores obtidos para o grupo controle e todos os outros foram calculados como percentagem desse valor.

4.6.4 Imunomarcção para ubiquitina

A marcação para ubiquitina foi realizada em fatias (30 µm de espessura e espaçamento de 300 µm) representativas do estriado e mesencéfalo. As seções foram lavadas três vezes por 10 minutos com PBS e incubadas com PBS suplementado com 10% de metanol e 1,05% de peróxido de hidrogênio por 40 minutos à temperatura ambiente (TA), para bloqueio de atividades semelhantes à peroxidase endógena. Após três lavagens de 10 minutos com PBS e bloqueio de ligações inespecíficas com 10% de soro normal de cabra em PBS suplementado com Triton X-100 (solução de bloqueio) por 2 horas à TA, as seções foram incubadas durante a noite a 4 °C com anticorpo primário anti-ubiquitina (rabbit, 1:200, Invitrogen, EUA) diluído na solução de bloqueio.

As seções foram então lavadas com PBS e incubadas com polímero marcado com HRP conjugado a anticorpos anti-camundongo e anti-coelho (Dako EnVision + Dual Link System-HRP, Dako, Califórnia, EUA) por 30 minutos à TA e lavadas três vezes por 5 minutos com PBS. O sinal foi revelado com 3,3'-diaminobenzidina (Kit de Substrato de Peroxidase DAB; Dako, Califórnia, EUA). Após secagem, as fatias foram desidratadas em gradiente de etanol e clarificadas com xileno, sendo finalmente cobertas com laminulas utilizando-se o meio de montagem *entellan* (Merck, Alemanha).

Os cortes foram visualizados no microscópio (Nikon Elipse E200, Nova York, EUA) e a imunorreatividade para TH mensurada pela análise semi-quantitativa da densidade óptica utilizando-se o software Image J (NIH, Bethesda, EUA). Foram utilizados 3 campos, de 3 fatias

por animal de 4 animais de cada grupo e feita uma média da densidade ótica para os valores obtidos para o grupo controle e todos os outros foram calculados como percentagem desse valor.

4.6.5 Imunomarcção para P2X₇

A análise da distribuição dos receptores P2X₇ foi realizada em fatias (30 µm de espessura e espaçamento de 300 µm) representativas do estriado, substância negra e córtex motor. As seções foram lavadas três vezes por 10 minutos PBS com 0,1% de Triton-X100 a TA, seguido do bloqueio de ligações inespecíficas com 10% de soro normal de cabra em PBS suplementado com Triton X-100 (solução de bloqueio) por 2 horas à TA, as seções foram incubadas durante a noite a 4 °C com anticorpo primário (rabbit P2X₇, 1:500; Alomone, Israel).

As fatias foram então lavadas 3 vezes por 10 minutos em PBS com 0,1% de Triton-X100 e subsequentemente incubadas por 2 horas a TA com o anticorpo secundário goat anti-rabbit IgG conjugado com Alexa Fluor 594 (Invitrogen, EUA), diluídos 1:1000 em solução de bloqueio. Após lavar 3 vezes em PBS por 5 minutos cada, os núcleos foram corados com DAPI por 15 minutos. Após lavar 3 vezes em PBS as fatias foram montadas em lâmina silanizadas com meio de montagem fluorescente Dako (Dako, EUA).

Os cortes foram visualizados em microscópio de fluorescência (Imager Z2, Zeiss, Alemanha). A quantificação do número de células utilizada para mensurar a imunorreatividade foi calculada através do programa Image J. Foram utilizados 3 campos, de 2 fatias por animal de 4 animais de cada grupo e feita uma média para os valores obtidos para o grupo controle e todos os outros foram calculados como percentagem desse valor.

4.6.6 Co-localização dos receptores P2X₇/TH, P2X₇/GFAP, P2X₇/CD11b

A localização celular dos receptores P2X₇ foi realizada através de co-localização em fatias (30 µm de espessura e espaçamento de 300 µm) representativas do estriado de animais parkinsonianos. As seções foram lavadas três vezes por 10 minutos PBS com 0,1% de Triton-X100 a TA, seguido do bloqueio de ligações inespecíficas com 10% de soro normal de cabra em PBS suplementado com Triton X-100 (solução de bloqueio) por 2 horas à TA, as seções foram incubadas durante a noite a 4 °C com as combinações de anticorpo primário: anti-TH (rabbit anti-TH, 1:200; Sigma-Aldrich, EUA) e anti - P2X₇ (rabbit P2X₇, 1:500; Alomone, Israel) ou anti-GFAP (mouse GFAP, 1:200; Synaptic Systems, Alemanha). e anti-P2X₇ (rabbit P2X₇, 1:500;

Alomone, Israel) ou ainda anti-Cd11b (mouse, 1:100, Serotec, Luxemburgo) e anti-P2X₇(rabbit P2X₇, 1:500; Alomone, Israel).

As fatias foram então lavadas 3 vezes por 10 minutos em PBS com 0,1% de Triton-X100 e subsequentemente incubadas por 2 horas a TA com o anticorpo secundário goat anti-rabbit IgG conjugado com Alexa Fluor 594 (Invitrogen, EUA), diluídos 1:1000 em solução de bloqueio. Após lavar 3 vezes em PBS por 5 minutos cada, os núcleos foram corados com DAPI por 15 minutos. Após lavar 3 vezes em PBS as fatias foram montadas em lâmina silanizadas com meio de montagem fluorescente Dako (Dako, EUA). Os cortes foram visualizados em microscópio de fluorescência (Imager Z2, Zeiss, Alemanha). Para análise da co-localização foi utilizado o software Image J (NIH, Bethesda, EUA). Foram utilizados 3 campos, de 2 fatias por animal de 4 animais do grupo parkinsoniano e realizada a contagem de todas as células observadas no campo, bem como a contagem da sobreposição do sinal com o receptor P2X₇, para obtenção do percentual de co-localização em relação ao total de células contadas.

4.7 Western blotting

A quantificação de proteínas da via autofágica, mitofágica, proteínas presentes no corpúsculo de Lewy e densidade dos receptores P2X₇ do estriado e do mesencéfalo foi analisada por Western blotting. Para isso os extratos do estriado ou do mesencéfalo foram solubilizados em tampão RIPA (Sigma-Aldrich) suplementado com um coquetel de inibidores de protease (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA). Após a determinação da quantidade de proteína utilizando o método do ácido bicinonínico (Pierce, Thermo Scientific, Massachusetts, EUA), foi adicionado 1/6 do volume de tampão amostra 6x SDS-PAGE (0,5 M Tris-HCl, 40% dodecil sulfato de sódio (v/v), 20% glicerol (v/v) e 10% β-mercaptoetanol), e a eletroforese foi realizada carregada em um gel de SDS-PAGE a 10% ou 14%, com um gel de concentração a 5%, sob condições redutoras.

As proteínas foram então transferidas para membranas de nitrocelulose (GE Healthcare, EUA), que foram bloqueadas por 1 hora à temperatura ambiente (TA) com 5% de albumina sérica bovina (BSA) em tampão Tris (pH 7,6), contendo 0,1% de Tween 20 (TBS-T). As membranas foram então incubadas durante a noite a 4 °C com um anticorpo primário de acordo com a proteína de interesse (Tabela 2) diluído TBS-T contendo 2 ou 5% de BSA. Após três lavagens de 10 minutos com TBS-T, as membranas foram incubadas com o kit Enhanced Chemi-Fluorescence (Thermo Scientific, EUA) e visualizadas em um sistema de imagem

ChemiDoc MP com o auxílio do software ImageLab 6.1 (Bio-Rad, EUA). Para análise, foi feita a relação entre a proteína de interesse e o padrão endógeno (GAPDH), os resultados foram expressos como a média dos controles por membrana.

Tabela 2. Lista de anticorpos primários utilizados no western blotting

Proteína/receptor	Anticorpo	µg de proteína
TNF- α	A11534, Rabbit, 1:1000, Abclonal	20 µg
α -sinucleína	P37840, Rabbit, 1:100, Cell Signale	10 µg
P2X ₇	APR16930, Rabbit, 1:500, Alomone	30 µg
LC3	PA116930, Rabbit, 1:1000, Invitrogen	15 µg
LAMP-2	A0593, Rabbit, 1:1000, Abclonal	60 µg
PINK1	A7131, Rabbit, 1:1000, Abclonal	60 µg
P62	PA520839, Mouse 1:1000, Invitrogen	60 µg
Parkin	PA513399, Rabbit, 1:1000, Invitrogen	40 µg
GAPDH	AC001, Rabbit, 1:10.000, Abclonal	-

4.8 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas pelo Software GraphPad Prism 8.01 (GraphPad Software, Inc.). Inicialmente os dados foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-wilk para verificar se dados apresentam distribuição normal. O conjunto de dados que apresentaram distribuição normal, foram analisados através da Análise de Variância (ANOVA) seguido do teste de Dunnet e dados apresentando como média $\pm$ EPM (erro padrão médio). Os dados que não apresentaram distribuição normal foram analisados através do testes de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn e expressos como mediana $\pm$ intervalo interquartil. Foi considerada a significância quando $P < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 O bloqueio dos receptores P2X₇ pelo BBG protege animais parkinsonianos dos déficits motores

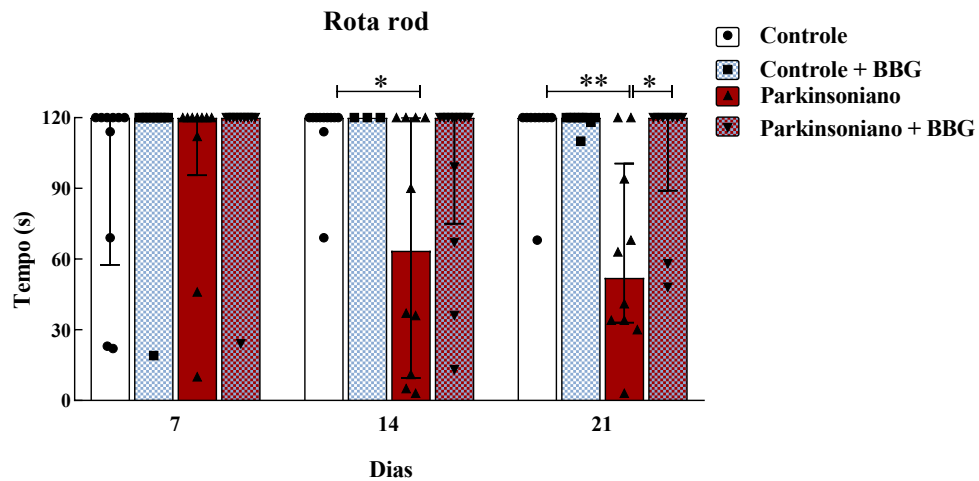
A rotenona induziu déficits progressivos na coordenação motora observado pela diminuição da latência para queda no teste do rotarod a partir do 14^a dia de exposição, em relação aos controles (Controle₁₄: 120,00s (120,00s - 120,00s) vs. Parkinsoniano₁₄: 63,50s (9,050-120,0s), $P < 0,05$ | Controle₂₁: 120,00s (120,00s - 120,00s) vs. Parkinsoniano₂₁: 33,00s (52,00-100,5s), $P < 0,01$).

O bloqueio dos receptores P2X₇ pelo BBG protegeu os animais contra o surgimento de déficits na coordenação motora induzida pela exposição à rotenona, observado pelo aumento da latência para queda no teste do rotarod em relação aos animais parkinsonianos (Parkinsoniano₂₁: 33,00s (52,00-100,5s) vs. Parkinsoniano + BBG₂₁: 89,00s (120,0s - 120,0s, $P < 0,05$.) (Figura 13).

A rotenona também induziu déficits progressivos na atividade locomotora como observado pela diminuição da exploração horizontal (número de crossings: Controle₂₁: $191,9 \pm 17,72$ vs Parkinsoniano₂₁: $136,7 \pm 9,70$, $P < 0,05$.) (Figura 14B), aumento da exploração vertical (número de rearings: Controle₁₄: $9,21 \pm 1,12$ vs. Parkinsoniano₁₄: $3,33 \pm 1,48$, $P < 0,05$.) (Figura 14C), e diminuição da velocidade média (Controle₂₁: $0,17 \pm 0,02$ m/s; Parkinsoniano₂₁: $0,06 \pm 0,01$ m/s, $P < 0,05$) no teste do campo aberto, em relação aos controles.

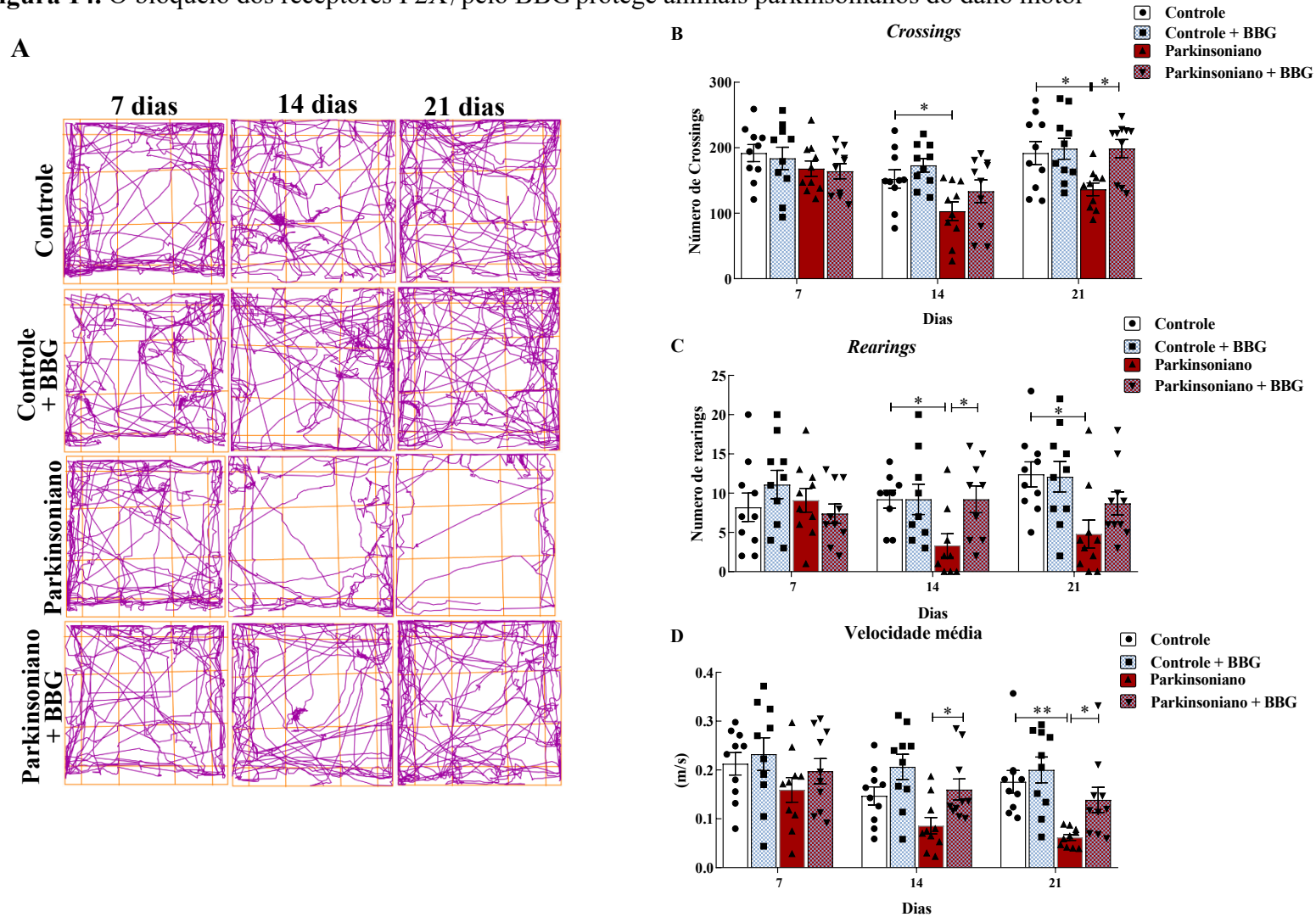
O tratamento com BBG protegeu os animais do desenvolvimento de déficits na atividade locomotora induzida pela exposição a rotenona, como observado pelo aumento do número de *crossings* (número de crossings: Parkinsoniano₂₁: $136,7 \pm 9,70$; Parkinsoniano + BBG₂₁: $198,8 \pm 13,94$, $P < 0,05$.) (Figura 14B), aumento do número de *rearings* (número de rearings: Parkinsoniano₁₄: $3,33 \pm 1,48$; Parkinsoniano tratado₁₄: $9,23 \pm 1,714$, $P < 0,05$.) (Figura 14C), e aumento da velocidade média (Parkinsoniano₂₁: $0,06 \pm 0,01$ m/s; Parkinsoniano tratado₂₁: $0,13 \pm 0,02$ m/s, $P < 0,05$.) (Figura 14D) em relação aos animais parkinsonianos.

Figura 13. O bloqueio dos receptores P2X₇ pelo BBG protege animais parkinsonianos dos déficits na coordenação motora



Avaliação da coordenação motora no teste do rodarod. Os dados são apresentados como valores individuais e mediana $\pm$ intervalo interquartil de 10 ratos. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn.

Figura 14. O bloqueio dos receptores P2X₇ pelo BBG protege animais parkinsonianos do dano motor



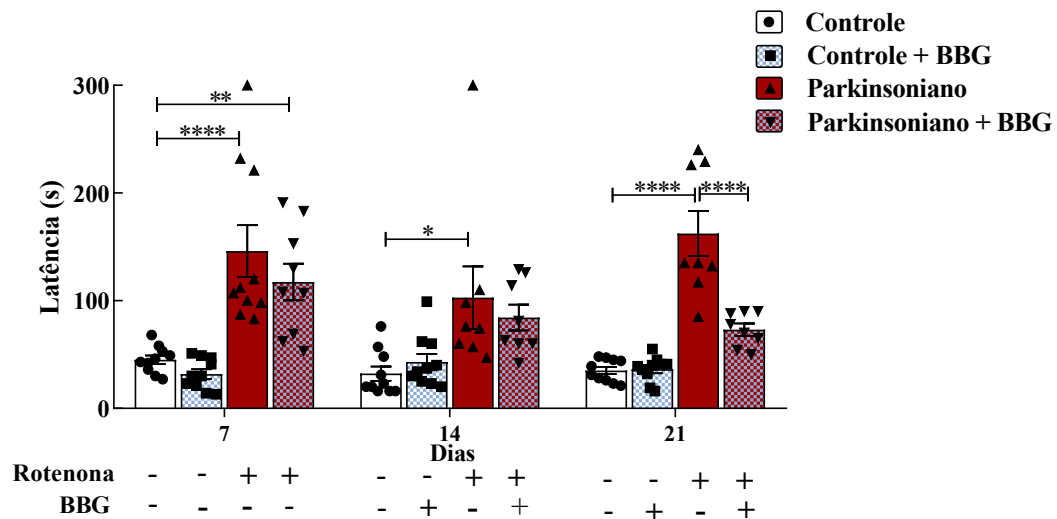
Avaliação da atividade locomotora no teste do campo aberto. **(A)** Trajeto no aparato do campo aberto gerado com o software Any-maze. **(B)** Número de explorações horizontais (*crossings*) **(C)** Número de explorações verticais (*rearings*) **(D)** Velocidade média. Os dados são apresentados como valores individuais e média $\pm$ E.P.M. de 9-10 ratos. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, ANOVA de uma via seguida de teste de Dunnett

5.2 O bloqueio dos receptores P2X₇ pelo BBG protege contra déficits olfatórios de animais parkinsonianos

A exposição à rotenona induziu um déficit na detecção de cheiros voláteis anterior ao surgimento dos déficits motores, a partir o 7^a dia de exposição, no testes de procura pelo pellet enterrado (Controle₇: $45,20 \pm 3,97s$; Controle + BBG₇: $31,90s \pm 4,53s$; Parkinsoniano₇: $146,0 \pm 24,03s$; Parkinsoniano + BBG₇: $117,3 \pm 17,04s$, $P < 0,0001$.) quando comparados aos controles e esse déficit pré motor foi usado como ponto de partida para o início do tratamento com o BBG.

O tratamento com o BBG conseguiu proteger contra o déficit na detecção de cheiros voláteis induzidos pela rotenona como observado pela diminuição na latência para encontrar o pellet em relação aos animais parkinsonianos (Parkinsoniano₂₁: $162,64 \pm 21,12s$; Parkinsoniano + BBG₂₁: $73,13 \pm 5,65s$, $P < 0,0001$.) (Figura 15).

Figura 15. O bloqueio dos receptores P2X₇ pelo BBG protege animais parkinsonianos do déficits olfatórios



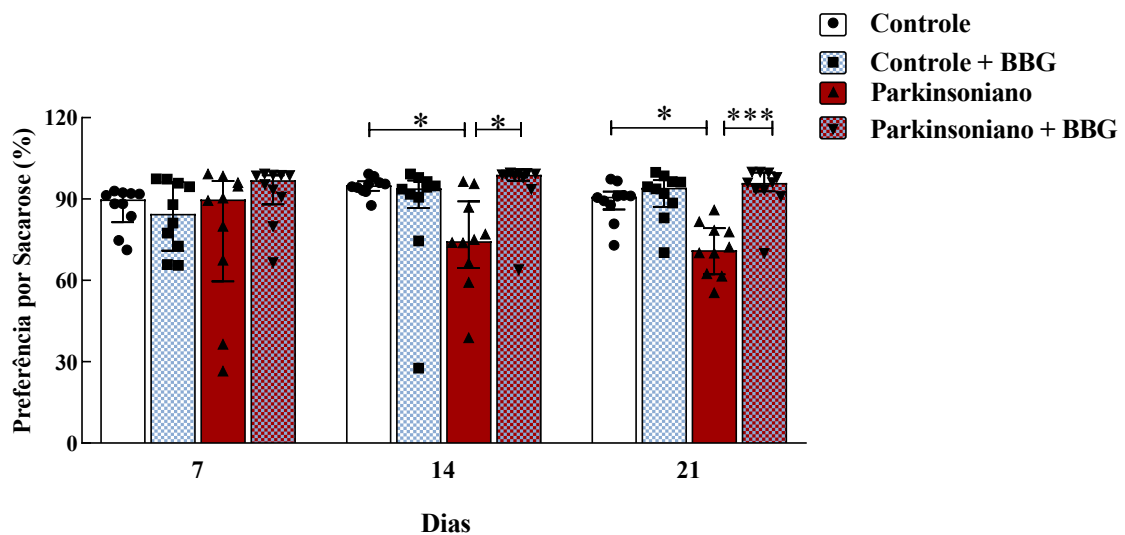
Avaliação da detecção de cheiros voláteis no teste de procura do pellet enterrado. Os dados são apresentados como valores individuais e média $\pm$ E.P.M. de 9-10 ratos. ** $P < 0,01$, **** $P < 0,0001$, ANOVA de uma via seguida de teste de Dunnett.

5.3 O bloqueio dos receptores P2X₇ pelo BBG protege animais parkinsonianos do comportamento do tipo depressivo induzido pela rotenona

Os animais expostos a rotenona demonstraram comportamento do tipo depressivo induzido pela exposição a rotenona, observado pela diminuição na preferência pela sacarose a partir do 14º dia de exposição, quando comparados aos animais controles (Controle₁₄: 95,04% (93,08% - 96,58%) vs. Parkinsoniano₁₄: 74,46% (64,54% - 89,12%), $P < 0,05$, Controle₂₁: 90,81% (86,10% - 92,70%) vs. Parkinsoniano₂₁: 71,19% (62,23% - 79,22%), $P < 0,001$).

O bloqueio dos receptores P2X₇ pelo BBG protegeu os animais do comportamento do tipo depressivo induzido pela exposição a rotenona, evidenciado pelo aumento da preferência pela sacarose quando comparado aos animais parkinsonianos (Parkinsoniano₁₄: 74,46% (64,54% - 89,12%) vs. Parkinsoniano + BBG₁₄: 98,91% (96,77% - 99,44%), $P < 0,05$; Parkinsoniano₂₁: 71,19% (62,23% - 79,22%) vs. Parkinsoniano + BBG₂₁: 96,00% (92,81% - 99,72%), $P < 0,001$) (Figura 16).

Figura 16. O bloqueio dos receptores P2X₇ pelo BBG protege animais parkinsonianos do comportamento do tipo depressivo.

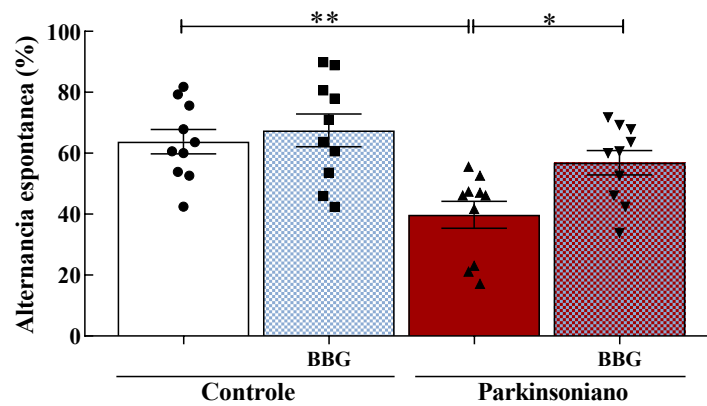


Avaliação do comportamento do tipo de depressivo pelo teste de preferência por sacarose de ratos expostos a rotenona e tratados com BBG. Os dados são apresentados como valores individuais e mediana $\pm$ intervalo interquartil de 10 ratos. * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$, Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn.

5.4 O bloqueio dos receptores P2X₇ pelo BBG protege animais parkinsonianos do déficit de memória operacional induzido pela rotenona

O bloqueio dos receptores P2X₇ pelo BBG protegeu os animais dos déficits de memória operacional induzidos após 21 dias de exposição à rotenona (Controle: $63,77 \pm 3,98\%$ vs. Parkinsoniano: $39,79 \pm 4,41\%$, $P < 0,01$.), como observado pelo aumento do percentual de alternâncias espontâneas no teste do labirinto em Y em relação aos animais parkinsonianos (Parkinsoniano: $39,79 \pm 4,41\%$ vs. Parkinsoniano + BBG: $58,54 \pm 4,00\%$, $P < 0,05$.) (Figura 17).

Figura 17. O bloqueio dos receptores P2X₇ pelo BBG protege animais parkinsonianos do déficit de memória operacional.



Avaliação da memória operacional no teste do labirinto em Y. Os dados são apresentados como valores individuais e média $\pm$ E.P.M. de 10-12 ratos. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, ANOVA de uma via seguida de teste de Dunnett.

5.5 O bloqueio dos receptores P2X₇ pelo BBG protege animais parkinsonianos da degeneração dopaminérgica.

Ao analisar os níveis de monoaminas após 7 dias de exposição a rotenona, observamos que as alterações comportamentais pré-motoras são acompanhadas de uma redução no conteúdo de dopamina estriatal ($P<0,001$) e do aumento de norepinefrina no bulbo olfatório ($P<0,001$), estriado ($P<0,0001$) e mesencéfalo ($P<0,0001$). Após 21 dias de exposição foi observado que a rotenona diminuiu os níveis de dopamina no estriado ($P<0,001$) e mesencéfalo ($P<0,0001$), bem como diminuiu os níveis de noradrenalina mesoencefálicas ($P<0,0001$), também foi observada uma diminuição dos níveis de serotonina no bulbo olfatório ($P<0,02$) e estriado ($P<0,05$) (Tabela 1). O bloqueio os receptores P2X₇ pelo BBG aumentou os níveis de dopamina estriatal ($P<0,05$) e mesoencefálicas ($P<0,05$) (Tabela 3).

Os animais expostos a rotenona apresentaram uma lesão na via dopaminérgica nigroestriatal, evidenciado pela diminuição da imunorreatividade da proteína tirosina hidroxilase no mesencéfalo (Controle: $100,0 \pm 10,40\%$ vs. Parkinsoniano: $30,81 \pm 5,30\%$, $P<0,0001$) (Figura 18A-C) e estriado (Controle: $100,0 \pm 3,99\%$ vs. Parkinsoniano: $59,53 \pm 14,63\%$, $P<0,01$) (Figura 18A-B) quando comparados aos animais controle.

O bloqueio dos receptores P2X₇ pelo BBG protegeu os animais da degeneração dopaminérgica induzida pela exposição a rotenona, evidenciado pelo aumento da imunorreatividade da proteína tirosina hidroxilase no mesencéfalo em reação os animais parkinsonianos (Parkinsoniano: $30,81 \pm 5,30\%$ vs. Parkinsoniano + BBG: $62,76 \pm 6,20\%$, $P<0,05$) (Figura 18A-C). Essa proteção não foi observada a nível de estriado (Figura 18A-B).

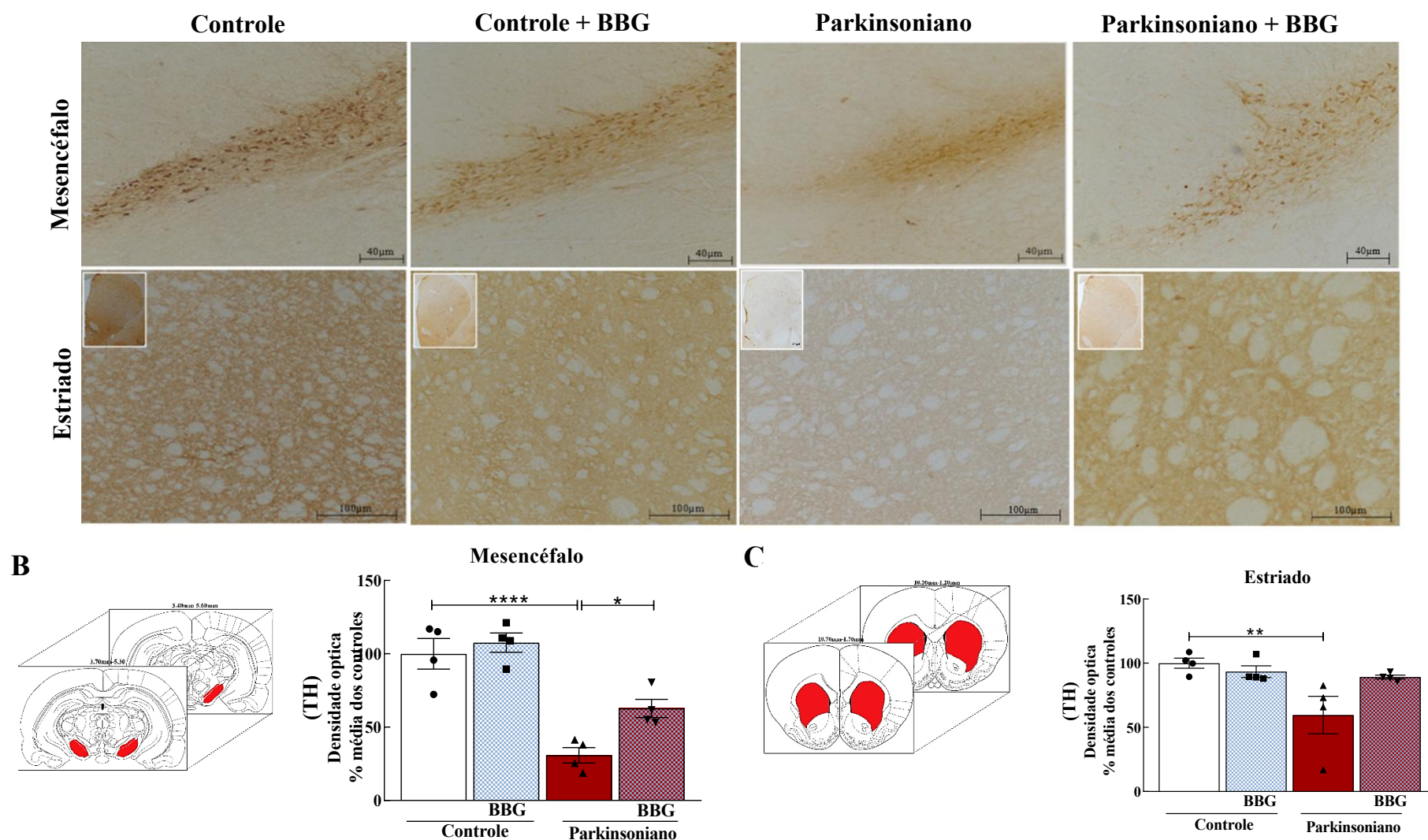
Tabela 3. Efeito da exposição a rotenona e do antagonismo dos receptores P2X₇ sobre os níveis de monoaminas (µg/mg tecido) de ratos parkinsonianos.

7 dias									
Grupos	Bulbo Olfatório			Estriado			Mesencéfalo		
	DA	NA	5-HT	DA	NA	5-HT	DA	NA	5-HT
Controle	60,0 ± 5,0	93,0 ± 8,0	-	1473,0 ± 182,0	127,0 ± 22,0	136,0 ± 7,0	259,0 ± 20,0	106,0 ± 17,0	87,0 ± 9,0
Parkinsoniano	79,0 ± 1,6	652 ± 90 ^{***}	-	509,0 ± 45,0 ^{***}	502,0 ± 40,0 ^{****}	173,0 ± 30	206,0 ± 38,0	667 ± 60 ^{****}	188,0 ± 77,0
21 dias									
Grupos	Bulbo Olfatório			Estriado			Mesencéfalo		
	DA	NA	5-HT	DA	NA	5-HT	DA	NA	5-HT
Controle	204,0 ± 28,0	379,0 ± 122,0	441,0 ± 108,0	6141,0 ± 899,0	541,0 ± 73,0	1086 ± 131,4	234,0 ± 26,0	176,0 ± 15,0	991,0 ± 159,0
Controle + BBG	123,0 ± 28,0	213,0 ± 55,0	209,0 ± 49,0	3436,0 ± 725,0	542,0 ± 9,0	990,2 ± 0,186	76,0 ± 13,0	87,0 ± 13,0	1033,0 ± 332,0
Parkinsoniano	197,0 ± 23,0	703,0 ± 156,0	171,0 ± 21,0 [*]	1845,0 ± 459,0 ^{***}	467,0 ± 74,0	654 ± 67 [*]	55,0 ± 9,0 ^{****}	85,0 ± 9,0 ^{****}	1469,0 ± 267,0
Parkinsoniano + BBG	163,0 ± 20,0	926,0 ± 98,0	403,0 ± 53,0	4171,0 ± 436,0 [#]	361,0 ± 37,0	726 ± 105	130,0 ± 17,0 [#]	73,0 ± 13,0	1527,0 ± 201,0

Conteúdo de monoaminas (µg/mg de tecido) no estriado, mesencéfalo e bulbo olfatório de ratos expostos a rotenona e tratados com o antagonista dos receptores P2X₇ BBG. Os dados são expressos como média ± E.P.M. de 6 ratos. *P < 0,05, ***P < 0,01, ****P < 0,0001 vs. Controle; #P < 0,05 vs. Parkinsoniano, n=6, teste t de Student. 21 dias, n=8, ANOVA de uma via, seguida de teste de Dunnett. DA: dopamina, NA: norepinefrina, 5-HT: serotonina.

Figura 18. O bloqueio dos receptores P2X₇ pelo BBG protege animais parkinsonianos da degeneração dopaminérgica

65



Imuno-histoquímica para a tirosina hidroxilase (TH), um marcador dopaminérgico, em cortes coronais do cérebro de ratos expostos a rotenona e tratados com BBG. (A) Fotomicrografias representativas na região da substância negra (10 μm de espessura; aumento de 40x) do estriado (10 μm de espessura; aumentos de 20x e 100x). (B-C) Análise densitométrica de TH no mesencéfalo e estriado. Dados são representados como dados individuais e média ± EPM de 4 ratos. **** P < 0,0001, * P < 0,05 ANOVA de uma via seguida de teste de Dunnet

5.6 O bloqueio dos receptores P2X₇ pelo BBG protege animais parkinsonianos da neuroinflamação

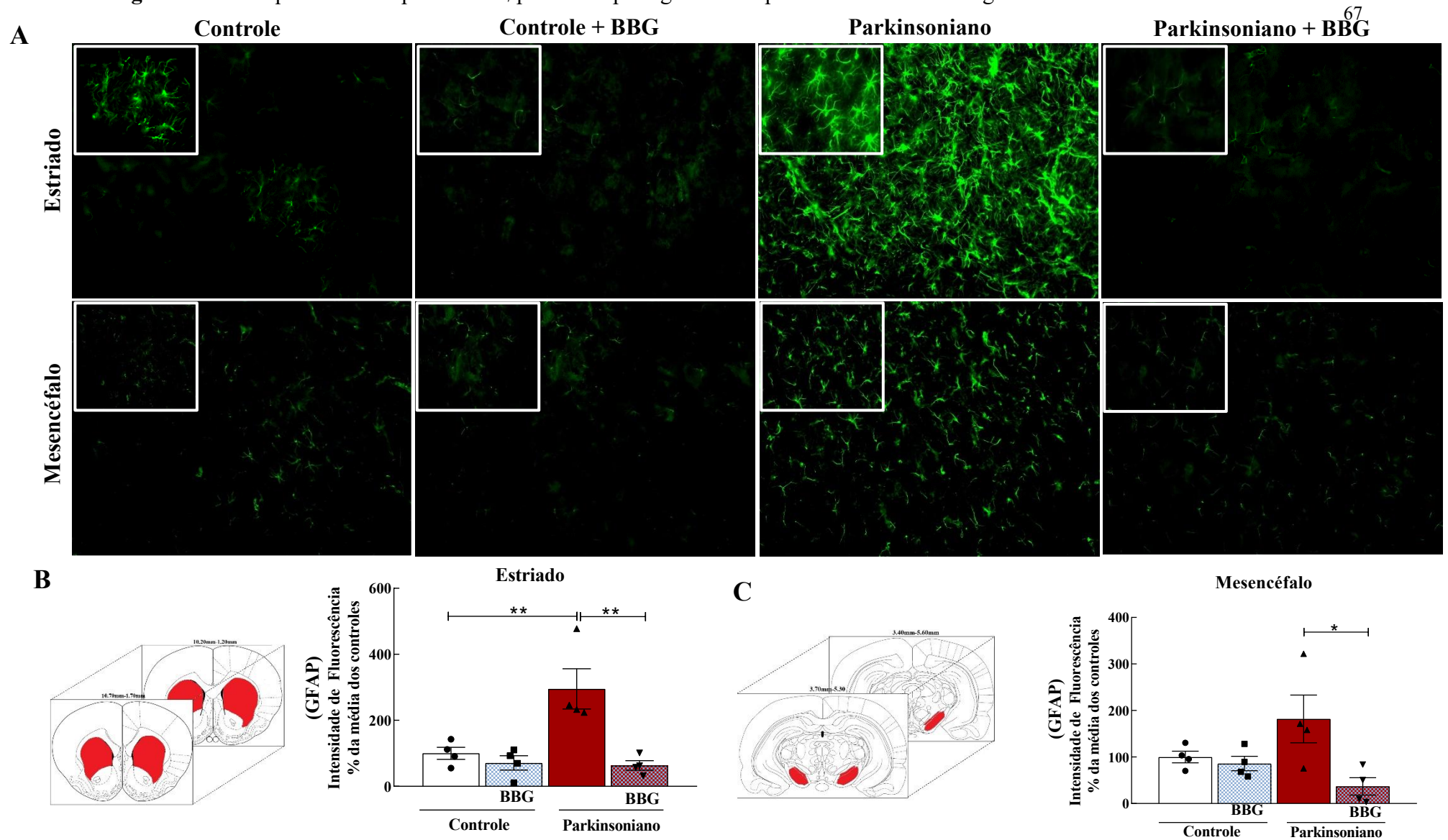
Os animais expostos a rotenona apresentaram astrogliose estriatal, observada pelo aumento da imunorreatividade para GFAP no estriado (Controle: $100,0 \pm 18,32\%$ vs. Parkinsoniano: $295,2 \pm 61,10\%$, $P < 0,01$.) quando comparados aos animais controles. O bloqueio dos receptores P2X₇ pelo BBG reduziu a imunorreatividade para GFAP no estriado (Parkinsoniano: $295,2 \pm 61,10\%$ vs. Parkinsoniano + BBG: $63,32 \pm 14,35\%$, $P < 0,01$.) (Figura 19B) e no mesencéfalo (Parkinsoniano: $181,8,2 \pm 51,30\%$ vs. Parkinsoniano + BBG: $36,82 \pm 18,82\%$, $P < 0,05$) (Figura 19C).

A exposição a rotenona também induziu microgliose estriatal, observada pelo aumento do número de células IBA-positivas em relação ao controles (Controle: $99,74 \pm 11,04\%$ vs. Parkinsoniano: $426,3 \pm 30,83\%$, $P < 0,05$.) (Figura 20B). O bloqueio dos receptores P2X₇ protegeu os animais contra a microgliose estriatal induzida pela exposição a rotenona, observada pela diminuição do número de células IBA-positivas em relação ao animais parkinsonianos (Parkinsoniano: $426,3 \pm 30,83\%$ vs. Parkinsoniano + BBG: $259,1 \pm 52,98\%$, $P < 0,05$.) (Figura 20B).

O tratamento com BBG também induziu um aumento significativo do número de micróglia no grupo controle (Controle: $99,74 \pm 11,04\%$ vs. Controle + BBG: $418,0 \pm 47,64\%$, $P = 0,05$). Não foram observadas diferenças significativas no número de células IBA-positivas decorrentes da exposição à rotenona ou do tratamento com BBG no mesencefálico ($P > 0,05$) (Figura 20D).

A exposição a rotenona induziu um aumento nos níveis de TNF- α estriatal em relação aos animais controles (Controle: $83,24 \pm 10,28\%$ vs. Parkinsoniano: $135,0 \pm 15,61\%$, $P < 0,05$.). O BBG protegeu os animais contra o aumento dos níveis de TNF- α estriatal em comparação aos animais parkinsonianos (Parkinsoniano: $135,0 \pm 15,61\%$ vs. Parkinsoniano + BBG: $96,18 \pm 11,07\%$, $P < 0,05$.) (Figura 21B). Não foram observadas diferenças significativas nos níveis de TNF- α no mesencefálico decorrentes da exposição à rotenona ou do tratamento com BBG ($P > 0,05$.) (Figura 21C).

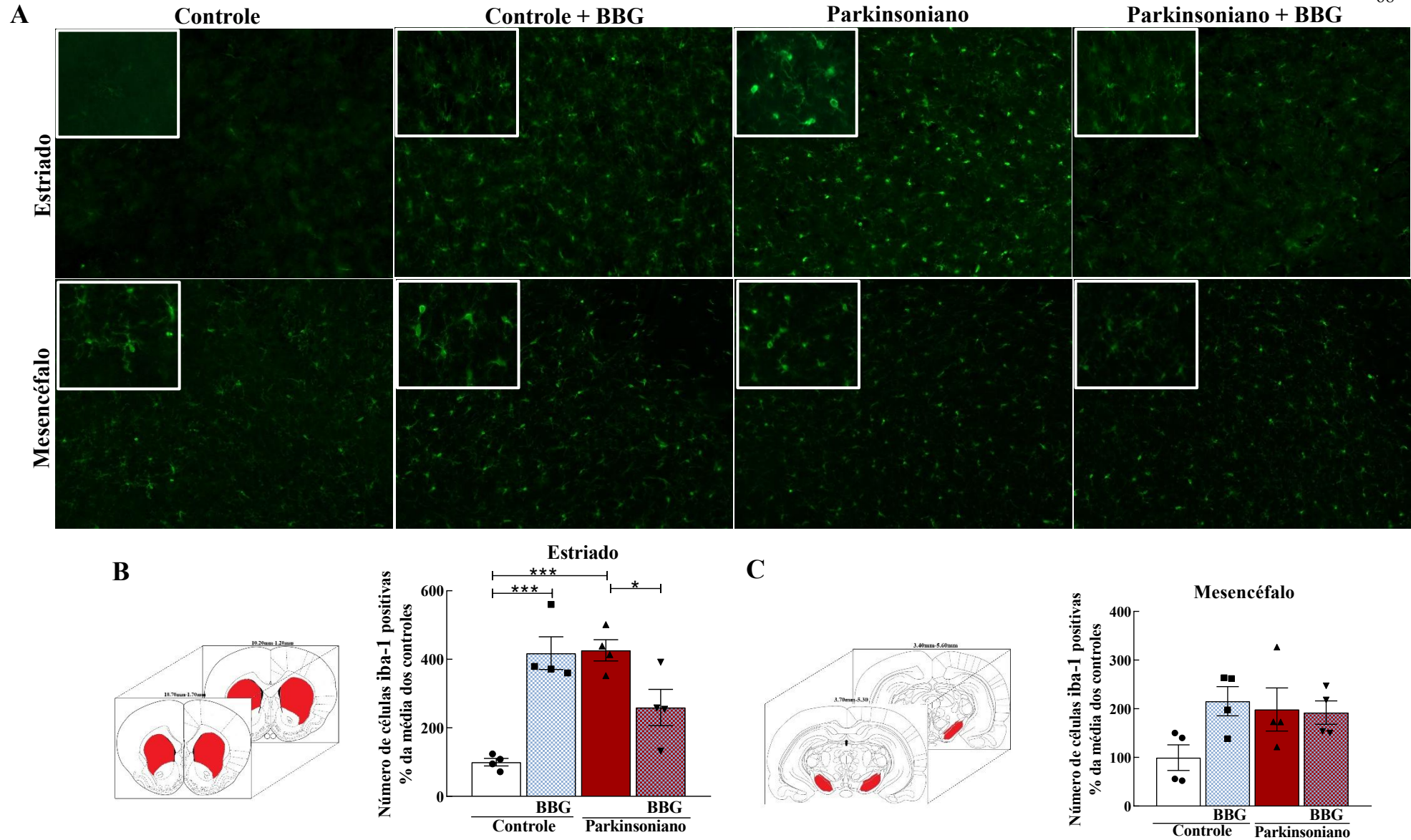
Figura 19. O bloqueio dos receptores P2X₇ pelo BBG protege animais parkinsonianos da astrogliose



Imuno-histoquímica para a GFAP, um marcador de astrócitos, em cortes coronais do cérebro de ratos expostos a rotenona e tratados com BBG. (A) Fotomicrografias representativas da região do estriado e substância negra (30 μ m de espessura; aumentos de 200x). (B-C) Análise densiométrica de GFAP no mesencéfalo e estriado. Dados são representados como dados individuais e média $\pm$ EPM de 4 ratos. * P < 0,05, ** P < 0,001 ANOVA de uma via seguida de teste de Dunnett.

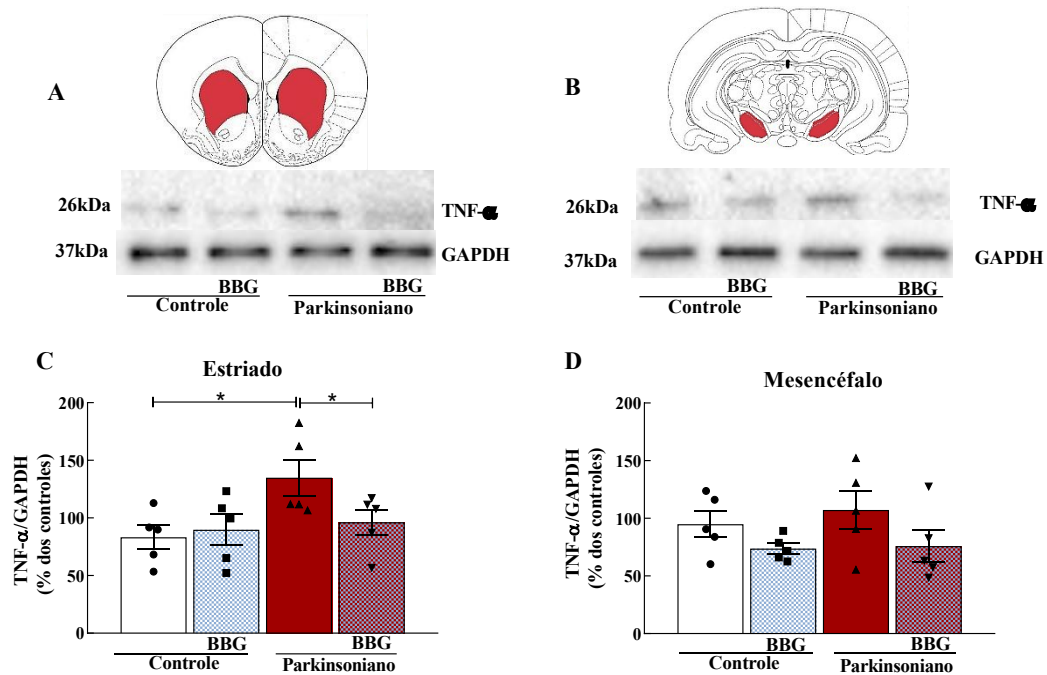
Figura 20. O efeito do bloqueio dos receptores P2X₇ pelo BBG sobre a micróglia de animais parkinsonianos.

68



Imuno-histoquímica para a iba-1, um marcador de micróglia, em cortes coronais do cérebro de ratos expostos a rotenona e tratados com BBG. (A) Fotomicrografias representativas da região do estriado e substância negra (30 μ m de espessura; aumentos de 200x). (B-D) Análise do número de células marcadas com iba-1 no mesencéfalo e estriado (C-E) Análise densiométrica de iba-1 no mesencéfalo e estriado. Dados são representados como dados individuais e média $\pm$ EPM de 4 ratos. * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$ ANOVA de uma via seguida de teste de Dunnett.

Figura 21. O efeito do bloqueio dos receptores P2X₇ pelo BBG sobre a densidade de TNF- α de animais parkinsonianos.



Avaliação da expressão de TNF- α . **(A-B)** Blots representativos de TNF- α e GAPDH do lisato do estriado de animais controles, parkinsonianos e tratados com BBG. **(C-D)** Análise densitométrica do TNF- α no estriado e mesencéfalo. A densidade das proteínas foi expressa como a razão proteína/GAPDH, e a densidade relativa foi normalizada pelos valores do grupo controle de cada membrana. Dados são representados como dados individuais e média $\pm$ EPM de 5 ratos. * P < 0,05 ANOVA de uma via seguida de teste de Dunnett.

5.7 O efeito do bloqueio dos receptores P2X₇ pelo BBG sobre o acúmulo e a deposição de α -sinucleína

A exposição a rotenona induziu um aumento do acúmulo de α -sinucleína total no estriado (Controle: $83,93 \pm 14,22\%$ vs. Parkinsoniano: $184,8 \pm 12,13\%$, $P < 0,001$.) e mesencéfalo (Controle: $97,90 \pm 28,16\%$ vs. Parkinsoniano: $215,4 \pm 36,41\%$, $P < 0,05$) quando comparado aos animais controles.

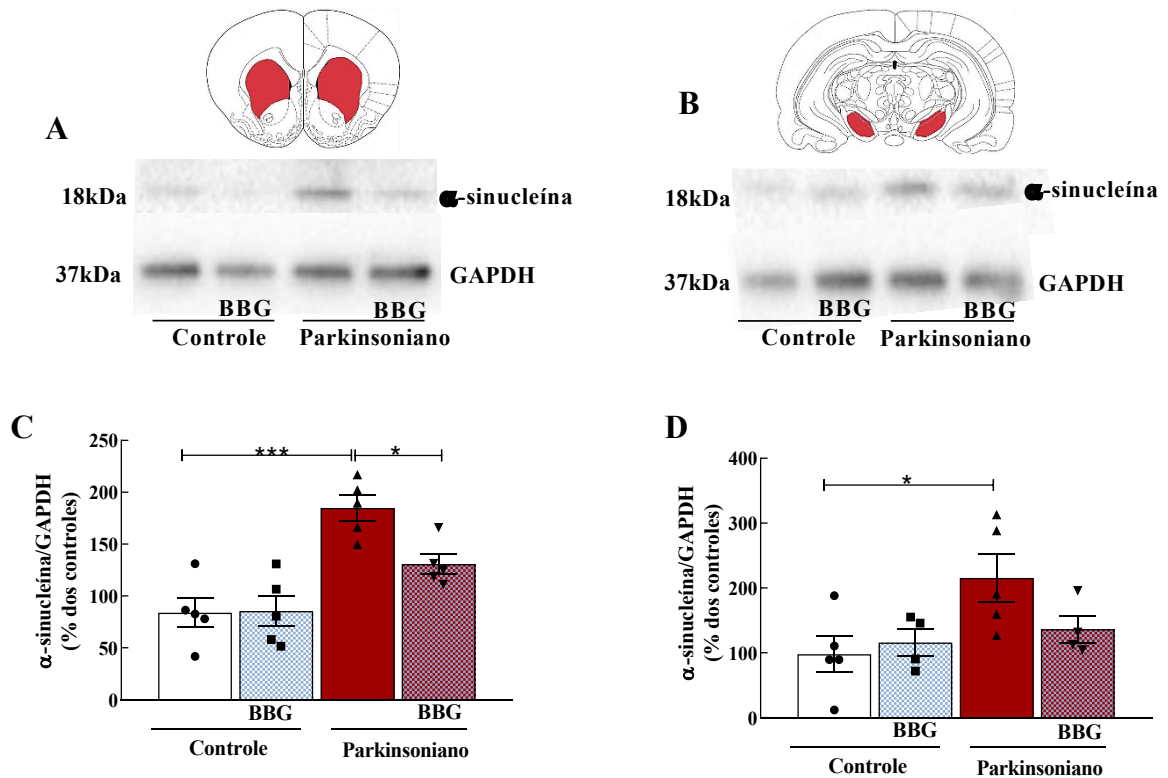
O bloqueio dos receptores P2X₇ protegeu os animais do acúmulo estriatal de α -sinucleína em relação aos animais parkinsonianos (Parkinsoniano: $184,8 \pm 12,13\%$ vs. Parkinsoniano + BBG: $130,7 \pm 9,478\%$, $P < 0,05$.) (Figura 22C). O mesmo efeito protetor do BBG não foi observado a nível de mesencefálico ($P > 0,05$) (Figura 22D).

A exposição a rotenona também induziu o aumento da deposição de α -sinucleína fosforilada na serina 129 no bulbo olfatório (Controle: $100,0 \pm 13,78\%$ vs. Parkinsoniano: $310,5 \pm 35,21\%$, $P < 0,0001$) (Figura 23B), no estriado (Controle: $100,0 \pm 8,88\%$ vs. Parkinsoniano: $282,9 \pm 39,06\%$, $P < 0,001$) (Figura 23C) e no *núcleo accumbens* (Controle: $100,0 \pm 20,59\%$ vs. Parkinsoniano: $292,8 \pm 18,98\%$, $P < 0,0001$) (Figura 23D) em relação aos controles.

O BBG também protegeu os animais da deposição de α -sinucleína fosforilada, induzida pela exposição a rotenona, no bulbo olfatório (Parkinsoniano: $310,5 \pm 35,21\%$ vs. Parkinsoniano + BBG: $64,14 \pm 9,463\%$, $P < 0,0001$) (Figura 23B), estriado (Parkinsoniano: $282,9 \pm 39,06\%$ vs. Parkinsoniano + BBG: $79,95 \pm 8,436\%$, $P < 0,001$) (Figura 23C) e *núcleo accumbens* (Parkinsoniano: $292,8 \pm 18,98\%$ vs. Parkinsoniano + BBG: $67,84 \pm 10,03$; $P < 0,0001$) (Figura 23D).

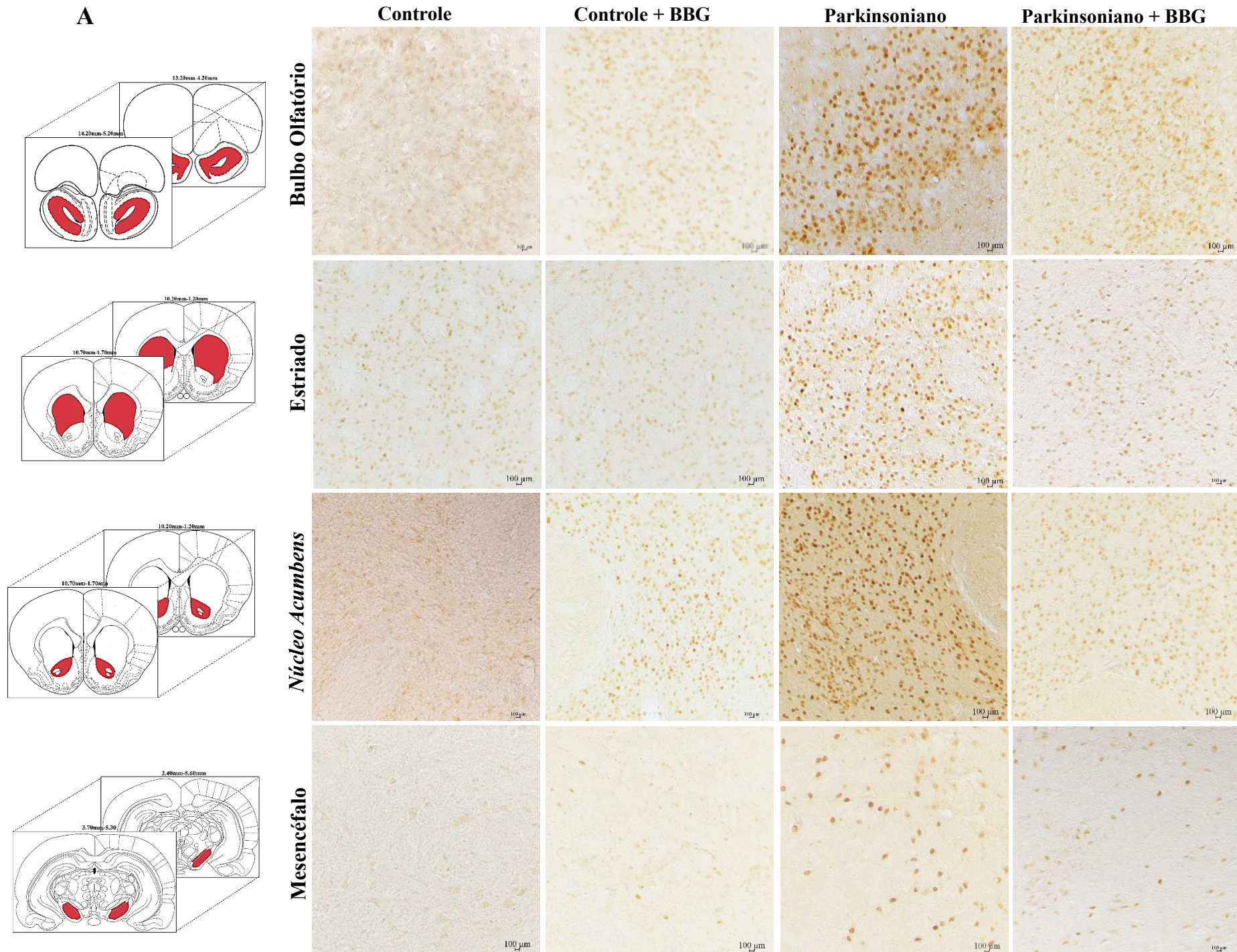
Não foram observadas diferenças significativas na deposição da forma fosforilada da α -no mesencefálica decorrentes da exposição à rotenona ou do tratamento com BBG ($P > 0,05$) (Figura 23E).

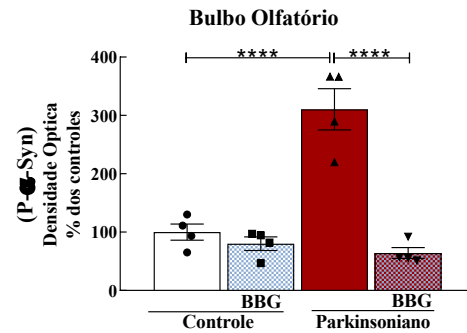
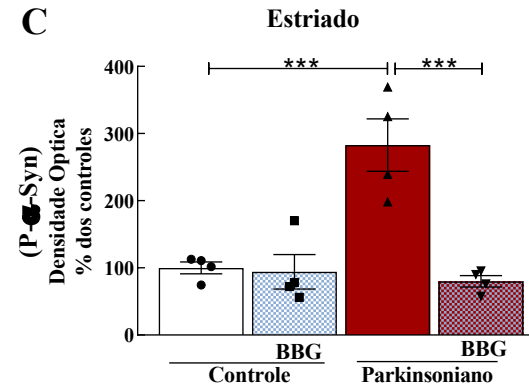
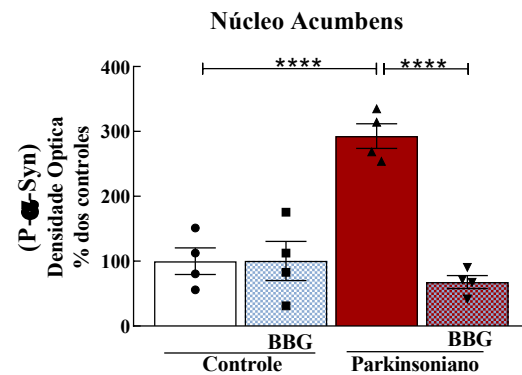
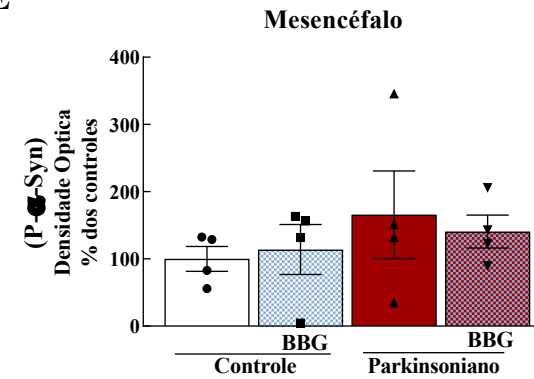
Figura 22. O efeito do bloqueio dos receptores P2X₇ pelo BBG sobre o acúmulo de α -sinucleína total



Avaliação do acúmulo de α -sinucleína total. **(A-B)** Blots representativos de α -sinucleína e GAPDH do lisato do estriado de animais controles, parkinsonianos e tratados com BBG. **(C-D)** Análise densitométrica da α -sinucleína no estriado e mesencéfalo. A densidade das proteínas foi expressa como a razão proteína/GAPDH, e a densidade relativa foi normalizada pelos valores do grupo controle de cada membrana. Dados são representados como dados individuais e média $\pm$ EPM de 5 ratos. *** $P < 0,001$, * $P < 0,05$ ANOVA de uma via seguida de teste de Dunnett.

Figura 23. O efeito do bloqueio dos receptores P2X₇ pelo BBG sobre a deposição de α -sinucleína fosforilada



B**C****D****E**

Avaliação da deposição de fosfo-129Ser- α -sinucleína em cortes coronais do cérebro de ratos expostos a rotenona e tratados com BBG. (A) Fotomicrografias representativas da região em cortes coronais do bulbo olfatório (30 μ m de espessura; aumento de 20x e 100x), estriado (30 μ m de espessura; aumento de 100x e 200x), *Núcleo Acumbens* (30 μ m de espessura; ampliações de 40x e 100x) e substância negra (10 μ m de espessura; ampliações de 100x e 200x). (B-E) Análise densiométrica de fosfo-129Ser- α -sinucleína no bulbo olfatório, estriado, *núcleo acumbens* e mesencéfalo. Dados são representados como dados individuais e média $\pm$ EPM de 4 ratos. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$ ANOVA de uma via seguida de teste de Dunnett.

5.8 Efeito do Bloqueio dos Receptores P2X₇ pelo BBG na regulação de proteínas autofágicas e mitofágicas

Os animais expostos a rotenona apresentaram um aumento significativo nos níveis da proteína formadora de fagossomos, LC3 no estriado (Controle: $100,0 \pm 5,13$ vs. Parkinsoniano: $252,0 \pm 48,62\%$, $P < 0,01$) e mesencéfalo (Controle: $112,6 \pm 13,46\%$ vs. Parkinsoniano: $252,0 \pm 48,62\%$, $P < 0,05$) (Figura 25B) em comparação aos animais controles.

O bloqueio dos receptores P2X₇ pelo BBG reduziu significativamente os níveis de LC3 no mesencéfalo em relação aos animais parkinsonianos (Controle: $112,6 \pm 13,46\%$; Controle + BBG: $79,37 \pm 16,06\%$; Parkinsoniano: $252,0 \pm 48,62\%$; Parkinsoniano + BBG: $166,7 \pm 29,83\%$; $P < 0,05$) (Figura 25B). Essa proteção não foi observada a nível de estriado (Figura 24B).

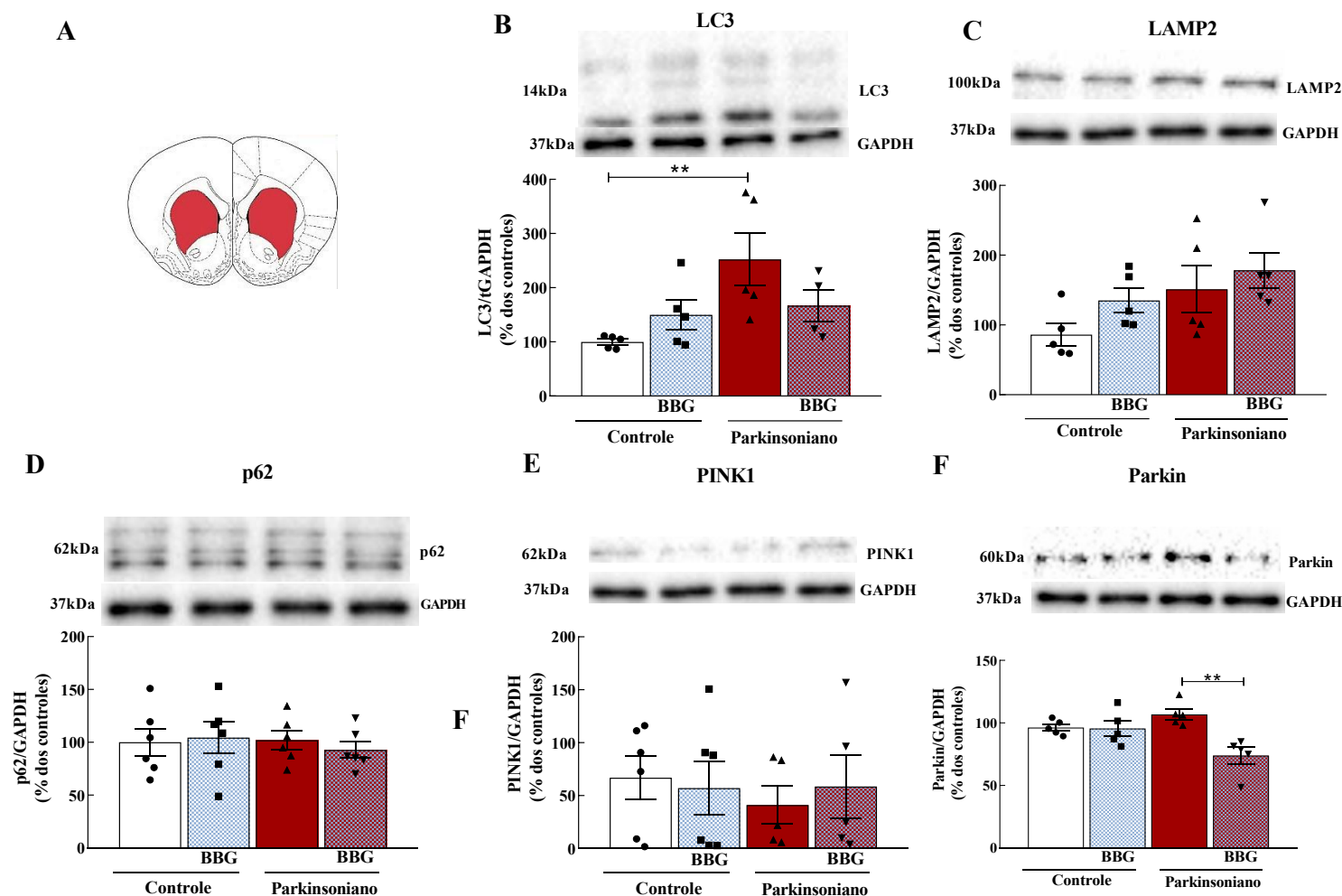
Não foram observadas mudanças significativas nos níveis das proteínas LAMP2 (Figura 24C-25C) e p62 (Figura 24D-25D) nas áreas analisadas, decorrentes da exposição à rotenona ou do tratamento com BBG ($P > 0,05$).

A exposição a rotenona também induziu o aumento mesencefálico da proteína marcadora de mitocôndrias para degradação, PINK1, em comparação aos controles (Controle: $91,23 \pm 15,01\%$ vs. Parkinsoniano: $156,7 \pm 20,10\%$, $P < 0,05$.) (Figura 25E). O bloqueio dos receptores P2X₇ pelo BBG reduziu a densidade de PINK mesencefálico em relação aos animais parkinsonianos (Parkinsoniano: $156,7 \pm 20,10\%$ vs. Parkinsoniano + BBG: $87,08 \pm 15,76\%$, $P < 0,05$.) (Figura 25E). Não foram observadas mudanças nos níveis estriatais de PINK1 decorrentes da exposição à rotenona ou do tratamento com BBG ($P > 0,05$) (Figura 24E).

Não foram observadas alterações nos níveis da proteína da via de degradação mitocondrial, parkin, em decorrência da exposição a rotenona ($P > 0,05$). Contudo, o bloqueio dos receptores P2X₇ pelo BBG reduziu significativamente os níveis dessa proteína em relação aos animais parkinsonianos, tanto no estriado (Parkinsoniano: $106,8 \pm 4,25\%$ vs. Parkinsoniano + BBG: $73,90 \pm 6,50\%$, $P < 0,01$.) (Figura 24F) quanto no mesencefálico (Parkinsoniano: $93,46 \pm 14,06\%$ vs. Parkinsoniano + BBG: $9,501 \pm 3,048\%$, $P < 0,001$.) (Figura 25F).

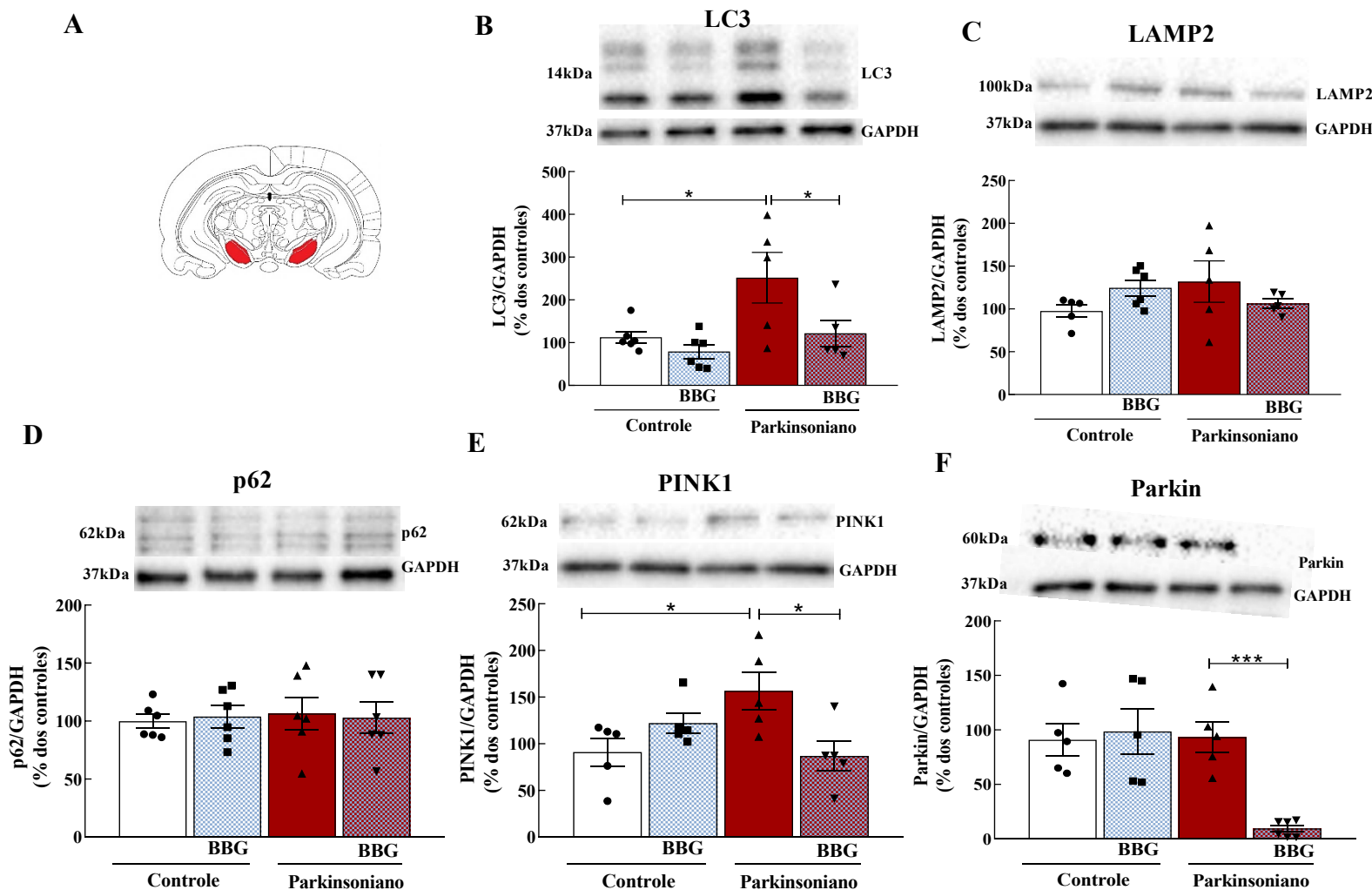
A rotenona também induziu ao aumento da proteína marcadora de proteínas e organelas para degradação ubiquitina, em relação aos controles, no estriado (Controle: $100,0 \pm 17,07\%$ vs. Parkinsoniano: $185,2 \pm 21,18\%$, $P < 0,01$) e mesencéfalo (Controle: $100,0 \pm 14,68\%$ vs. Parkinsoniano: $161,8 \pm 17,20\%$, $P < 0,015$). O tratamento com BBG reduziu significativamente o nível de ubiquitina estriatal em relação aos animais parkinsonianos (Parkinsoniano: $185,2 \pm 21,18\%$ vs. Parkinsoniano + BBG: $115,7 \pm 5,96\%$, $P < 0,01$.) (Figura 26A-B). O mesmo efeito protetor do BBG não foi observado a nível de mesencefálico ($P > 0,05$) (Figura 26A-C).

Figura 24. O efeito do bloqueio dos receptores P2X₇ pelo BBG sobre a densidade de proteínas das via da autofagia e mitofagia no estriado de animais parkinsonianos



Avaliação dos níveis de proteínas de vias autofágicas e mitofagia do lisato do estriatais de animais controles, parkinsonianos e tratados com BBG. Blot representativo e análise densiométrica da proteína LC3(B), LAMP2 (C), p62 (D), PINK1 (E), Parkin (F). A densidade das proteínas foi expressa como a razão proteína/GAPDH, e a densidade relativa foi normalizada pelos valores do grupo controle de cada membrana. Dados são representados como média $\pm$ EPM de 5 ratos. **P < 0,01 ANOVA de uma via seguida de teste de Dunnett.

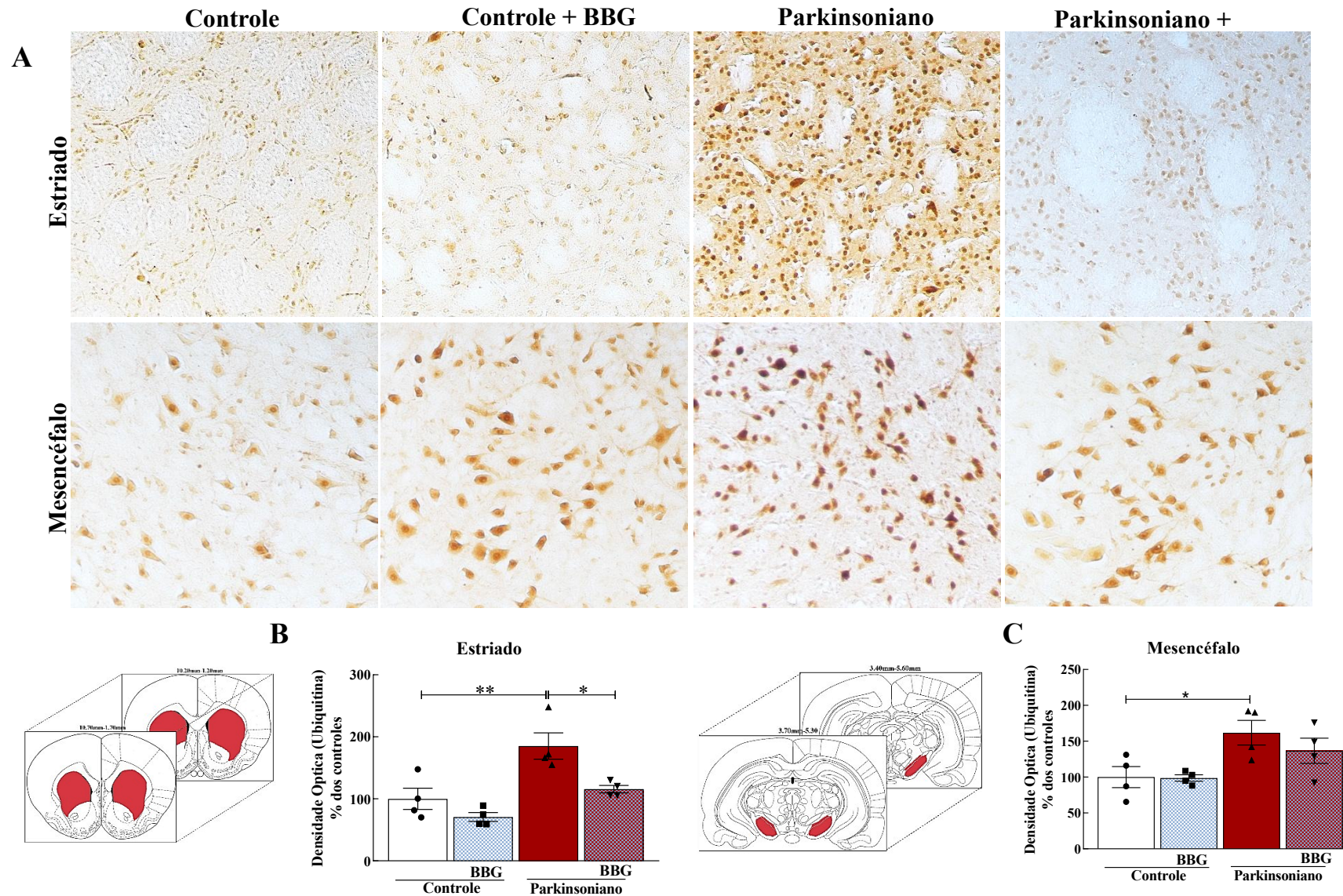
Figura 25. O efeito do bloqueio dos receptores P2X₇ pelo BBG sobre a densidade de proteínas das via da autofagia e mitofagia no mesencéfalo de animais parkinsonianos.



Avaliação dos níveis de proteínas de vias autofágicas e mitofagia do lisato do mesencéfalo de animais controles, parkinsonianos e tratados com BBG. Blot representativo e análise densiométrica da proteína LC3(B), LAMP2 (C), p62 (D), PINK1 (E), Parkin (F). A densidade das proteínas foi expressa como a razão proteína/GAPDH, e a densidade relativa foi normalizada pelos valores do grupo controle de cada membrana. Dados são representados como média $\pm$ EPM de 5 ratos. * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$. ANOVA de uma via seguida de teste de Dunnet.

Figura 26. O efeito do bloqueio dos receptores P2X₇ pelo BBG sobre a deposição de ubiquitina

77



Imuno-histoquímica para ubiquitina em cortes coronais do cérebro de ratos expostos a rotenona e tratados com BBG. (A) Fotomicrografias representativas na região do estriado (30 µm de espessura; aumento de 100x) do estriado (30 µm de espessura; aumentos de 100x). (B-C) Análise densiométrica de Ubiquitina no estriado e mesencéfalo. Dados são representados como dados individuais e média ± EPM de 4 ratos. ** P < 0,001, * P < 0,05 ANOVA de uma via seguida de teste de Dunnet.

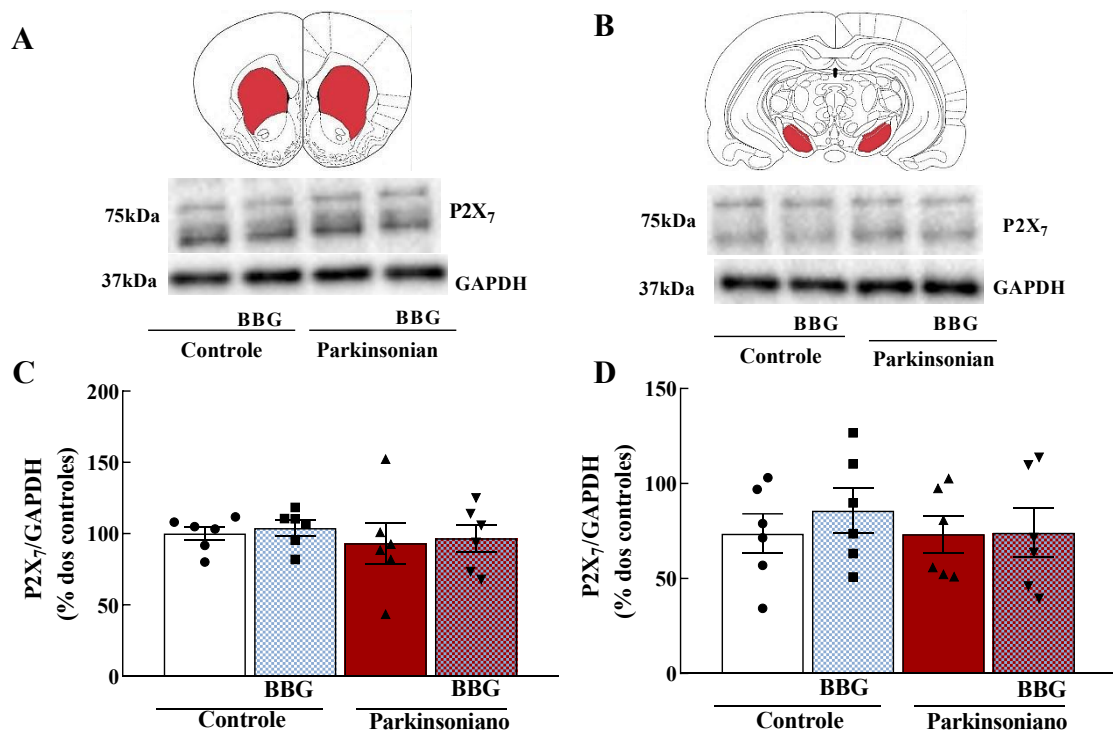
5.9 O efeito do BBG sobre a densidade e localização dos receptores P2X₇ em animais parkinsonianos

Na avaliação por western blotting não foram observadas alterações na densidade dos receptor P2X₇ em decorrência da exposição a rotenona ou tratamento com BBG no estriado ou mesencéfalo ($P > 0,05$) (Figura 27).

No entanto na avaliação pela técnica de imunohistoquímica observou-se que a exposição a rotenona levou a um aumento significativo de células expressando receptores P2X₇ no estriado (Controle: $99,49 \pm 4,55\%$ vs. Parkinsoniano: $151,4 \pm 16,67\%$, $P < 0,01$). O tratamento com o BBG reduziu o número de células P2X₇-positivas em comparação aos animais parkinsonianos (Parkinsoniano: $151,4 \pm 16,67\%$; Parkinsoniano tratado: $62,74 \pm 8,25\%$; $P < 0,0001$) (Figura 28B). Não foram observadas diferenças significativas no número células mesoencefálicas expressando receptores P2X₇ decorrentes da exposição à rotenona ou do tratamento com BBG (Figura 28C).

No presente modelo, os receptores P2X₇ se colocalizaram em $86,54 \pm 1,60\%$ das células cd11b positivas (micróglia), $3,3 \pm 1,905$ das células GFAP positivas (astrócitos) e $1,650 \pm 1,65$ das células TH positivas (neurônios dopaminérgicos), indicando que o aumento dos receptores P2X₇ observados está presente na micróglia (Figura 29-30).

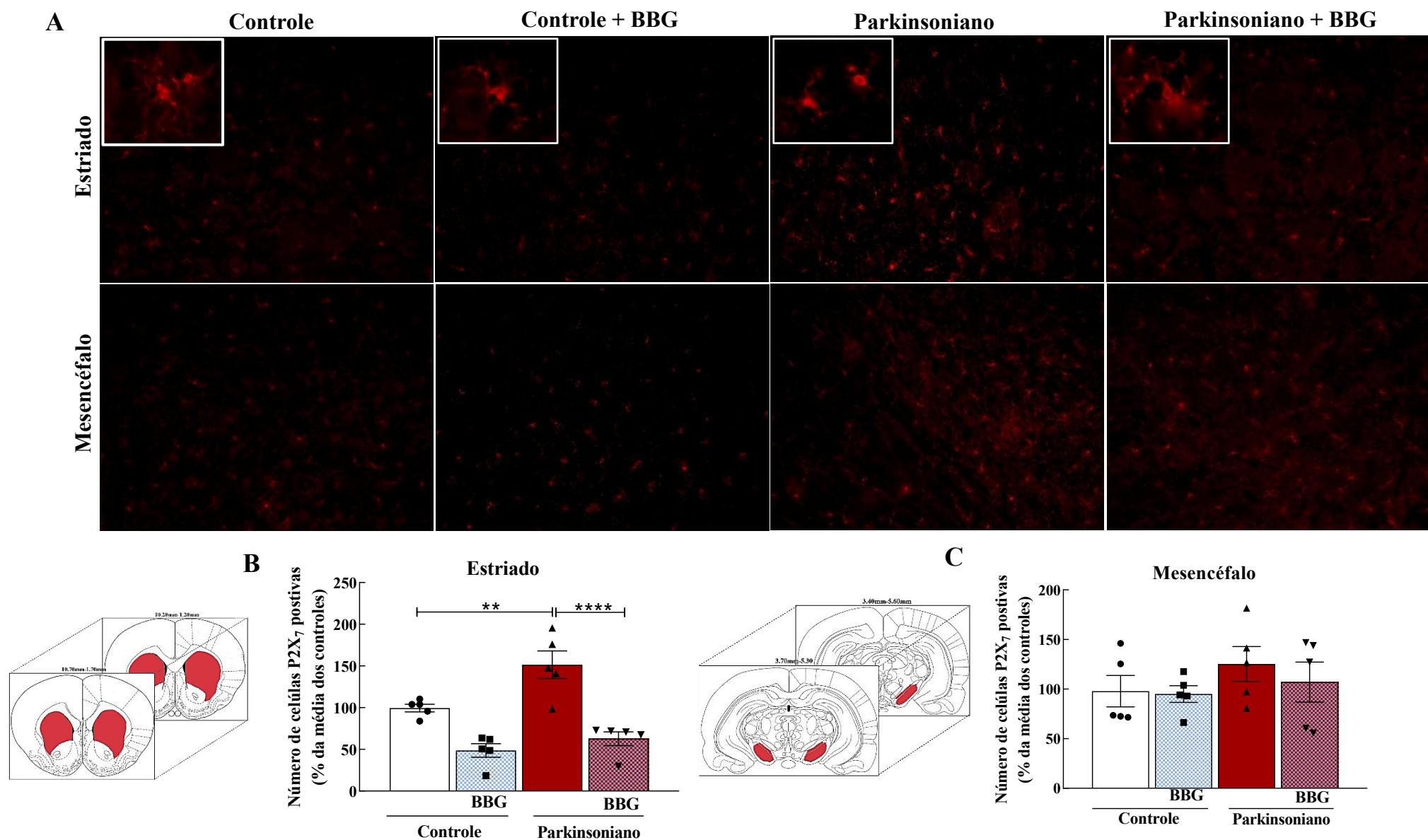
Figura 26. O efeito do BBG sobre a densidade dos receptores P2X₇ no estriado e mesencéfalo de animais parkinsonianos



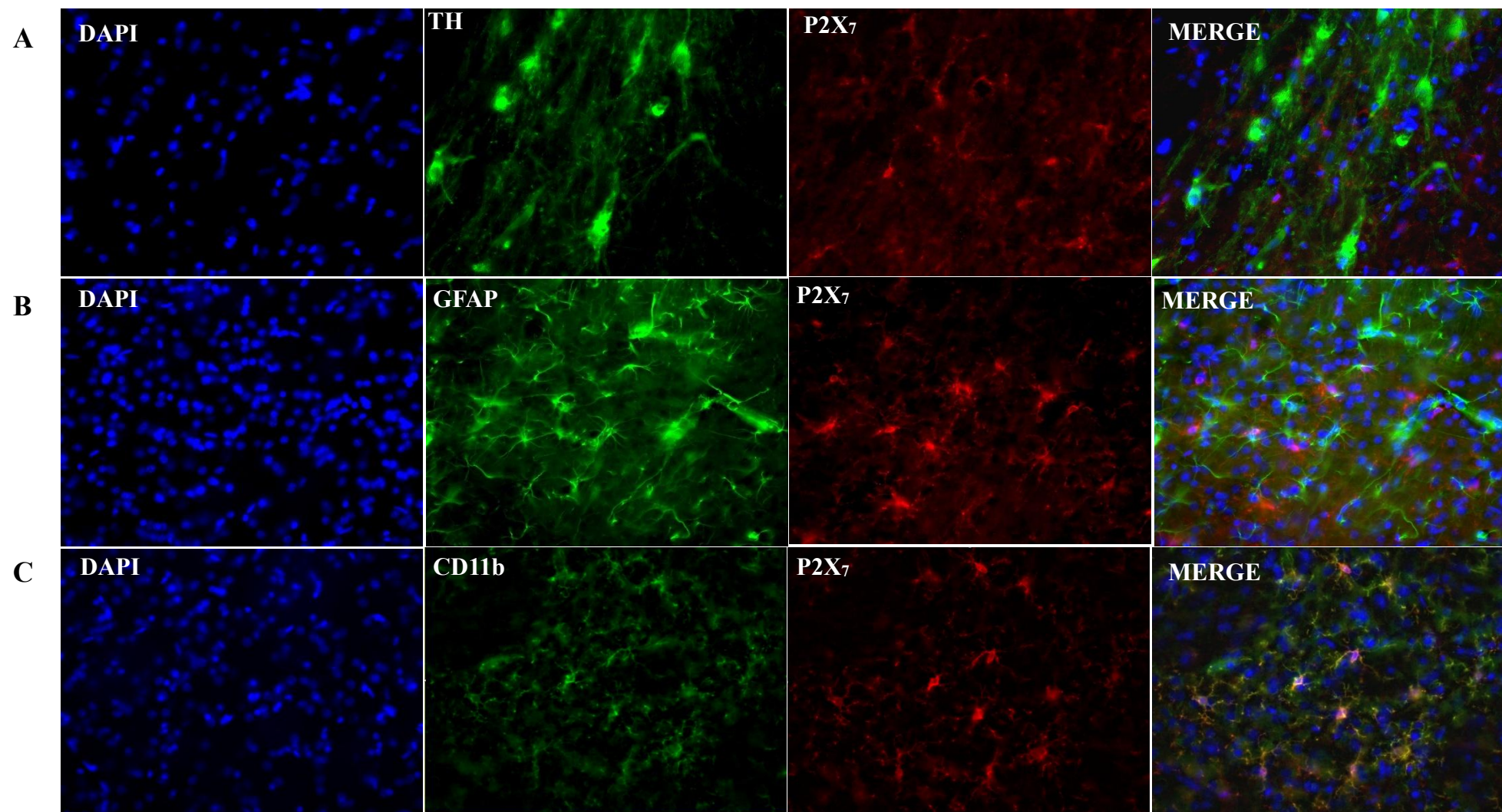
Avaliação da expressão dos receptores P2X₇. **(A-B)** Blots representativos de P2X₇ e GAPDH do lisato do estriado mesencéfalo, respectivamente, de animais controles, parkinsonianos e tratados com BBG. **(C-D)** Análise densitométrica dos receptores P2X₇ no estriado e mesencéfalo, respectivamente. A densidade das proteínas foi expressa como a razão proteína/GAPDH, e a densidade relativa foi normalizada pelos valores do grupo controle de cada membrana. Dados são representados como dados individuais e média $\pm$ EPM de 5 ratos. ANOVA de uma via seguida de teste de Dunnett.

Figura 27. O efeito do BBG sobre a imunorreatividade dos receptores P2X₇ no estriado e mesencéfalo de animais parkinsonianos.

80



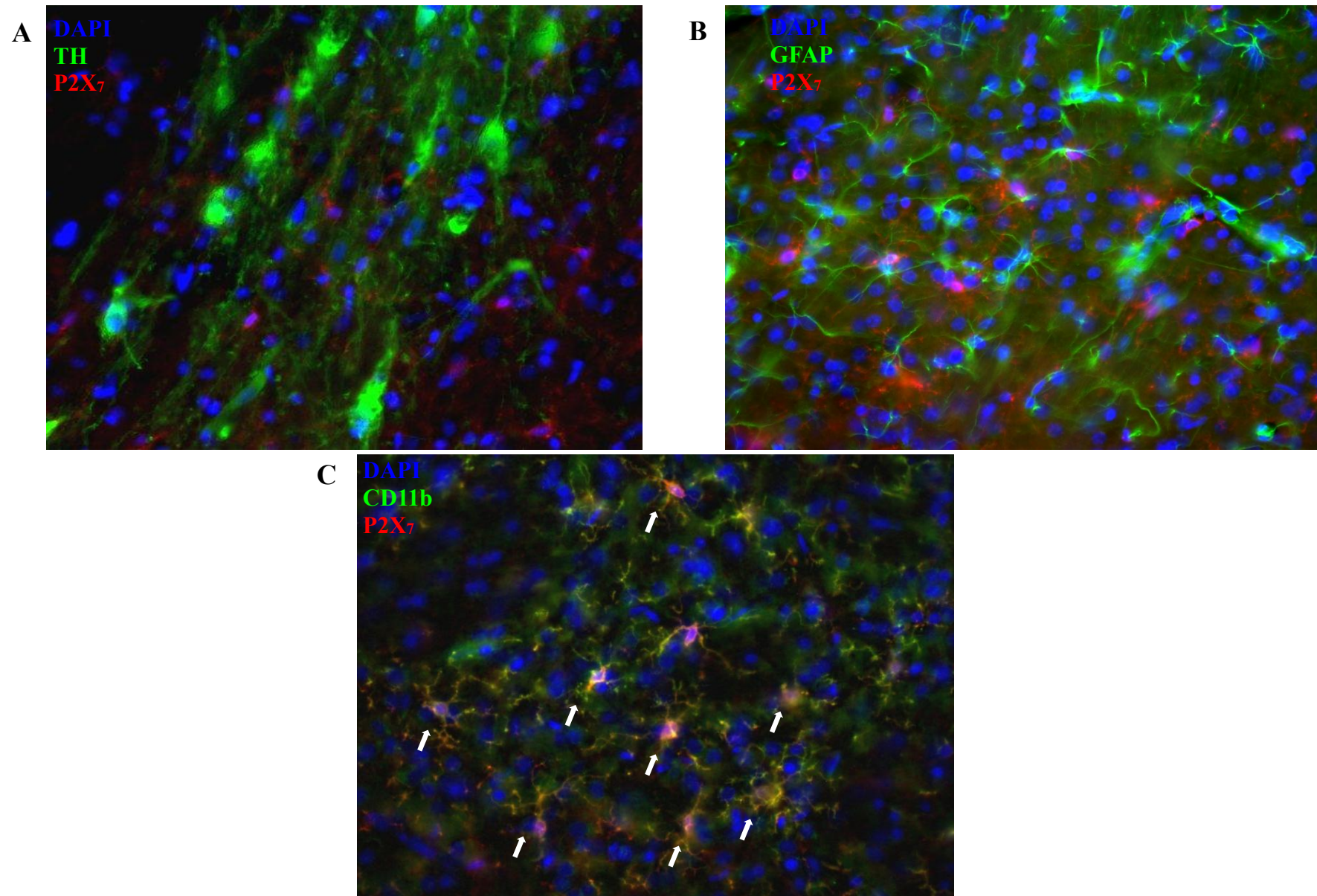
Imuno-histoquímica para o receptor P2X₇, em cortes coronais do cérebro de ratos expostos a rotenona e tratados com BBG. (A) Fotomicrografias representativas da região do estriado e substância negra (30 μ m de espessura; aumentos de 200x). (B-C) Análise do número de células P2X₇ positivas. Dados são representados como dados individuais e média $\pm$ EPM de 5 ratos. ** P < 0,01, **** P < 0,0001 ANOVA de uma via seguida de teste de Dunnett.



Fotomicrografias (aumento 400X) mostrando a co-localização dos receptores P2X₇ (em vermelho) com neurônios dopaminérgicos (A) (TH em verde), (B) astrócitos (GFAP em verde) ou (C) micróglia (CD11b em verde) em fatias coronais da substância negra de ratos expostos a rotenona (n=4).

Figura 29. Ampliação do merged da co-localização dos receptores P2X₇ no modelo de parkinsonismo induzido pela exposição a rotenona

82



Ampliação das fotomicrografias (aumento 400X) mostrando a co-localização dos receptores P2X₇ (em vermelho) com neurônios dopaminérgicos (A) (TH em verde), (B) astrócitos (GFAP em verde) ou (C) micróglia (CD11b em verde) em fatias coronais substância negra de ratos expostos a rotenona.

6 DISCUSSÃO

No presente estudo investigamos a capacidade neuroprotetora do antagonismo dos receptores P2X₇ pelo BBG, iniciado em uma fase prodrômica, e sua relação com o acúmulo de α -sinucleína e a disfunção das vias autofágicas em um modelo experimental de parkinsonismo induzido por rotenona em ratos. Nossos resultados demonstraram que o tratamento com BBG protegeu os animais contra déficits motores e não motores, prevenindo a degeneração dopaminérgica da via nigroestriatal. Esse efeito neuroprotetor foi mediado pelo controle da neuroinflamação, redução do acúmulo de α -sinucleína total e fosforilada, e regulação de proteínas das vias autofágicas e mitofágicas possivelmente através da modulação da ativação exacerbada pelos P2X₇ microgliais. Fornecendo evidências comportamentais, neuroquímicas e morfológicas que sustentam a hipótese de que o antagonismo dos receptores P2X₇ atenua a disfunção e os danos característicos da DP, mesmo quando iniciado após o estabelecimento do processo neurodegenerativo.

A DP esporádica representa cerca de 90-95% dos casos da DP (Simon et al., 2020), com fatores ambientais desempenhando um papel central no risco de desenvolvimento da doença (Shrestha et al., 2020), sendo a exposição à pesticidas o fator de risco mais bem estabelecido (De Miranda et al., 2022 ; Xu et al., 2022). A exposição ao pesticida rotenona é um modelo consolidado para o estudo da DP (Cannon et al., 2009 ; Johnson ; Bobrovskaya, 2015) e reproduz progressivamente alterações comportamentais motoras e não motoras, com uma fase tipo prodrômica bem caracterizada, através de um processo fisiopatológico características da doença (Babatunde et al., 2023; Betarbet et al., 2000; Nascimento et al., 2025; Troshev et al., 2022).

O papel dos receptores P2X₇ na etiopatologia da DP esporádica tem se tornado cada vez mais evidente, uma vez que polimorfismos no gene desse receptor foram identificados como fatores de risco para a doença (Liu et al., 2013) e pacientes com DP apresentam aumento na expressão sistêmica do P2X₇ (Solini et al., 2020). Diversos estudos experimentais também relacionam o receptor P2X₇ à fisiopatologia da DP, demonstrando que sua expressão e atividade aumentadas estão associadas a processos patológicos centrais, como neuroinflamação (Carmo et al., 2014), estresse oxidativo e disfunção mitocondrial (Deng et al., 2021; Sekar et al., 2018) culminando na morte dos neurônios dopaminérgicos da substância negra e o bloqueio desses receptores tem se mostrado neuroprotetor (Carmo et al., 2014; Friedle et al., 2010; Gao et al., 2011; Jamali-Raeufy et al., 2020; Oliveira-Giacomelli et al., 2019; Wang et al., 2017).

A maioria dos estudos que investigam a função neuroprotetora do bloqueio dos receptores P2X₇ inicia a intervenção antes do estabelecimento do processo neurodegenerativo, o que limita sua aplicabilidade clínica. Além disso, poucos trabalhos exploraram o impacto desse bloqueio sobre o acúmulo de α -sinucleína patogênica, um componente central na fisiopatologia da DP (Jiang et al., 2015; Wilkaniec et al., 2017; 2020;).

Dessa forma, nesse estudo, investigamos a capacidade neuroprotetora do antagonismo dos receptores P2X₇ pelo antagonista BBG no modelo de parkinsonismo induzido pela rotenona. Nosso grupo já demonstrou papel protetor do BBG no modelo de hemi-parkinsonismo experimental induzido pela 6-OHDA (Carmo et al., 2014), contudo no presente estudos investigamos o potencial neuroprotetor do BBG quando iniciado numa fase prodrômica e seu efeito sobre o acúmulo de α -sinucleína e disfunção autofágica. Até o momento esse é primeiro trabalho a investigar o efeito neuroprotetor do BBG contra a neurotoxicidade induzida pela rotenona, *in vivo*.

Nosso resultados mostraram que após 14 dias de exposição à rotenona, foram observados prejuízos motores progressivos nos animais, caracterizadas por bradicinesia, evidenciada pela redução da velocidade média e número de *crossings* no teste do campo aberto, deterioração da estabilidade postural, evidenciada pela diminuição do número de *rearings* no teste do campo aberto, e da coordenação motora, evidenciado pela diminuição da latência para queda no teste do rotarod. De fato, a fase clínica da DP é marcada por manifestações motoras, como acinesia, bradicinesia, tremor de repouso, rigidez muscular, instabilidade postural e alterações na marcha resultante da perda de 70 a 80% dos neurônios dopaminérgicos na SNpc, e consequente depleção de dopamina no estriado, resultando na perda da integridade da via-nigroestriatal (Rees et al., 2024).

Estudos anteriores já demonstraram que a exposição sistêmica de roedores à rotenona por um período de duas a quatro semanas induz um quadro de bradicinesia, evidenciado pela diminuição da velocidade média e pela redução do número de cruzamentos no teste do campo aberto (Farombi et al., 2019 ; Nie et al., 2019). Além disso, também já se foi observado que a exposição a rotenona causa prejuízos progressivos na marcha, instabilidade postural e redução no número de escaladas (Troshev et al., 2021), bem como déficits na coordenação motora (Hegab et al., 2020 ; Khatri ; Juvekar, 2016).

Nosso estudo demonstrou que o bloqueio dos receptores P2X₇ pelo BBG protegeu os animais contra os déficits motores induzidos pela rotenona, mesmo quando iniciado após o estabelecimento do processo de neurodegeneração. Em estudo anterior o BBG na dose de 100 mg/kg de BBG demonstrou efeitos protetores em camundongos submetidos a um modelo

combinado de parkinsonismo e depressão, induzido pela exposição ao MPTP e a um protocolo de estresse crônico imprevisível, prevenindo déficits na locomoção no teste de campo aberto e na coordenação motora no teste do rotarod (Ren et al., 2021). Nosso grupo também já demonstrou que a administração de 50 mg/kg de BBG é capaz de proteger animais contra déficits na coordenação motora, no teste do rotarod, induzidos pela 6-OHDA associada à L-DOPA em um modelo de discinesia (Fonteles et al., 2020).

Em ambos os estudos, a melhora ocasionada pelo tratamento com BBG foi associada à redução da degeneração dopaminérgica e ao controle da neuroinflamação. Em concordância com a literatura, nossos resultados também demonstraram que a piora motora observada está associada à degeneração da via nigroestriatal, evidenciada pela redução do conteúdo de dopamina e da imunorreatividade para tirosina hidroxilase na substância negra e no estriado, como consequência da exposição à rotenona. Nossos dados corroboram com os dados da literatura previa, que demonstram que os déficits motores ocasionados pela exposição a rotenona estão ligados a degeneração dopaminérgica da nigroestriatal (Farombi et al., 2019 ; Nie et al., 2019; Troshev et al., 2021 Hegab et al., 2020 ; Khatri ; Juvekar, 2016).

O BBG conferiu proteção contra a morte dos neurônios dopaminérgicos, bem como contra a redução de dopamina estriatal e mesencefálica, sendo esse provavelmente o mecanismo por trás da melhora dos comportamentos motores observados. Nossos achados reforçam os de estudos anteriores, que demonstraram que a administração de 50 mg/kg de BBG sete dias após a indução do modelo de parkinsonismo por 6-OHDA protege ratos contra a degeneração dopaminérgica (Ferrazoli et al., 2017).

Embora a principal característica clínica da DP seja a manifestação de sintomas motores, a doença também apresenta um amplo espectro de manifestações não motoras, como hiposmia, depressão e demência. Esses sintomas tendem a piorar com a progressão da doença e, em muitos casos, podem ser mais incapacitantes do que a própria sintomatologia motora, impactando significativamente a qualidade de vida dos pacientes. (Balestrino ; Schapira, 2020). A fisiopatologia dessas manifestações não motoras apresentam pouca ou nenhuma resposta à reposição de dopamina e parecem envolver disfunções em múltiplos sistemas monoaminérgicos, afetando regiões como o tronco encefálico e o córtex, além da deposição de α -sinucleína em áreas fora dos gânglios da base, como o bulbo olfatório e o trato gastrointestinal (Aarsland et al., 2021; Gu et al., 2024 ;Song et al., 2023; Takeda et al., 2014).

Nossos resultados demonstraram que a exposição à rotenona induziu um quadro de hiposmia progressivo, com início pré-motor, evidenciado pelo aumento no tempo necessário para localizar um pellet de alimento enterrado após sete dias de exposição. Esses achados estão

em concordância com o estudo de Liu e colaboradores (2015), que demonstraram que a exposição ambiental à rotenona provoca déficits precoces na detecção de odores voláteis de camundongos, associados à deposição de α -sinucleína no bulbo olfatório.

Considerando que 90% dos pacientes com DP apresentam disfunção olfativa na capacidade de detectar e discriminar odores nos estágios iniciais do início da doença (Gu et al., 2024) esses achados podem ser considerados uma fase tipo pródrômica do modelo, na qual são observadas alterações não motoras associadas a modificações neuroquímicas iniciais, sem comprometimento motor evidente. Essa hipótese é reforçada pelos nossos resultados que demonstram um aumento significativo nos níveis de noradrenalina no bulbo olfatório, estriado e mesencéfalo após 7 dias de exposição a rotenona, acompanhados de diminuição no conteúdo de dopamina estriatal, na ausência de alterações à nível mesencefálico. Esses resultados sugerem um possível mecanismo de feedback positivo precoce em resposta a perda da integridade na sinalização dopaminérgica, anterior ao estabelecimento de morte celular, como uma estratégia para manter a homeostase o frente a perda de integridade na sinalização dopaminérgica, embora sem morte celular estabelecida

De fato, a noradrenalina exerce propriedades neuroprotetoras, modulando a inflamação e o estresse oxidativo (Gaskill ; Khoshbouei, 2022). Além disso, as projeções noradrenérgicas do *locus coeruleus*, que inervam os neurônios dopaminérgicos do mesencéfalo e do estriado, desempenham um papel fundamental na facilitação do disparo desses neurônios, contribuindo para a regulação da função dopaminérgica (Bari et al., 2020 ; Nikolenko et al., 2024). Assim esse período foi utilizado como ponto de partida para o início do tratamento com BBG, aumentando a relevância translacional dos resultados e sua aplicabilidade à progressão clínica da DP.

A hiposmia na DP é caracterizada por dificuldades na detecção e discriminação de odores e está principalmente associada à deposição de α -sinucleína no bulbo olfatório e em outras áreas envolvidas no controle da olfação (Gu et al., 2024), bem como à desregulação nos níveis de neurotransmissores monoaminérgicos (Fullard, Morley ; Duda, 2017). Em concordância, após 21 dias, as alterações olfatórias foram acompanhadas da diminuição do conteúdo de serotonina e deposição de α -sinucleína fosforilada no bulbo olfatório.

O bloqueio dos receptores P2X₇ pelo BBG por 15 dias protegeu os animais do déficit olfatório na detecção de cheiros voláteis induzido pela exposição à rotenona, demonstrando, pela primeira vez, o potencial terapêutico do bloqueio dos receptores P2X₇ sobre déficits olfatórios em um modelo de parkinsonismo.

Embora essa seja a primeira evidência no contexto da doença de Parkinson, estudos

prévios sugerem que o bloqueio dos P2X₇ também pode modular disfunções olfatórias em outras condições. Mou e colaboradores (2023) demonstraram que a administração de 100 mg/kg de BBG foi capaz de reverter o déficit na detecção de cheiros voláteis em camundongos submetidos a um modelo de rinite alérgica, utilizando o teste do pellet enterrado e esse efeito foi associado à redução da ativação da micróglia. Contudo devido à alta dose de BBG utilizada esse resultado poderia envolver o bloqueios de outros receptores purinérgicos.

Entretando, ao investigar o efeito do antagonista seletivo JNJ-47965567 sobre a micróglia cultivada com meio condicionado de células epiteliais da mucosa nasal tratadas com a proteína alergênica *Dermatophagoides pteronyssinus* 1, os autores observaram que o bloqueio dos P2X₇ preveniu a ativação microglial e, consequentemente, reduziu a liberação de citocinas pró-inflamatórias e fatores apoptóticos (Mou et al., 2024). Esses achados sugerem que a ativação dos P2X₇ microgliais no bulbo olfatório desempenha um papel na patogênese das disfunções olfatórias e as melhorias observadas no modelo animal se devem ao seu antagonismo.

Além disso, é possível que outros mecanismos neuroprotetores estejam envolvidos nesse efeito, uma vez que os dados obtidos no nosso estudo indicam que o tratamento com BBG promove a normalização dos níveis de serotonina e atenua a deposição de α -sinucleína fosforilada no bulbo olfatório. Essa hipótese é reforçada pelo fato de que pacientes com formas familiares de DP associadas a mutações no gene *PRKN*, os quais não apresentam corpos de Lewy no bulbo olfatório, não desenvolvem disfunção olfatória (Chase ; Markopoulou, 2020). O bulbo olfatório também é conhecido por receber uma densa inervação serotoninérgica oriunda dos núcleos da rafe, sendo a modulação por serotonina um fator relevante no processamento olfatório desde seus estágios iniciais (Petzold et al., 2009). Nesse contexto, a restauração do sistema serotoninérgico pode exercer um efeito benéfico sobre a capacidade olfatória dos animais e constituir um dos mecanismos subjacentes à melhora da função olfatória observada nos animais tratados com BBG.

Os animais expostos à rotenona também apresentaram um quadro progressivo de anedonia, evidenciado pela redução do consumo de sacarose no teste de preferência por sacarose. A depressão na DP é caracterizada pela perda de interesse (anedonia), sentimentos de tristeza, aumento da sensação de desamparo e redução da motivação (Laux, 2022). Essa condição afeta aproximadamente 20–30% dos pacientes com DP (Ahmad et al., 2023) e está associada disfunção na via dopaminérgica mesolímbica, que se origina na área tegmental ventral no mesencéfalo e projeta-se ao *núcleo accumbens*, parte do estriado dorsal (Fuente-Fernández, 2013 ; Hammes et al., 2019 ; Nyberg et al., 2015). Além disso, há envolvimento dos sistemas de monoaminas e indolaminas localizados no tronco encefálico (Zhang et al., 2023).

Estudos anteriores já demonstraram que a exposição diária à rotenona na dose de 2,5 mg/kg é capaz de induzir comportamentos do tipo depressivo em camundongos, os quais estão associados à redução dos níveis de serotonina e noradrenalina no estriado e no hipocampo (Miyazaki ; Asanuma, 2020). De acordo, nossos resultados também revelaram uma diminuição da serotonina no estriado e da noradrenalina no mesencéfalo, além de uma redução nos níveis de dopamina, o que pode refletir uma disfunção no sistema mesolímbico, para além do comprometimento do sistema nigroestriatal.

Adicionalmente, observamos a presença de inclusões de α -sinucleína fosforilada no *núcleo accumbens*, um achado que corrobora com a hipótese do envolvimento do sistema límbico no modelo estudado. O *núcleo accumbens*, localizado no estriado ventral, é considerado um dos principais centros neurais associados aos sentimentos de prazer em vertebrados. Sua ativação depende da dopamina liberada pelas projeções neuronais da área tegmentar ventral, as quais integram o sistema mesolímbico, um circuito essencial para a modulação de comportamentos relacionados ao prazer e à recompensa (Brown ; Gershon, 1993 ; Ebrahimi et al., 2024).

O bloqueio dos receptores P2X₇ por meio do tratamento com BBG protegeu os animais do desenvolvimento de comportamentos do tipo depressivo induzidos pela exposição à rotenona. Nossos achados estão em concordância com os resultados de Ren e colaboradores (2021), que demonstraram que o BBG preveniu a manifestação de comportamentos depressivos em camundongos submetidos ao protocolo de estresse crônico imprevisível e à exposição ao MPTP, efeito associado à redução da ativação do inflamassoma NLRP3. De fato, é amplamente reconhecido que a neuroinflamação desempenha um papel central na fisiopatologia da depressão, e evidências crescentes indicam que a superativação dos receptores P2X₇ contribui significativamente para esse processo por meio da ativação do inflamassoma NLRP3 (Ribeiro et al., 2019). Em consonância com esses dados, nossos resultados também demonstraram que o bloqueio dos receptores P2X₇ atenuou a astrogliose, a microgliose e a elevação dos níveis de TNF- α , sugerindo que o controle da neuroinflamação pode representar um dos mecanismos responsáveis pela melhora comportamental observada.

Outros mecanismos também parecem estar envolvidos, uma vez que o tratamento com BBG reduziu a deposição de α -sinucleína fosforilada no *núcleo accumbens*, bem como o acúmulo de α -sinucleína total no estriado e no mesencéfalo, o que pode refletir uma possível melhora na funcionalidade do sistema mesolímbico. Além disso, o BBG restaurou os níveis de dopamina nas regiões estriatal e mesencefálica, considerando o papel fundamental da dopamina na regulação do humor e do sistema de recompensa, esse efeito dopaminérgico também pode

representar um dos mecanismos subjacentes à melhora comportamental observada.

Estima-se que aproximadamente 83% dos pacientes com DP desenvolvam demência ao longo de 20 anos após o diagnóstico (Gibson et al., 2024). Diferentemente de outras formas de demência, a demência associada à DP está relacionada à formação de corpos de Lewy em neurônios colinérgicos e monoaminérgicos do tronco encefálico (Braak et al., 2003). Esse processo leva a uma significativa disfunção sináptica, comprometendo as projeções desses neurônios para o neocórtex, hipocampo e amígdala. Além disso, observa-se prejuízo na sinalização dopaminérgica dirigida às regiões corticais frontal, parietal e temporal, contribuindo para o declínio cognitivo característico da doença (Aarsland et al., 2021).

Em concordância, nossos resultados demonstram que ao final do protocolo de exposição à rotenona, os animais apresentaram comprometimento significativo da memória de trabalho, evidenciado pela redução no número de alternâncias espontâneas no teste do labirinto em Y. Esses achados estão em consonância com evidências prévias da literatura, as quais associam a exposição à rotenona a déficits cognitivos onde relacionam esse déficit à disfunção do sistema dopaminérgico e colinérgico (Moreira et al., 2012; Lv et al., 2019; Atere et al., 2025; El-Shamarka; Abdel-Salam; Omara, 2024; Kotsyuba; Dyachuk, 2024).

Podemos de fato inferir que os déficits de memória observados podem ser causados, ao menos em parte, pela redução dos níveis de dopamina, uma vez que essa monoamina desempenha um papel crucial na regulação de diversas etapas da aprendizagem, da memória e da plasticidade sináptica (Calabresi et al., 2007; Jay, 2003). A dopamina facilita, por exemplo, a consolidação da memória por meio do circuito entorrinal-hipocampal, promovendo a inserção eficiente de informações nesse sistema (Lee et al., 2022). Além disso, exerce influência significativa na modulação da memória de trabalho por meio de sua atuação sobre os circuitos do córtex pré-frontal (Iversen, 1998; Liggins, 2009). Sabe-se também que, quando liberada no hipocampo dorsal, a dopamina se liga aos receptores D1 e D5, promovendo a formação de memória episódica, o aprendizado espacial e a indução de plasticidade sináptica (Kempadoo et al., 2016; Yamasaki; Takeuchi, 2017).

No entanto não podemos descartar alterações no sistema colinérgico como possível explicações para tais alterações, visto que a degeneração dos neurônios colinérgicos do núcleo basal de Meynert contribui diretamente para o declínio cognitivo na DP (Brown et al., 2024; Nakano & Hirano, 1984; Perry et al., 1985; Rogers; Brogan; Mirra, 1985), já que a exposição a rotenona pode causar disfunções nesse sistema (Atere et al., 2025; El-Shamarka; Abdel-Salam; Omara, 2024; Kotsyuba; Dyachuk, 2024).

Também não se pode descartar o papel do acúmulo de α -sinucleína como fator

contribuinte para os déficits cognitivos observados. Na clínica da doença de Parkinson, há uma forte associação entre hiposmia e disfunções cognitivas, como os distúrbios de memória, os quais estão frequentemente relacionados à presença de inclusões de corpos de Lewy em regiões envolvidas tanto na percepção olfatória quanto no processamento da memória, como a amígdala, o hipocampo e o córtex orbitofrontal (Takeda et al., 2014). De forma consistente, nossos resultados demonstraram a presença de disfunção olfatória associada à agregação de α -sinucleína, sugerindo que esses depósitos patológicos podem estar implicados não apenas nos déficits sensoriais, mas também nos comprometimentos cognitivos observados.

O tratamento com BBG protegeu os animais expostos à rotenona do déficit de memória de trabalho observado. Resultados anteriores do nosso grupo já haviam demonstrado que o bloqueio dos receptores P2X₇ pode contribuir para a preservação da memória. Em estudo prévio, o tratamento com 45 mg/kg de BBG protegeu ratos contra déficits na memória aversiva de curto e longo prazo, bem como na memória espacial, induzidos pela injeção intraestriatal de 6-hidroxidopamina. Esses efeitos foram acompanhados pela redução da degeneração dopaminérgica e da resposta neuroinflamatória, sugerindo que os mecanismos de neuroproteção mediados pelo BBG incluem a modulação tanto da neurotransmissão dopaminérgica quanto da inflamação neural (Carmo et al., 2014).

Adicionalmente, Irwin e colaboradores (2016) demonstraram que o tratamento com BBG, administrado ad libitum na água por um período de três meses, protegeu camundongos transgênicos modelo da doença de Alzheimer (APP^{SwDI}/NOS2^{-/-}) da degeneração neuronal no hipocampo, efeito atribuído ao controle da agregação proteica de amiloides (Irwin et al., 2016), demonstrando o efeito protetor do bloqueio dos receptores P2X₇ contra agregação proteica neurotóxica para a memória. Assim, acreditamos que a proteção contra os déficits de memória observada no presente estudo, conferida pelo BBG, provavelmente decorre da preservação da via nigroestriatal e dos níveis de dopamina, do controle da neuroinflamação e da redução no acúmulo e deposição de α -sinucleína. Esses mecanismos, atuando de forma integrada, parecem contribuir para a manutenção da integridade funcional de circuitos neurais associados à memória de trabalho e ao desempenho cognitivo.

A desregulação monoaminérgica e a degeneração da via nigroestriatal observadas após a exposição à rotenona devem-se, em grande parte, à inibição do complexo I da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial e ao consequente aumento do estresse oxidativo, condições às quais os neurônios dopaminérgicos são especialmente vulneráveis devido a sua alta demanda energética e à produção basal elevada de espécies reativas de oxigênio. Essa crise bioenergética resulta em uma entrada excessiva de cálcio nas células, o que contribui para a

disfunção neuronal e ativa micróglia e astrócitos, desencadeando uma resposta inflamatória exacerbada no tecido neural (Lawana ; Cannon, 2020). Como observado até aqui, essa resposta inflamatória desempenha papel fundamental na patologia em diversas disfunções comportamentais resultantes da exposição a rotenona.

A inflamação desempenha um papel central na fisiopatologia da doença de Parkinson, envolvendo a superativação de micróglia e astrócitos, bem como a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1 β e IL-6. Esse processo desencadeia um ciclo vicioso de inflamação crônica e morte neuronal, perpetuando a degeneração e acelerando a progressão da doença (Mogi et al., 1994; Mogi et al., 1995; Mogi et al., 1996; Eser, 2024). Em consonância com esses dados, nossos resultados demonstraram que a exposição à rotenona induz um quadro de neuroinflamação no estriado e na substância negra, evidenciado pela ativação e expansão micróglia, aumento da reatividade astrocitária e elevação nos níveis de TNF- α . Esses achados corroboram dados previamente descritos na literatura (Dodiya et al., 2020 ; Dong-xin et al., 2020) reforçando o papel da neuroinflamação como um dos principais mecanismos patológicos desencadeados pela exposição à rotenona.

No presente estudo, o bloqueio dos receptores P2X₇ pelo BBG protegeu os animais da neuroinflamação estriatal, evidenciado pela redução da proliferação microglial e da ativação astrocitária, além da diminuição significativa dos níveis de TNF- α . Na substância negra, o tratamento com BBG também reduziu a ativação astrocitária de forma marcante e reduziu os níveis de TNF- α , embora esta última alteração não tenha alcançado significância estatística. Esses resultados sugerem que a inibição da neuroinflamação mediada por P2X₇ representa um dos principais mecanismos de neuroproteção conferidos pelo BBG, reforçando o papel crítico da sinalização purinérgica na modulação da resposta inflamatória associada à degeneração nigroestriatal.

Nossos achados corroboram evidências prévias da literatura que demonstram o efeito neuroprotetor do bloqueio dos receptores P2X₇ em modelos experimentais de doença de Parkinson. Estudos anteriores comprovaram que a inibição dessa via reduz significativamente a proliferação e ativação microglial, a reatividade astrocitária, a ativação do inflamassoma NLRP3, e os níveis de citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-1 β e TNF- α (Carmo et al., 2014 ; Fonteles et al., 2020 ; Ma et al., 2014 ; Oliveira-Giacomelli et al., 2019 ; Ren et al., 2023 ; Wang et al., 2017). Esses dados coletivamente reforçam o papel central dos receptores P2X₇ na mediação da neuroinflamação característica da fisiopatologia da DP.

A participação dos receptores P2X₇ nas respostas inflamatórias está bem estabelecida na literatura, sendo mediada por sua expressão predominante em células do sistema imune,

particularmente na micróglia. Quando ativados por altas concentrações de ATP extracelular, liberado durante dano tecidual, esses receptores induzem influxo de Ca^{2+} , causando despolarização da membrana e ativação de um estado pró-inflamatório (Burnstock, 2016; Di Virgilio et al., 2017; Wang et al., 2020). Além disso, os receptores P2X_7 são cruciais para a liberação de citocinas pró-inflamatórias, destacando-se como um dos principais ativadores do inflamassoma NLRP3. Esse mecanismo ocorre através de efluxo de K^+ e subsequente ativação da caspase-1, que cliva a pró-IL-1 β em sua forma ativa (IL-1 β), desencadeando uma cascata amplificadora da resposta imune (Biasizzo ; Kopitar-Jerala, 2020; Huang, Xu, ; Zhou, 2021; Kelley et al, 2019).

De forma controversa, o bloqueio dos receptores P2X_7 no presente estudo resultou em um aumento da proliferação microglial em animais do grupo controle, não expostos à rotenona. Tradicionalmente, os receptores P2X_7 são associados a proliferação microglial em contextos patológicos, como em situações de dano tecidual e inflamação (Janks, Sharma, & Egan, 2018; Rigato et al., 2012). No entanto, nossos achados sugerem que, na ausência de um estímulo nocivo, esses receptores podem exercer funções reguladoras no tônus basal da população microglial em condição fisiológica. Essa ideia é reforçada pelo fato da proliferação microglial observada não ter sido acompanhada por elevação na ativação astrocitária nem por níveis aumentados de TNF- α , sugerindo um possível papel modulador dos receptores P2X_7 na regulação da população e da função da micróglia, para além de seu envolvimento direto na ativação pró-inflamatória, participando possivelmente de um processo adaptativo ou modulatório, uma vez que a inibição dos receptores P2X_7 poderia estar interferindo nos mecanismos homeostáticos que controlam a densidade e distribuição microglial, levando a um aumento compensatório da população dessas células.

Contudo esse é o primeiro estudo, até onde temos conhecimento, indicar uma relação entre a função dos receptores P2X_7 e a função microglial em condições fisiológicas, sendo necessário investigações adicionais para elucidar os mecanismos subjacentes a esse efeito. Além disso, é importante explorar se esse fenômeno se estende a outras células do sistema imune, uma vez que tal mecanismo pode estar envolvido em reações adversas observadas em ensaios clínicos com antagonistas de receptores P2X_7 .

A inflamação também apresenta uma relação direta com a sinucleinopatologia observada na DP, uma vez que as células da glia parecem participar ativamente da propagação célula-a-célula da α -sinucleína em um modelo “prion-like” (Wu ; Schekman, 2024). Além disso, micróglias e astrócitos são ativados em resposta à presença de agregados extracelulares de α -sinucleína (Chou et al., 2021; Austin et al., 2006; Hoffmann et al., 2016), contribuindo para um

ciclo vicioso que favorece tanto a propagação da α -sinucleína quanto a ativação glial. Nesse contexto, é plausível que a neuroinflamação mediada pela ativação dos receptores P2X₇ esteja envolvida no acúmulo de α -sinucleína no mesencéfalo e estriado, bem como na deposição de sua forma fosforilada na serina 129 ao longo da via nigroestriatal, no *núcleo accumbens* e no bulbo olfatório, conforme observado no presente estudo. Essa hipótese é reforçada pela constatação de que o tratamento com BBG foi capaz de reduzir tanto o acúmulo quanto a deposição de α -sinucleína, paralelamente à atenuação do quadro neuroinflamatório, sugerindo uma possível relação causal entre esses processos.

Outros mecanismos também parecem estar envolvidos, uma vez que estudos *in vitro* com micróglia e células SH-SY5Y expostas à α -sinucleína demonstram que sua neurotoxicidade pode estar diretamente relacionada à sua interação com os receptores P2X₇. Nesses modelos, a exposição à α -sinucleína induziu a ativação desses receptores, promovendo um influxo exacerbado de cálcio, liberação excessiva de ATP e redução da atividade da ecto-ATPase extracelular (Wilkaniec et al., 2017). Além disso, a estimulação dos receptores P2X₇ pela α -sinucleína também foi associada à indução de estresse oxidativo, à ativação de vias de morte celular programada e à redução da expressão da proteína Parkin, resultando em inibição da mitofagia e acúmulo de mitocôndrias disfuncionais (Wilkaniec et al., 2020). Dessa forma, não se pode descartar que o efeito protetor observado com o BBG contra o acúmulo e deposição de α -sinucleína esteja relacionado ao bloqueio da interação direta entre a α -sinucleína e os receptores P2X₇ e consequente ativação de vias que sustentam a propagação dessa proteína.

Até onde sabemos, este é o primeiro estudo a demonstrar o efeito neuroprotetor do bloqueio dos receptores P2X₇ sobre o acúmulo de α -sinucleína *in vivo* em um modelo animal de parkinsonismo, bem como a primeira evidência relacionando esse bloqueio à redução da deposição de α -sinucleína fosforilada. Esses achados possuem grande relevância, uma vez que os agregados de α -sinucleína desempenham um papel central na fisiopatologia da degeneração dopaminérgica e das demais disfunções observadas na DP. A forma patogênica dessa proteína provoca danos diretos aos terminais sinápticos, comprometendo a liberação de neurotransmissores e, consequentemente, a comunicação neuronal (Bridi ; Hirth, 2018; Li ; Dettmer, 2024). Além de seu papel na perpetuação da neuroinflamação, a α -sinucleína também promove disfunção mitocondrial, causando alterações morfológicas e funcionais nessas organelas, o que leva a uma crise bioenergética e ao acúmulo de ROS, agravando o processo de neurodegeneração (Geibl et al., 2023).

Os neurônios dopaminérgicos são particularmente vulneráveis ao acúmulo de formas patogênicas de α -sinucleína devido à sua extensa arborização axonal e ao elevado número de

terminais sinápticos (Calabresi et al., 2023), características que impõem uma alta demanda energética. Essa condição os torna especialmente suscetíveis à disfunção mitocondrial e ao estresse oxidativo induzidos pela α -sinucleína. Além disso, evidências apontam que a interação direta da α -sinucleína com a TH reduz a síntese de dopamina, enquanto sua interferência com o VMAT2 compromete o adequado armazenamento da dopamina nas vesículas sinápticas. (Pedersen et al., 2021 ; Xu et al., 2002 ; J. Zhang et al., 2021). Diante de tais evidências, recentemente a DP passou a ser redefinida não apenas como uma síndrome clínica, mas como uma enfermidade neuronal primariamente associada à α -sinucleína (Simuni et al., 2024).

Muito embora ainda não haja consenso sobre qual conformação da α -sinucleína seja a principal responsável por sua neurotoxicidade, diversas formas, incluindo as variantes monomérica, oligomérica e fibrilar, têm sido associadas a efeitos deletérios nos neurônios (Emin et al., 2022 ; Lázaro et al., 2014 ; Sant'Anna et al., 2023 ; Weish et al., 2021). Notavelmente, cerca de 90% da α -sinucleína presente nos corpúsculos de Lewy encontra-se fosforilada na serina 129, ao passo que, em condições fisiológicas, apenas cerca de 5% da proteína apresenta essa modificação. Esse dado sugere uma forte correlação entre a fosforilação na serina 129 e a patogenicidade da α -sinucleína (Park et al., 2024).

Assim, acreditamos que a regulação das alterações na população de α -sinucleína e a consequente redução de sua deposição tenham desempenhado um papel central na neuroproteção observada no presente estudo. Esses achados reforçam a implicação dos receptores P2X₇ na patogênese da DP e destacam o potencial terapêutico do bloqueio desses receptores, não apenas na DP, mas também em outras patologias associadas à α -sinucleína.

Sob condições fisiológicas, a α -sinucleína é predominantemente degradada por autofagia mediada por chaperonas, enquanto suas formas agregadas são eliminadas principalmente por macroautofagia (Cuervo et al., 2004 ; Mak et al., 2010 ; Xilouri et al., 2008). No entanto, na DP, essas vias autofágicas encontram-se comprometidas, sendo possível observar alterações nos níveis de diversas proteínas-chave envolvidas em múltiplas rotas autofágicas. Dentre essas alterações, destacam-se o aumento da ubiquitina e de proteínas ubiquitinadas, além da elevação de marcadores associados à macroautofagia e mitofagia, como LC3, PINK1 e BECN1. Simultaneamente, há uma redução na expressão de proteínas essenciais para a autofagia mediada por chaperonas, como LAMP2 e Hsc70, indicando uma disfunção generalizada nos processos de degradação proteica (Toulorge et al., 2016).

Em concordância, nossos resultados demonstraram que a exposição à rotenona induziu um aumento nos níveis da proteína LC3 no mesencéfalo, marcador associado à formação de autofagossomos (Kabeya, 2000). Esse achado sugere um acúmulo de autofagossomos,

possivelmente devido a um retardo na formação ou a um prejuízo na maturação dessas estruturas, comprometendo o fluxo autofágico. Tal resultado corrobora dados prévios da literatura que demonstram que a exposição à rotenona interfere em diversos pontos da via macroautofágica, o que pode ser observado pelo aumento dos níveis de LC3-II, p62, Beclin-1 e mTOR, acompanhado do acúmulo de α -sinucleína em diversos estudos *in vivo* (Hedya; Safar; Bahgat, 2018; Wang et al., 2018; Zeng et al., 2019) e *in vitro* (Filomeni et al., 2012; Mader et al., 2012; Pan et al., 2009; Wu et al., 2015; Xiong et al., 2011; Xiong et al., 2013). Assim, essa disfunção pode ser um dos mecanismos subjacentes ao acúmulo de α -sinucleína patogênica observado no presente estudo.

Em contraste com a literatura (Hedya; Safar; Bahgat, 2018; Wang et al., 2018; Zeng et al., 2019; Filomeni et al., 2012; Mader et al., 2012; Pan et al., 2009; Wu et al., 2015; Xiong et al., 2011; Xiong et al., 2013), não foram observadas alterações na densidade da proteína p62, que possui motivos LIR, responsáveis por sua ligação à LC3-II no autofagossomo, e um domínio UBA (*ubiquitin-associated domain*), que se liga a proteínas ubiquitinadas destinadas à degradação (Komatsu et al., 2007). Esse resultado, em conjunto com o aumento dos níveis de LC3, sugere que, no modelo utilizado no presente estudo, a exposição à rotenona leva ao aumento do estímulo inicial à formação de autofagossomos, mas que a fase degradativa encontra-se saturada, o que pode ocorrer em decorrência do acúmulo de α -sinucleína (Noda et al., 2025; Watanabe et al., 2012).

No presente estudo, também não foram observadas alterações na densidade do receptor lisossomal LAMP-2. Esse receptor atua na membrana lisossomal na via autofágica mediada por chaperonas, reconhecendo proteínas com o motivo KFERQ, via a chaperona Hsc70, e facilitando sua translocação para o lúmen do lisossomo (Cuervo; Dice, 1996; Yamamoto; Matsui, 2024). Assim, esse resultado sugere que, no presente estudo, a rotenona prejudica a via macroautofágica, sem interferir na via autofágica mediada por chaperonas.

Além disso, observamos um aumento nos níveis da proteína PINK1 no mesencéfalo de ratos expostos à rotenona, o que indica um quadro de disfunção mitocondrial, e comprometimento da via de mitofagia. Nossos dados corroboram os achados da literatura previa que demonstram que a exposição a rotenona induz ao comprometimento da mitofagia dependente de PINK1/Parkin, indicado pelo acúmulo das proteínas PINK1 e Parkin (Dilnashin et al., 2025; Park; Koh, 2020; Peng et al., 2019). A proteína PINK1 normalmente se acumula na membrana externa de mitocôndrias danificadas, atuando como um sinal para sua eliminação por meio da via mitofágica dependente de PINK1–Parkin (Narendra et al., 2008 ; Valente et al., 2004). Assim, esse acúmulo pode refletir uma falha na progressão adequada desse processo,

contribuindo para o acúmulo de mitocôndrias disfuncionais, estresse oxidativo e, consequentemente, para a neurodegeneração.

Nossos resultados também demonstraram que a rotenona induz ao aumento da deposição da proteína ubiquitina na via nigroestriatal, essa proteína marca organelas e outras proteínas para degradação seletiva (Hershko; Ciechanover; Rose, 1979). Nossos resultados corroboram com a literatura prévia, que demonstraram que a exposição *in vitro* e *in vivo* à rotenona induz um aumento de proteínas ubiquitinadas (Betarbet et al., 2006; Sotzny et al., 2016). Esse aumento induzido pela rotenona parece está relacionado a inibição do sistema ubiquitina-proteassomo (UPS), da macroautofagia, mitofagia e ao aumento dos níveis de α -sinucleína patogênica (Betarbet et al., 2006 ; Chou et al., 2010 ; Ramalingam et al., 2024), o que é corroborado pelos nossos resultados.

O bloqueio dos receptores P2X₇ pelo BBG reduziu significativamente o acúmulo de LC3 e PINK1 induzido pela rotenona, indicando uma regulação da macroautofagia e mitofagia. Embora nenhum estudo prévio tenha vinculado diretamente a ativação de P2X₇ à desregulação autofágica na DP, evidências *in vitro* mostram que esses receptores, quando ativados em micróglias, aumentam a expressão de LC3, promovem a fosforilação de AMPK e prejudicam a função lisossomal, retardando a formação e maturação de autofagossomos (Campagno ; Mitchell, 2021 ; Takenouchi et al., 2009). Corroborando esses achados, estudos demonstram que antagonistas de P2X₇ restauram a função lisossomal e o fluxo autofágico em micróglias reativas (Fabrizio et al., 2017) e melhoraram parâmetros motores em modelos de ELA através da redução de marcadores autofágicos como LC3 e p62 (Apolloni et al., 2021).

Além disso, estudos anteriores também já demonstram uma relação entre a ativação farmacológica dos receptores P2X₇ com a desregulação da mitofagia. A ativação desses receptores em micróglias leva a ativação de AMPK dependente de ROS, desregulação das proteínas da via mitofagia PINK1 e Parkin, fissão mitocondrial e inibição da função respiratória (Sekar et al., 2018), demonstrando papel dos receptores P2X₇ no controle de qualidade e dinâmica mitocondrial, corroborando com nossos achados.

O bloqueio dos receptores P2X₇ também diminuiu os níveis de ubiquitina estriatal. Embora esse seja o primeiro trabalho a mostrar o efeito do bloqueio dos receptores P2X₇ sobre os níveis de ubiquitina num modelos de parkinsonismo, Bianchi e colaboradores (2023), demonstraram que o bloqueio dos receptores P2X₇ pelo antagonista GSK1482160A diminuíram os níveis de proteínas poliubiquitinadas hipocampus de camundongos P301S, modelo genético da doença de Alzheimer. A diminuição dos níveis de ubiquitina no presente estudo pode estar relacionada a melhora do fluxo autofágico e mitofágico promovida pelo tratamento

com BBG, diminuindo o acúmulo de proteínas e organelas marcadas para degradação pela ubiquitina.

A ação moduladora do bloqueio dos receptores P2X₇ nas vias autofágicas parece envolver o controle da inflamação e do estresse oxidativo (Apolloni et al., 2021 ; Fabbri et al., 2017). De fato, é bem estabelecido que citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1, IL-2 e IL-6 possuem ação indutora da autofagia, promovendo o aumento da expressão de diversos genes da maquinaria autofágica, incluindo o LC3 (Qian et al., 2017). Além disso, existe uma relação bidirecional entre a ativação do inflamassoma NLRP3 e a indução da autofagia (Klionsky et al., 2021), e a superexpressão de moléculas centrais do inflamassoma induzem a elevação dos níveis de LC3 (Deng et al., 2015). Uma vez que a ativação dos receptores P2X₇ é ativador potente do inflamassoma NLRP3 (Ferrari, 1997; Franceschini et al., 2015; Lister et al., 2007) , o restabelecimento das vias autofágicas observado no presente estudo provavelmente se deve ao controle da inflamação promovido pelo bloqueio dos receptores P2X₇.

Contudo a redução da α -sinucleína promovida pelo BBG também pode ser um dos mecanismos regulatórios da autofagia, uma vez que paradoxalmente a α -sinucleína inibe as próprias vias de degradação, interagindo com diversas proteínas da maquinaria de diferentes vias autofágica (Cuervo et al., 2004 ; Fellner et al., 2021 ; Winslow ; Rubinsztein, 2011). Além disso a α -sinucleína também interage com o sistema ubiquitina-proteassoma, inibindo a atividade proteassomal através da saturação do sistema ou da interação direta com proteínas como ubiquitina e Parkin, comprometendo a marcação de substratos, como proteínas disfuncionais e organelas defeituosas, para degradação (Le Guerroué ; Youle, 2021).

Nossos resultados demonstraram que o bloqueio dos receptores P2X₇ reduziu drasticamente os níveis de expressão da proteína parkin apenas em condição patológica, ou seja, no grupo parkinsoniano. Esse achado é controverso, uma vez que, em condições fisiológicas, a Parkin participa de um dos principais mecanismos de mitofagia, a via dependente de PINK1/Parkin, sendo crucial para a manutenção da qualidade mitocondrial. Além disso, a Parkin também atua no sistema ubiquitina-proteassoma, promovendo a degradação de diversos substratos por meio da ubiquitinação. O silenciamento dessa proteína tem sido associado ao surgimento de déficits motores e cognitivos, acúmulo de seus substratos, alterações no metabolismo da dopamina, estresse oxidativo e morte celular (Arkinson ; Walden, 2018; Hattori ; Mizuno, 2004).

Acreditamos que a exposição a rotenona, que leva a hiperatividade do P2X₇, poderia estimular a função da Parkin como parte de um mecanismo de defesa para mitigar danos mitocondriais ou inflamatórios como resposta compensatórias e nesse cenário ao bloquear o

receptor, removemos o estímulo que mantinha os níveis de Parkin elevados, resultando em sua redução. Essa ideia é reforçada pelo fato de em estudos *in vitro* anteriores a exposição a rotenona induziu o aumento de parkin (Dilnashin et al., 2025; Park; Koh, 2020; Peng et al., 2019). E também pelo fato de que em condições fisiológicas a parkin inibe a formação do inflamossoma NLRP3 por meio da ubiquitinação e direcionamento para degradação proteassomal (Panicker et al., 2022), assim uma vez bloqueado o principal promotor de formação do inflamassoma, a ativação dos receptores P2X₇, o estímulo para produção da proteína é abolindo, podendo levar a redução dos seus níveis. Essa hipótese é reforçada pelo fato da estimulação farmacológica dos receptores P2X₇ induzem ao aumento dose dependente da expressão de parkin (Sekar et al., 2018).

Também é relevante destacar que tanto PINK1 quanto a parkin são proteínas presentes nos corpúsculos de Lewy (Koeglsperger et al., 2023), estando a parkin envolvida no processo de formação dessas inclusões através da ubiquitinação da sinfilina-1, uma proteína que interage com a α -sinucleína (Chung et al., 2001). Esse mecanismo é corroborado pela observação de que pacientes com formas familiares de Parkinson decorrentes de mutações no gene PARK2, que codifica a parkin, não desenvolvem inclusões neuronais características dos corpúsculos de Lewy (Madsen et al., 2021). Assim a redução dos níveis de parkin pode ser um mecanismo adicional pelo qual o bloqueios dos receptores P2X₇ levam a redução de α -sinucleína patogênica, contudo, mais estudo são necessários para investigar essa relação.

As implicações desses achados são clinicamente relevantes, já que a relação bidirecional entre essas duas proteínas ressalta a importância de considerar o estágio da doença e o estado funcional das vias celulares no desenvolvimento de terapias, evitando abordagens unidimensionais que possam desencadear efeitos paradoxais. Estratégias terapêuticas baseadas no bloqueio do P2X₇ precisam ser cautelosamente avaliadas, uma vez que dependente do contexto patológico, a queda acentuada da parkin poderia comprometer a mitofagia e a homeostase mitocondrial, agravando a degeneração neuronal.

Em concordância com o exposto até aqui, nossos resultados demonstraram que a exposição à rotenona levou ao aumento a densidade dos receptores P2X₇ na micróglia estriatal, evidenciado pela imunorreatividade aumentada para P2X₇ em animais expostos à toxina, com colocalização com o marcador microglial CD11b, demonstrando que o aumento dos receptores P2X₇ é um dos mecanismos de neurotoxicidade da rotenona. Embora esse seja o primeiro estudo mostrando que a exposição a rotenona induz o aumento da expressão dos receptores P2X₇ *in vivo*, estudos anteriores já demonstram a capacidade dessa toxina de aumentar o nível basal de transcrição desses receptores e sua expressão *in vitro* (Gao et al., 2011 ; Hracská et al.,

2011). O mesmo resultado não foi observado na avaliação da expressão desses receptores via western blotting.

Nas condições avaliadas, não foi observada colocalização dos receptores P2X₇ com neurônios dopaminérgicos ou astrócitos, sendo observado apenas na micróglia, reforçando a ideia de que o aumento desses receptores em situações patológicas ocorrerem majoritariamente em células do sistema imune, como a micróglia, estando intrinsecamente ligado a sua mudança fenotípica para um estado pró-inflamatório (Calovi et al., 2019).

A localização dos receptores P2X₇ é controversa, embora sua presença na micróglia seja bem estabelecida, sua ocorrência astrócitos e neurônios é cercada de discussões e inconsistências, principalmente em relação a esse último, contudo essas associações não podem ser descartadas (Illes et al., 2017). Isso se deve provavelmente a dificuldade de marcar especificamente esse receptor, devido a grande quantidade de isoformas do P2X₇ bem, como a baixa afinidade e inespecificidade dos anticorpos disponíveis (Anderson ; Nedergaard, 2006; Leite-Aguiar et al., 2024; Li et al., 2020)

De fato, mesmo utilizando o mesmo anticorpo para as duas técnicas de avaliação do receptor, considerado altamente específico devido a sua validação em animais knockout (#APR-004, Alomone, Jerusalem, Israel), obtivemos resultados inconsistentes de quantificação do receptor entre as técnicas de imunofluorescência e western blotting, o que pode refletir os diferentes processamentos da amostra, uma vez que as técnicas possuem diferentes processamentos de epítipo e a imunofluorescência marca os epítopos expressos na membrana celular, enquanto a quantificação do proteica do western blotting englobando a proteínas totais de membrana e citosólica.

Adicionalmente o tratamento com o BBG reduziu imunorreatividade dos receptores P2X₇ estriatal. Esses dados corroboram com a extensa literatura que mostra que o BBG é um potente inibidor seletivo e não competitivo dos receptores P2X₇, especialmente em ratos (Bin Dayel et al., 2019; Jiang et al., 2000). E essa redução dos receptores P2X₇ é o provável mecanismos terapêutico do BBG.

A seletividade do BBG ao receptor P2X₇ também é controversa, uma vez que estudos demonstram que esse corante também pode antagonizar os receptores P2X₁, P2X₂, P2X₃, e P2X₄, contudo as doses necessárias para essa ação são 8-50 vezes maiores que aquelas necessárias para o antagonismo do P2X₇ (Burnstock ; Verkhratsky, 2012). Entretanto ressaltamos que nosso trabalho não objetiva propor o BBG como uma terapia, e sim utilizar o corante como uma ferramenta para ampliar o conhecimento da capacidade terapêutica do

bloqueios dos receptores P2X₇, que podem ser transacionadas para clínica através da utilização de antagonistas mais seletivos já existentes.

A ocorrência dos heterotrímeros P2X₄/P2X₇ e a ação do BBG sobre os receptores P2X₄ poderia consistir em outro mecanismos por trás dos resultados observados no presente estudo, entretanto além de estudos que indicam que os heterotrímeros P2X₄/P2X₇ podem não diferir significativamente dos homômeros (Antonio et al., 2011 ; Craigie et al., 2013 ; C. Guo et al., 2007 ; Schneider et al., 2017), estudos anteriores demonstraram que o aumento da transcrição dos receptores P2X₇ estriatais em resposta a exposição a rotenona não está acompanhada do aumento da transcrição dos receptores P2X₄ (Gao et al., 2011 ; Hracská et al., 2011). Assim podemos supor que os resultados observados no presente estudo se devem a antagonização seletiva dos receptores P2X₇.

Assim, nossos resultados indicam que a disfunção purinérgica microglial induzida pela rotenona atua como um centro de patogenicidade, amplificando múltiplos aspectos da neurodegeneração, como a liberação de citocinas pró-inflamatórias, o recrutamento e a ativação de astrócitos, o acúmulo de α -sinucleína patogênica e a disfunção dos processos autofágicos. Esses mecanismos, por sua vez, retroalimentam a ativação microglial, instaurando um ciclo vicioso de neuroinflamação e dano celular progressivo, que culmina na morte de neurônios dopaminérgicos.

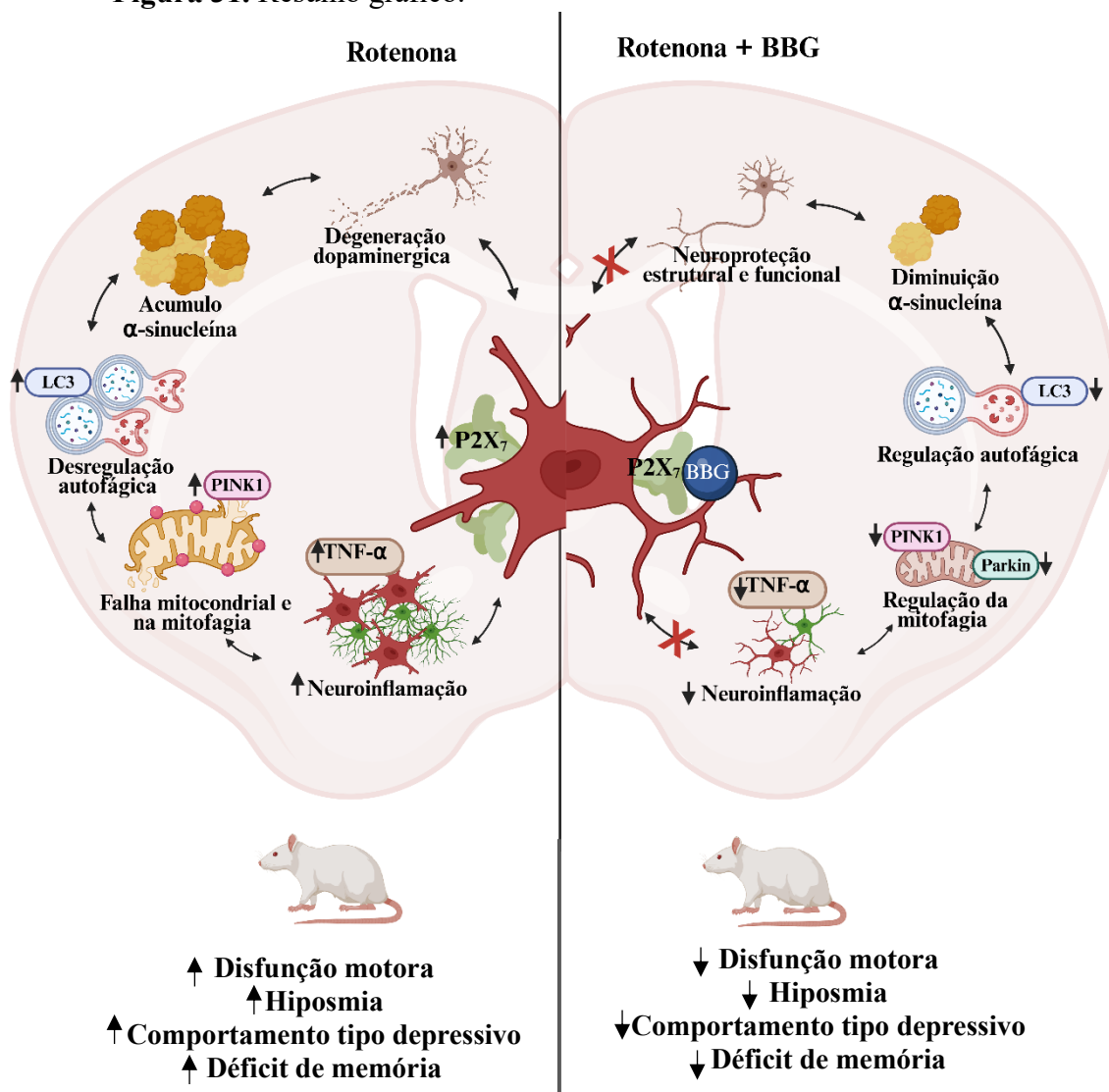
Essa hipótese é reforçada pela observação de que o tratamento com BBG resultou no controle da neuroinflamação, na restauração das vias autofágica e mitofágica e na redução da patogenicidade da α -sinucleína.

Nosso trabalho apresenta algumas limitações. A primeiro seria a necessidade da quantificação da citocina IL1- β para estabelecimento direto da relação entre os achados e a ativação do inflamassoma NLRP3, que reforçaria a ideia da ativação microglial bem a relação deste com as disfunções autofágicas observadas. O segundo seria identificar qual o tipo ou tipos celulares que apresentam as disfunções autofágicas observadas (De Salis et al., 2022 ; Pegoraro et al., 2024).

Coletivamente nossos achados revelam que a hiperatividade dos receptores P2X₇ microglial induzida pela rotenona atua como um centro de integração patogênico multifacetado, amplificando a neuroinflamação, desregulando os processos autofágicos e promovendo o acúmulo de α -sinucleína patogênica, criando um ciclo vicioso que culmina na morte de neurônios dopaminérgicos. Assim nossos dados não apenas corroboram o potencial terapêutico do antagonismo aos receptores P2X₇ como estratégia do controle da regulação da neuroinflamação associada a DP, mas também expandem sua relevância para a recuperação de

mecanismos celulares essenciais comprometidos na progressão da DP, como a disfunção autofágica e deposição proteica (Figura 31). Essa abordagem multifacetada posiciona os receptores P2X₇ como alvos terapêuticos promissores de múltiplas vias patogênicas da DP, inclusive em estágios já estabelecidos da doença, e possivelmente em outras sinucleinopatias que compartilham mecanismos patológicos semelhantes.

Figura 31. Resumo gráfico.



Fonte: Criado com BioRender.com

7 CONCLUSÃO

O antagonismo dos receptores P2X₇ pelo BBG confere neuroproteção a ratos submetidos ao modelo de parkinsonismo induzido por exposição sistêmica à rotenona, mesmo quando iniciado em uma fase prodrômica.

A neuroproteção conferida pelo BBG envolve a regulação de múltiplas vias patogênicas, como a neuroinflamação (com diminuição da astrogliose, microgliose e dos níveis de TNF- α), a redução do acúmulo de α -sinucleína total e fosforilada, e a modulação da autofagia (com diminuição dos níveis de LC3 e PINK1). Esses efeitos culminam em proteção funcional (aumento dos níveis de dopamina) e estrutural (redução da perda neuronal dopaminérgica), resultando na redução do comprometimento motor e não motor.

REFERÊNCIAS

- AARSLAND, D. et al. Parkinson disease-associated cognitive impairment. *Nature Reviews Disease Primers*, v. 7, n. 1, p. 47, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41572-021-00280-3>.
- ABATUNDE, B. R. et al. Rotenone induced olfactory deficit in Parkinson's disease rat model: The protective role of adenosine A2A receptors antagonist. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, [S.l.], v. 127, p. 102188, ago. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2022.102188>.
- ABBRACCHIO, M. P. et al. Purinergic signalling in the nervous system: an overview. *Trends in Neurosciences*, v. 32, n. 1, p. 19-29, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tins.2008.10.001>.
- ABDEL-SALAM, O. M. E. et al. Inhibition Of Pentylenetetrazole-Induced Seizures And Neuronal Injury By Brilliant Blue G: Role Of Oxidative Stress, And Brain Derived Neurotrophic Factor. *Egyptian Journal of Chemistry*, v. 65, n. 8, p. 215-225, 2022. DOI: <https://doi.org/10.21608/ejchem.2022.107013.4916>.
- AHMAD, M. H. et al. Neurobiology of depression in Parkinson's disease: Insights into epidemiology, molecular mechanisms and treatment strategies. *Ageing Research Reviews*, v. 85, p. 101840, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.arr.2022.101840>.
- AKESHIGE, K. et al. Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. *Journal of Cell Biology*, v. 119, n. 2, p. 301–311, 1992. DOI: <https://doi.org/10.1083/jcb.119.2.301>.
- AMAN, Y. et al. Autophagy in healthy aging and disease. *Nature Aging*, v. 1, n. 8, p. 634-650, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1038/s43587-021-00098-4>.
- ANDERSON, C. M.; NEDERGAARD, M. Emerging challenges of assigning P2X7 receptor function and immunoreactivity in neurons. *Trends in Neurosciences*, v. 29, n. 5, p. 257-262, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tins.2006.03.003>.
- ANDREJEW, R. et al. The P2X7 Receptor: Central Hub of Brain Diseases. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, v. 13, jul., p. 1-27, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3389/fnmol.2020.00124>.
- ANGLADE, P. et al. Apoptosis and autophagy in nigral neurons of patients with Parkinson's disease. *Histology and Histopathology*, v. 12, n. 1, p. 25-31, 1997. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9046040>. Acesso em: 6 maio 2025.
- ANTONIO, L. S. et al. P2X4 receptors interact with both P2X2 and P2X7 receptors in the form of homotrimers. *British Journal of Pharmacology*, v. 163, n. 5, p. 1069-1077, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01303.x>.
- APOLLONI, S. et al. Novel P2X7 antagonist ameliorates the early phase of ALS disease and decreases inflammation and autophagy in SOD1-G93A mouse model. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 19, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms221910649>.

ARPD-ASSOCIATED, M.; PINK, P. Parkin function in Parkinson's disease. *Science*, v. 360, n. 6386, 2018.

ASHFORD, T. P.; PORTER, K. R. Cytoplasmic components in hepatic cell lysosomes. *The Journal of Cell Biology*, v. 12, n. 1, p. 198–202, 1962. DOI: <https://doi.org/10.1083/jcb.12.1.198>.

ATERE, T. G. et al. Proanthocyanidin from grape seed against rotenone-induced toxicity in *Drosophila melanogaster*: Insights from behavioural and antioxidant studies. *Notulae Scientiae Biologicae*, v. 17, n. 1, p. 12341, 2025. DOI: <https://doi.org/10.55779/nsb17112341>.

AURICH, M. F. et al. Olfactory impairment is related to REM sleep deprivation in rotenone model of Parkinson's disease. *Sleep Science*, v. 10, n. 1, p. 47-54, 2017. DOI: <https://doi.org/10.5935/1984-0063.20170008>.

AUSTIN, S. A. et al. α -Synuclein expression modulates microglial activation phenotype. *The Journal of Neuroscience*, v. 26, n. 41, p. 10558–10563, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1799-06.2006>.

BALESTRINO, R.; SCHAPIRA, A. H. V. Parkinson disease. *European Journal of Neurology*, [S.l.], v. 27, n. 1, p. 27-42, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1111/ene.14108>.

BALL, N. et al. Parkinson's disease and the environment. *Frontiers in Neurology*, [S.l.], v. 10, mar. 2019. DOI: <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.00218>.

BARBOSA, R. M. G. et al. New Perspectives of Deep Brain Stimulation Indications for Parkinson's Disease: A Critical Review. *Brain Sciences*, [S.l.], v. 14, n. 7, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/brainsci14070638>.

BARI, B. A.; CHOKSHI, V.; SCHMIDT, K. Locus coeruleus-norepinephrine: Basic functions and insights into Parkinson's disease. *Neural Regeneration Research*, [S.l.], v. 15, n. 6, p. 1006-1013, 2020. DOI: <https://doi.org/10.4103/1673-5374.270297>.

BARTLETT, R. et al. P2X7 antagonism using Brilliant Blue G reduces body weight loss and prolongs survival in female SOD1 G93A amyotrophic lateral sclerosis mice. *PeerJ*, [S.l.], v. 5, e3064, mar. 2017. DOI: <https://doi.org/10.7717/peerj.3064>.

BEN-SHLOMO, Y. et al. The epidemiology of Parkinson's disease. *The Lancet*, [S.l.], v. 403, n. 10423, p. 283-292, 2024. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(23\)01419-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(23)01419-8).

BERG, D. et al. Prodromal Parkinson disease subtypes — key to understanding heterogeneity. *Nature Reviews Neurology*, [S.l.], v. 17, n. 6, p. 349-361, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41582-021-00486-9>.

BERGMAN, H.; DEUSCHL, G. Pathophysiology of Parkinson's disease: From clinical neurology to basic neuroscience and back. *Movement Disorders*, [S.l.], v. 17, suppl. 3, p. S28-S40, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1002/mds.10140>.

BETARBET, R. *et al.* Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nature Neuroscience*, [S.l.], v. 3, n. 12, p. 1301-1306, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1038/81834>.

BETARBET, R. *et al.* Intersecting pathways to neurodegeneration in Parkinson's disease: Effects of the pesticide rotenone on DJ-1, α -synuclein, and the ubiquitin-proteasome system. *Neurobiology of Disease*, v. 22, n. 2, p. 404-420, 2006. DOI: t

BIANCHI, C. *et al.* P2X7 receptor inhibition ameliorates ubiquitin-proteasome system dysfunction associated with Alzheimer's disease. *Alzheimer's Research and Therapy*, v. 15, n. 1, p. 1-19, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13195-023-01258-x>.

BIASIZZO, M.; KOPITAR-JERALA, N. Interplay Between NLRP3 Inflammasome and Autophagy. *Frontiers in Immunology*, [S.l.], v. 11, out. 2020. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.591803>.

BIN DAYEL, A.; 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*, [S.l.], v. 96, n. 3, p. 355-363, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1124/mol.119.116715>.

BOGERS, J. S.; BLOEM, B. R.; DEN HEIJER, J. M. The Etiology of Parkinson's Disease: New Perspectives from Gene-Environment Interactions. *Journal of Parkinson's Disease*, [S.l.], v. 13, n. 8, p. 1281-1288, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3233/JPD-230250>.

BORGHAMMER, P.; VAN DEN BERGE, N. Brain-first versus gut-first Parkinson's disease: A hypothesis. *Journal of Parkinson's Disease*, [S.l.], v. 9, suppl. 2, p. S281-S295, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3233/JPD-191721>.

BOWEN, I. D. Electron cytochemical studies on autophagy in the gut epithelial cells of the locust, *Schistocerca gregaria*. *The Histochemical Journal*, [S.l.], v. 1, n. 2, p. 141-151, 1968. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF01002584>.

BRAAK, H. *et al.* Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiology of Aging*, [S.l.], v. 24, n. 2, p. 197-211, 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0197-4580\(02\)00065-9](https://doi.org/10.1016/S0197-4580(02)00065-9).

BRIDI, J. C.; HIRTH, F. Mechanisms of α -Synuclein Induced Synaptopathy in Parkinson's Disease. *Frontiers in Neuroscience*, [S.l.], v. 12, fev. 2018. DOI: <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00080>.

BROCKMANN, K. *et al.* Association between CSF alpha-synuclein seeding activity and genetic status in Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Acta Neuropathologica Communications*, [S.l.], v. 9, n. 1, p. 175, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40478-021-01276-6>.

BROWN, A. S.; GERSHON, S. Dopamine and depression. *Journal of Neural Transmission*, [S.l.], v. 10, n. 91, p. 75-109, 1993. DOI: <https://doi.org/10.1007/hup.470100510>.

BROWN, T. *et al.* Cognitive and cholinergic systems trajectories in Parkinson disease. *medRxiv*, [S.l.], 17 jul. 2024. DOI: <https://doi.org/10.1101/2024.07.17.24310588>.

BURNSTOCK, G. *et al.* Purinergic Signalling and the Nervous System. Berlin; Heidelberg: Springer, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-3-642-28863-0>.

BURNSTOCK, G. P2X ion channel receptors and inflammation. *Purinergic Signalling*, [S.l.], v. 12, n. 1, p. 59-67, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11302-015-9493-0>.

BURNSTOCK, G. Purine and purinergic receptors. *Brain and Neuroscience Advances*, [S.l.], v. 2, 239821281881749, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1177/2398212818817494>.

BURNSTOCK, G. Purinergic cotransmission. *Experimental Physiology*, [S.l.], v. 94, n. 1, p. 20-24, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2008.043620>.

BURNSTOCK, G. Purinergic signalling and disorders of the central nervous system. *Nature Reviews Drug Discovery*, [S.l.], v. 7, n. 7, p. 575-590, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrd2605>.

BURNSTOCK, G.; KENNEDY, C. P2X Receptors in Health and Disease. In: *Advances in Pharmacology*. [S.l.]: Elsevier Inc., 2011. v. 61. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385526-8.00011-4>.

BURNSTOCK, G.; VERKHRATSKY, A. Evolutionary origins of the purinergic signalling system. *Acta Physiologica*, [S.l.], v. 195, n. 4, p. 415-447, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2009.01957.x>.

BURRÉ, J. *et al.* α -Synuclein Promotes SNARE-Complex Assembly in Vivo and in Vitro. *Science*, [S.l.], v. 329, n. 5999, p. 1663-1667, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1195227>.

CALABRESI, P. *et al.* Alpha-synuclein in Parkinson's disease and other synucleinopathies: from overt neurodegeneration back to early synaptic dysfunction. *Cell Death & Disease*, [S.l.], v. 14, n. 3, p. 176, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41419-023-05672-9>.

CALABRESI, P. *et al.* Dopamine-mediated regulation of corticostriatal synaptic plasticity. *Trends in Neurosciences*, [S.l.], v. 30, n. 5, p. 211-219, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tins.2007.03.001>.

CALOVI, S.; MUT-ARBONA, P.; SPERLÁGH, B. Microglia and the Purinergic Signaling System. *Neuroscience*, [S.l.], v. 405, p. 137-147, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.12.021>.

CAMPAGNO, K. E.; MITCHELL, C. H. The P2X7 receptor in microglial cells modulates the endolysosomal axis, autophagy, and phagocytosis. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, [S.l.], v. 15, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3389/fncel.2021.645244>.

CANNON, J. R. *et al.* A highly reproducible rotenone model of Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease*, [S.l.], v. 34, n. 2, p. 279-290, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.01.016>.

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*, [S. l.], v. 81, p. 142–152, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.01.045>.

CASTILLO-RANGEL, C. et al. Neuroinflammation in Parkinson's Disease: from gene to clinic: a systematic review. *International Journal of Molecular Sciences*, [S. l.], v. 24, n. 6, p. 5792, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms24065792>.

CENCI, M. A.; BJÖRKLUND, A. Animal models for preclinical Parkinson's research: an update and critical appraisal. *Progress in Brain Research*, [S. l.], v. 252, p. 27–59, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/bs.pbr.2020.02.003>.

CERSOSIMO, M. G. et al. Weight loss in Parkinson's disease: the relationship with motor symptoms and disease progression. *BioMed Research International*, [S. l.], v. 2018, p. 1–6, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1155/2018/9642524>.

CHAKRABORTY, R. et al. Tunnelling nanotubes between neuronal and microglial cells allow bi-directional transfer of α -synuclein and mitochondria. *Cell Death & Disease*, [S. l.], v. 14, n. 5, p. 329, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41419-023-05835-8>.

CHASE, B. A.; MARKOPOULOU, K. Olfactory dysfunction in familial and sporadic Parkinson's disease. *Frontiers in Neurology*, [S. l.], v. 11, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.00447>.

CHEN, C. et al. Advanced brain aging in multiple system atrophy compared to Parkinson's disease. *NeuroImage: Clinical*, [S. l.], v. 34, p. 102997, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nicl.2022.102997>.

CHEN, F. et al. Global, regional, and national burden and attributable risk factors of transport injuries: Global Burden of Disease Study 1990–2019. *Chinese Medical Journal*, [S. l.], v. 136, n. 14, p. 1762–1764, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1097/CM9.0000000000002744>.

CHEN, X. et al. Brilliant Blue G improves cognition in an animal model of Alzheimer's disease and inhibits amyloid- β -induced loss of filopodia and dendrite spines in hippocampal neurons. *Neuroscience*, [S. l.], v. 279, p. 94–101, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.08.036>.

CHIARELI, R. A. et al. The role of astrocytes in the neurorepair process. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, [S. l.], v. 9, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.665795>.

CHOI, M. L. et al. Pathological structural conversion of α -synuclein at the mitochondria induces neuronal toxicity. *Nature Neuroscience*, [S. l.], v. 25, n. 9, p. 1134–1148, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41593-022-01140-3>.

CHOU, A. P.; LI, S.; FITZMAURICE, A. G.; BRONSTEIN, J. M. Mechanisms of rotenone-induced proteasome inhibition. *NeuroToxicology*, v. 31, n. 4, p. 367–372, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2010.04.006>.

CHOU, T.-W. et al. Fibrillar α -synuclein induces neurotoxic astrocyte activation via RIP kinase signaling and NF- κ B. *Cell Death & Disease*, [S. l.], v. 12, n. 8, p. 756, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41419-021-04049-0>.

CHU, Y. et al. Alterations in lysosomal and proteasomal markers in Parkinson's disease: relationship to alpha-synuclein inclusions. *Neurobiology of Disease*, [S. l.], v. 35, n. 3, p. 385–398, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.05.023>.

COLLO, G. et al. Tissue distribution of the P2X7 receptor. *Neuropharmacology*, [S. l.], v. 36, n. 9, p. 1277–1283, 1997. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0028-3908\(97\)00140-8](https://doi.org/10.1016/S0028-3908(97)00140-8).

CORWIN, C. et al. Prostaglandin D2/J2 signaling pathway in a rat model of neuroinflammation displaying progressive parkinsonian-like pathology: potential novel therapeutic targets. *Journal of Neuroinflammation*, [S. l.], v. 15, n. 1, p. 1–18, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1305-3>.

COSTA, H. N. et al. Parkinson's disease: a multisystem disorder. *Neuroscience Bulletin*, [S. l.], v. 39, n. 1, p. 113–124, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12264-022-00934-6>.

CRABBÉ, M. et al. Increased P2X7 receptor binding is associated with neuroinflammation in acute but not chronic rodent models for Parkinson's disease. *Frontiers in Neuroscience*, [S. l.], v. 13, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00799>.

CRAIGIE, E. et al. The relationship between P2X4 and P2X7: a physiologically important interaction? *Frontiers in Physiology*, [S. l.], v. 4, 2013. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00216>.

CUERVO, A. M. et al. Impaired degradation of mutant α -synuclein by chaperone-mediated autophagy. *Science*, [S. l.], v. 305, n. 5688, p. 1292–1295, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.11101738>.

CUERVO, A. M.; DICE, J. F. A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes. *Science*, [S. l.], v. 273, n. 5274, p. 501–503, 1996. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.273.5274.501>.

D'ARCY, M. S. Mitophagy in health and disease: molecular mechanisms, regulatory pathways, and therapeutic implications. *Apoptosis*, [S.l.], v. 29, n. 9, p. 1679–1695, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10495-024-01977-y>.

DARBINYAN, L. V. et al. Rotenone impairs hippocampal neuronal activity in a rat model of Parkinson's disease. *Pathophysiology*, [S.l.], v. 24, n. 1, p. 23–30, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pathophys.2017.01.001>.

DE MIRANDA, B. R. et al. Preventing Parkinson's Disease: an environmental agenda. *Journal of Parkinson's Disease*, [S.l.], v. 12, n. 1, p. 45–68, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3233/JPD-212922>.

DE SALIS, S. K. F. et al. Alternatively spliced isoforms of the P2X7 receptor: structure, function and disease associations. *International Journal of Molecular Sciences*, [S.l.], v. 23, n. 15, p. 1–22, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms23158174>.

DEAGLIO, S.; ROBSON, S. C. Ectonucleotidases as regulators of purinergic signaling in thrombosis, inflammation, and immunity. In: *Advances in Pharmacology*. 1. ed. [S.l.]: Elsevier Inc., 2011. v. 61. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385526-8.00010-2>.

DENG, H. *et al.* P2X7 receptor activation aggravates NADPH oxidase 2–induced oxidative stress after intracerebral hemorrhage. *Neural Regeneration Research*, [S.l.], v. 16, n. 8, p. 1582–1591, 2021. DOI: <https://doi.org/10.4103/1673-5374.303036>.

DENG, Q. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* triggers macrophage autophagy to escape intracellular killing by activation of the NLRP3 inflammasome. *Infection and Immunity*, [S.l.], v. 84, n. 1, p. 56–66, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1128/iai.00945-15>.

DEUSCHL, G. *et al.* The burden of neurological diseases in Europe: an analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet Public Health*, [S.l.], v. 5, n. 10, p. e551–e567, 2020. DOI: [https://doi.org/10.1016/S2468-2667\(20\)30190-0](https://doi.org/10.1016/S2468-2667(20)30190-0).

DEUSSING, J. M.; ARZT, E. P2X7 receptor: a potential therapeutic target for depression? *Trends in Molecular Medicine*, [S.l.], v. 24, n. 9, p. 736–747, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2018.07.005>.

DI VIRGILIO, F. *et al.* Structure, function and techniques of investigation of the P2X7 receptor (P2X7R) in mammalian cells. In: *Methods in Enzymology*. v. 629, p. 115–150, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2019.07.043>.

DI VIRGILIO, F. *et al.* The P2X7 receptor in infection and inflammation. *Immunity*, [S.l.], v. 47, n. 1, p. 15–31, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.06.020>.

DIAO, J. *et al.* Native α -synuclein induces clustering of synaptic-vesicle mimics via binding to phospholipids and synaptobrevin-2/VAMP2. *eLife*, [S.l.], v. 2, e00592, 2013. DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.00592>.

DILNASHIN, H. *et al.* TCE-mediated neuroprotection against rotenone-induced dopaminergic neuronal death in PD mice: insights into the Nrf-2/PINK1/Parkin-mitophagy pathway. *Metabolic Brain Disease*, [S.l.], v. 40, n. 4, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11011-025-01595-w>.

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*, [S.l.], v. 135, p. 104352, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2018.12.012>.

DONG-XIN, W. *et al.* [Título inválido]. *Toxicology Mechanisms and Methods*, [S.l.], v. 0, n. 0, p. 000, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1080/15376516.2020.1741053>.

DRORI, E.; BERMAN, S.; MEZER, A. A. Mapping microstructural gradients of the human striatum in normal aging and Parkinson's disease. *Science Advances*, [S.l.], v. 8, n. 28, p. 1–14, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1126/sciadv.abm1971>.

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*, [S.l.], v. 164, n. 4, p. 1357–1391, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01426.x>.

EBRAHIMI, M. N. et al. The distribution of neurotransmitters in the brain circuitry: Mesolimbic pathway and addiction. *Physiology & Behavior*, v. 284, p. 114639, jul. 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2024.114639>.

EL-SHAMARKA, M. E. S.; ABDEL-SALAM, O. M. E.; OMARA, E. A. Evaluation of mice treatment with aluminium chloride in rotenone model of Parkinson's disease. *Egyptian Journal of Chemistry*, v. 67, n. 9, p. 159–171, 2024. DOI: <https://doi.org/10.21608/EJCHEM.2024.248072.8856>.

EMAMZADEH, F. Alpha-synuclein structure, functions, and interactions. *Journal of Research in Medical Sciences*, v. 21, n. 1, p. 29, 2016. DOI: <https://doi.org/10.4103/1735-1995.181989>.

EMIN, D. et al. Small soluble α -synuclein aggregates are the toxic species in Parkinson's disease. *Nature Communications*, v. 13, n. 1, p. 1-15, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-022-33252-6>.

EREKAT, N. S. Autophagy and Its Association with Genetic Mutations in Parkinson Disease. *Medical Science Monitor*, v. 28, p. 1-12, 2022. DOI: <https://doi.org/10.12659/MSM.938519>.

ERLINGE, D. P2Y receptors in health and disease. In: *Advances in Pharmacology*. 1. ed. Amsterdam: Elsevier Inc., 2011. v. 61. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385526-8.00013-8>.

ESER, P. et al. The interplay between neuroinflammatory pathways and Parkinson's disease. *Experimental Neurology*, v. 372, nov. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2023.114644>.

FABBRIZIO, P. et al. P2X7 receptor activation modulates autophagy in SOD1-g93a mouse microglia. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, v. 11, ago. 2017. p. 1-12. DOI: <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00249>.

FAROMBI, E. O. et al. Neuroprotective role of kolaviron in striatal redo-inflammation associated with rotenone model of Parkinson's disease. *NeuroToxicology*, v. 73, p. 132-141, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2019.03.005>.

FELLNER, L. et al. Autophagy in α -synucleinopathies—an overstrained system. *Cells*, v. 10, n. 11, p. 1-18, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/cells10113143>.

FERRARI, D. et al. Purinergic modulation of interleukin-1 β release from microglial cells stimulated with bacterial endotoxin. *Journal of Experimental Medicine*, v. 185, n. 3, p. 579–582, 1997. DOI: <https://doi.org/10.1084/jem.185.3.579>.

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. DOI: <https://doi.org/10.3727/096368917X695227>.

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. DOI: <https://doi.org/10.1155/2016/7548498>.

FILOMENI, G. et al. Neuroprotection of kaempferol by autophagy in models of rotenone-mediated acute toxicity: Possible implications for Parkinson's disease. *Neurobiology of Aging*, v. 33, n. 4, p. 767-785, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2010.05.021>.

FISZER, U. et al. $\gamma\delta$ T cells are increased in patients with Parkinson's disease. *Journal of the Neurological Sciences*, v. 121, n. 1, p. 39-45, 1994. DOI: [https://doi.org/10.1016/0022-510X\(94\)90154-6](https://doi.org/10.1016/0022-510X(94)90154-6).

FONTELES, A. A. et al. ATP signaling controlling dyskinesia through P2X7 receptors. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, v. 13, ago. 2020. p. 1-11. DOI: <https://doi.org/10.3389/fnmol.2020.00111>.

FRANCESCHINI, A. et al. The P2X7 receptor directly interacts with the NLRP3 inflammasome scaffold protein. *FASEB Journal*, v. 29, n. 6, p. 2450-2461, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1096/fj.14-268714>.

FRAZER, M. et al. Dopamine agonist monotherapy utilization in patients with Parkinson's disease. *Clinical Parkinsonism & Related Disorders*, v. 8, nov. 2022. p. 100173, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.prdoa.2022.100173>.

FRIEDLE, S.; CURET, M.; WATTERS, J. Recent patents on novel P2X7 receptor antagonists and their potential for reducing central nervous system inflammation. *Recent Patents on CNS Drug Discovery*, v. 5, n. 1, p. 35-45, 2010. DOI: <https://doi.org/10.2174/157488910789753530>.

FULLARD, M. E.; MORLEY, J. F.; DUDA, J. E. Olfactory dysfunction as an early biomarker in Parkinson's disease. *Neuroscience Bulletin*, v. 33, n. 5, p. 515-525, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12264-017-0170-x>.

FUNAKOSHI, T. et al. Analyses of APG13 gene involved in autophagy in yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, v. 192, n. 2, p. 207-213, 1997. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(97\)00031-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(97)00031-0).

GALLOWAY, P. G.; BERGERON, C.; PERRY, G. The presence of tau distinguishes Lewy bodies of diffuse Lewy body disease from those of idiopathic Parkinson disease. *Neuroscience Letters*, v. 100, n. 1-3, p. 6-10, 1989. DOI: [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(89\)90651-4](https://doi.org/10.1016/0304-3940(89)90651-4).

GALVAN, A.; WICHMANN, T. Pathophysiology of Parkinsonism. *Clinical Neurophysiology*, v. 119, n. 7, p. 1459-1474, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.clinph.2008.03.017>.

GAO, X. F. et al. Astroglial P2X7 receptor current density increased following long-term exposure to rotenone. *Purinergic Signalling*, v. 7, n. 1, p. 65–72, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11302-011-9218-y>.

GASKILL, P. J.; KHOSHBOUEI, H. Dopamine and norepinephrine are embracing their immune side and so should we. *Current Opinion in Neurobiology*, v. 77, p. 102626, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.conb.2022.102626>.

GATTO, E. M. et al. Overexpression of neutrophil neuronal nitric oxide synthase in Parkinson's disease. *Nitric Oxide - Biology and Chemistry*, v. 4, n. 5, p. 534–539, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1006/niox.2000.0288>.

GEIBL, F. F. et al. α -Synuclein pathology disrupts mitochondrial function in dopaminergic and cholinergic neurons at-risk in Parkinson's disease. *bioRxiv*, p. 1–19, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1101/2023.12.11.571045>.

GERLACH, M. et al. A post mortem study on neurochemical markers of dopaminergic, GABA-ergic and glutamatergic neurons in basal ganglia-thalamocortical circuits in Parkinson syndrome. *Brain Research*, v. 741, n. 1–2, p. 142–152, 1996. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(96\)00915-8](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(96)00915-8).

GOODHEART, A. E.; BLACKSTONE, C. Getting to the heart of Lewy body disease. *Journal of Clinical Investigation*, v. 134, n. 1, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1172/JCI1175798>.

GOWER, W. R. *A manual of diseases of the nervous system*. 3. ed. Philadelphia: P. Blakiston's Son & Co., 1899. Disponível em: <http://resource.nlm.nih.gov/101509155>. Acesso em: 6 maio 2025.

GRAYBIEL, A. M. et al. The Basal Ganglia and Adaptive Motor Control. *Science*, v. 265, n. 5180, p. 1826–1831, 1994. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.8091209>.

GROTEMEYER, A. et al. Neuroinflammation in Parkinson's Disease – Putative Pathomechanisms and Targets for Disease-Modification. *Frontiers in Immunology*, v. 13, maio, p. 1–18, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.878771>.

GU, Y. et al. Olfactory dysfunction and its related molecular mechanisms in Parkinson's disease. *Neural Regeneration Research*, v. 19, n. 3, p. 583–590, 2024. DOI: <https://doi.org/10.4103/1673-5374.380875>.

GUO, C. et al. Evidence for functional P2X4/P2X7 heteromeric receptors. *Molecular Pharmacology*, v. 72, n. 6, p. 1447–1456, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1124/mol.107.035980>.

GUO, Y. et al. Genetic Analysis and Literature Review of SNCA Variants in Parkinson's Disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, v. 13, ago., p. 1–7, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3389/fnagi.2021.648151>.

HARA, T. et al. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature*, v. 441, n. 7095, p. 885–889, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature04724>.

HARTMANN, A. Postmortem studies in Parkinson's disease. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, v. 6, n. 3, p. 281–293, 2004. DOI: <https://doi.org/10.31887/dcms.2004.6.3/ahartmann>.

HATTORI, N.; MIZUNO, P. Y. Pathogenetic mechanisms of parkin in Parkinson's disease. *Lancet*, v. 364, n. 9435, p. 722–724, 2004. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)16901-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16901-8).

HEDYA, S. A.; SAFAR, M. M.; BAHGAT, A. K. Cilostazol mediated Nurr1 and autophagy enhancement: Neuroprotective activity in rat rotenone PD model. *Molecular Neurobiology*, v. 55, n. 9, p. 7579–7587, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12035-018-0923-1>.

HEGAB, D. et al. Behavioral Evaluation of rotenone model of Parkinson's disease in male Wistar rats. *Sohag Medical Journal*, v. 24, n. 2, p. 8–14, 2020. DOI: <https://doi.org/10.21608/smj.2020.21596.1089>.

HERSHKO, A.; CIECHANOVER, A.; ROSE, I. A. Resolution of the ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes: a component that interacts with ATP. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 76, n. 7, p. 3107–3110, 1979. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.76.7.3107>.

ILLES, P.; KHAN, T. M.; RUBINI, P. Neuronal P2X7 receptors revisited: Do they really exist? *Journal of Neuroscience*, v. 37, n. 30, p. 7049–7062, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3103-16.2017>.

IRWIN, J. A.; ERISIR, A.; KWON, I. Oral Triphenylmethane Food Dye Analog, Brilliant Blue G, Prevents Neuronal Loss in APPSwDI/NOS2-/- Mouse Model. *Current Alzheimer Research*, v. 13, n. 6, p. 663–677, 2016. DOI: <https://doi.org/10.2174/1567205013666160208142456>.

IVERSEN, S. D. The pharmacology of memory. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie*, v. 321, n. 2-3, p. 209–215, 1998. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0764-4469\(97\)89824-1](https://doi.org/10.1016/S0764-4469(97)89824-1).

JAMALI-RAEUFY, N. et al. The effects simultaneous inhibition of dipeptidyl peptidase-4 and P2X7 purinoceptors in an in vivo Parkinson's disease model. *Metabolic Brain Disease*, v. 35, n. 3, p. 539–548, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11011-020-00538-x>.

JANKS, L.; SHARMA, C. V. R.; EGAN, T. M. A central role for P2X7 receptors in human microglia. *Journal of Neuroinflammation*, v. 15, n. 1, p. 325, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1353-8>.

JAY, T. M. Dopamine: A potential substrate for synaptic plasticity and memory mechanisms. *Progress in Neurobiology*, v. 69, n. 6, p. 375–390, 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(03\)00085-6](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(03)00085-6).

JIANG, L.-H. et al. Brilliant Blue G selectively blocks ATP-gated rat P2X7 receptors. *Molecular Pharmacology*, v. 58, n. 1, p. 82–88, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1124/mol.58.1.82>.

JIANG, T. et al. P2X7 receptor is critical in α -synuclein-mediated microglial NADPH oxidase activation. *Neurobiology of Aging*, v. 36, n. 7, p. 2304-2318, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2015.03.015>.

JO, S.; BEAN, B. P. Inhibition of neuronal voltage-gated sodium channels by Brilliant blue G. *Molecular Pharmacology*, v. 80, n. 2, p. 247-257, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1124/mol.110.070276>.

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, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2014.12.002>.

JOHNSON, M. E.; STRINGER, A.; BOBROVSKAYA, L. Rotenone induces gastrointestinal pathology and microbiota alterations in a rat model of Parkinson's disease. *NeuroToxicology*, v. 65, p. 174-185, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2018.02.013>.

JOHNSON, M. E.; ZHOU, X. F.; BOBROVSKAYA, L. The effects of rotenone on TH, BDNF and BDNF-related proteins in the brain and periphery: Relevance to early Parkinson's disease. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, v. 97, p. 23-32, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2019.01.010>.

KABEYA, Y. et al. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *The EMBO Journal*, v. 19, n. 21, p. 5720-5728, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1093/emboj/19.21.5720>.

KAM, T.-I. et al. Microglia and astrocyte dysfunction in Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease*, v. 144, jul. 2020. Art. 105028. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2020.105028>.

KAMADA, Y. et al. Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. *Journal of Cell Biology*, v. 150, n. 6, p. 1507-1513, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1083/jcb.150.6.1507>.

KAMETAKA, S. et al. Apg14p and Apg6/Vps30p form a protein complex essential for autophagy in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, v. 273, n. 35, p. 22284-22291, 1998. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.273.35.22284>.

KANDEL, E. R. et al. Núcleos da base. In: MACK, S. (Ed.). *Princípios de Neurociências*. 5. ed. Nova York: AMGH, 2014. p. 852-860.

KATUNINA, E. A. et al. Searching for Biomarkers in the Blood of Patients at Risk of Developing Parkinson's Disease at the Prodromal Stage. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 24, n. 3, p. 1842, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms24031842>.

KELLEY, N. et al. The NLRP3 Inflammasome: An Overview of Mechanisms of Activation and Regulation. *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. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1616515114>.

KENNEDY, C. ATP as a cotransmitter in sympathetic and parasympathetic nerves - another Burnstock legacy. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, v. 235, abr. 2021. Art. 102860. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2021.102860>.

KENNEDY, C. The P2Y/P2X divide: How it began. *Biochemical Pharmacology*, v. 187, jan. 2021. Art. 114408. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2021.114408>.

KHANI, M. et al. Towards a Global View of Parkinson's Disease Genetics. *Annals of Neurology*, v. 95, n. 5, p. 831-842, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1002/ana.26905>.

KHATRI, D. K.; JUVEKAR, A. R. Neuroprotective effect of curcumin as evinced by abrogation of rotenone-induced motor deficits, oxidative and mitochondrial dysfunctions in mouse model of Parkinson's disease. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 150-151, p. 39-47, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2016.09.002>.

KIM, S. et al. Role of Astrocytes in Parkinson's Disease Associated with Genetic Mutations and Neurotoxicants. *Cells*, v. 12, n. 4, p. 622, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/cells12040622>.

KINNART, I. et al. Elevated α -synuclein levels inhibit mitophagic flux. *npj Parkinson's Disease*, v. 10, n. 1, p. 1-15, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41531-024-00696-0>.

KLIONSKY, D. J. et al. Autophagy in major human diseases. *The EMBO Journal*, v. 40, n. 19, p. 1-64, 2021. DOI: <https://doi.org/10.15252/emboj.2021108863>.

KNOTT, C.; WILKIN, G. P.; STERN, G. Astrocytes and microglia in the substantia nigra and caudate-putamen in Parkinson's disease. *Parkinsonism and Related Disorders*, v. 5, n. 3, p. 115-122, 1999. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1353-8020\(99\)00022-X](https://doi.org/10.1016/S1353-8020(99)00022-X).

KOEGLSPERGER, T. et al. Neuropathology of incidental Lewy body & prodromal Parkinson's disease. *Molecular Neurodegeneration*, v. 18, n. 1, p. 1-18, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13024-023-00622-7>.

KOMATSU, M. et al. Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. *Cell*, v. 131, n. 6, p. 1149-1163, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.10.035>.

KOMIYA, Y. et al. Outer retinal microstructure and visual function after macular hole surgery with and without Brilliant Blue G. *Japanese Journal of Ophthalmology*, v. 66, n. 6, p. 534-540, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10384-022-00942-z>.

KOTSYUBA, E.; DYACHUK, V. Effects of chronic exposure to low doses of rotenone on dopaminergic and cholinergic neurons in the CNS of *Hemigrapsus sanguineus*. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 25, n. 13, Art. 7159, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms25137159>.

KRAWCZUK, D. et al. The Role of α -Synuclein in Etiology of Neurodegenerative Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 25, n. 17, Art. 9197, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms25179197>.

KURKOWSKA-JASTRZĘBSKA, I. et al. MHC class II positive microglia and lymphocytic infiltration are present in the substantia nigra and striatum in mouse model of Parkinson's disease. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, v. 59, n. 1, p. 1–8, 1999. DOI: <https://doi.org/10.55782/ane-1999-1289>.

LA VITOLA, P. et al. Mitochondrial oxidant stress promotes α -synuclein aggregation and spreading in mice with mutated glucocerebrosidase. *npj Parkinson's Disease*, v. 10, n. 1, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41531-024-00842-8>. Acesso em: 6 maio 2025.

LAL, R. et al. Experimental models of Parkinson's disease: Challenges and Opportunities. *European Journal of Pharmacology*, v. 980, p. 176819, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2024.176819>. Acesso em: 6 maio 2025.

LAUX, G. Parkinson and depression: review and outlook. *Journal of Neural Transmission*, v. 129, n. 5-6, p. 601-608, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00702-021-02456-3>. Acesso em: 6 maio 2025.

LAWANA, V.; CANNON, J. R. Rotenone neurotoxicity: Relevance to Parkinson's disease. In: *Advances in Neurotoxicology*. 1. ed. [S.l.]: Elsevier Inc., 2020. v. 4, p. 209-254. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/bs.ant.2019.11.004>. Acesso em: 6 maio 2025.

LÁZARO, D. F. et al. Systematic Comparison of the Effects of Alpha-synuclein Mutations on Its Oligomerization and Aggregation. *PLoS Genetics*, v. 10, n. 11, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004741>. Acesso em: 6 maio 2025.

LAZAROWSKI, E. R. et al. Molecular Mechanisms of Purine and Pyrimidine Nucleotide Release. In: *Advances in Pharmacology*. 1. ed. [S.l.]: Elsevier Inc., 2011. v. 61, p. 221-261. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385526-8.00008-4>. Acesso em: 6 maio 2025.

LE GUERROUÉ, F.; YOULE, R. J. Ubiquitin signaling in neurodegenerative diseases: an autophagy and proteasome perspective. *Cell Death & Differentiation*, v. 28, n. 2, p. 439-454, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41418-020-00667-x>. Acesso em: 6 maio 2025.

LEE, J. Y. et al. Dopamine facilitates associative memory encoding in the entorhinal cortex. *Nature*, v. 598, n. 7880, p. 321-326, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03948-8>. Acesso em: 6 maio 2025.

LEITE-AGUIAR, R. et al. Techniques for evaluating the ATP-gated ion channel P2X7 receptor function in macrophages and microglial cells. *Journal of Immunological Methods*, v. 532, 113727, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jim.2024.113727>. Acesso em: 6 maio 2025.

LI, B.; DETTMER, U. Interactions of alpha-synuclein with membranes in Parkinson's disease: Mechanisms and therapeutic strategies. *Neurobiology of Disease*, v. 201, 106646, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2024.106646>. Acesso em: 6 maio 2025.

LI, M. et al. Production, characterization, and application of a monoclonal antibody specific for the extracellular domain of human P2X7R. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 104, n. 5, p. 2017-2028, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10340-0>. Acesso em: 6 maio 2025.

LIGGINS, J. T. P. The roles of dopamine D1 and D2 receptors in working memory function. *McGill Science Undergraduate Research Journal*, v. 4, n. 1, p. 39-45, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/0269881103017001688>. Acesso em: 6 maio 2025.

LIM, S.-Y.; KLEIN, C. Parkinson's Disease is Predominantly a Genetic Disease. *Journal of Parkinson's Disease*, v. 14, n. 3, p. 467-482, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3233/JPD-230376>. Acesso em: 6 maio 2025.

LIU, H. et al. Association of P2X7 receptor gene polymorphisms with sporadic Parkinson's disease in a Han Chinese population. *Neuroscience Letters*, v. 546, p. 42-45, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2013.04.049>. Acesso em: 6 maio 2025.

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. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.07.058>. Acesso em: 6 maio 2025.

LIZAMA, B. N.; CHU, C. T. Neuronal autophagy and mitophagy in Parkinson's disease. *Molecular Aspects of Medicine*, v. 82, p. 100972, maio 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mam.2021.100972>.

LU, G. et al. Autophagy in health and disease: From molecular mechanisms to therapeutic target. *MedComm*, v. 3, n. 3, p. 1-52, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1002/mco2.150>.

MA, M. et al. Effects of brilliant blue G on serum tumor necrosis factor- α levels and depression-like behavior in mice after lipopolysaccharide administration. *Clinical Psychopharmacology and Neuroscience*, v. 12, n. 1, p. 31-36, 2014. DOI: <https://doi.org/10.9758/cpn.2014.12.1.31>.

MADER, B. J. et al. Rotenone inhibits autophagic flux prior to inducing cell death. *ACS Chemical Neuroscience*, v. 3, n. 12, p. 1063-1072, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1021/cn300145z>.

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. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11011-018-0352-x>.

MAGISTRELLI, L.; CONTALDI, E.; COMI, C. The impact of snca variations and its product alpha-synuclein on non-motor features of Parkinson's disease. *Life*, v. 11, n. 8, p. 1-14, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/life11080804>.

MAHLKNECHT, P. et al. Prodromal Parkinson's disease: hype or hope for disease-modification trials? *Translational Neurodegeneration*, v. 11, n. 1, p. 1-13, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40035-022-00286-1>.

MAK, S. K. et al. Lysosomal degradation of α -synuclein in vivo. *Journal of Biological Chemistry*, v. 285, n. 18, p. 13621–13629, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.074617>.

MARTÍNEZ-CUESTA, M. Á. et al. Structural and Functional Basis for Understanding the Biological Significance of P2X7 Receptor. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 22, p. 8454, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms21228454>.

MASTENBROEK, S. E. et al. Disease progression modelling reveals heterogeneity in trajectories of Lewy-type α -synuclein pathology. *Nature Communications*, v. 15, n. 1, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-024-49402-x>.

MCGEER, P. L. et al. Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology*, v. 38, n. 8, p. 1285, 1988. DOI: <https://doi.org/10.1212/WNL.38.8.1285>.

MERCADO, G. et al. Infections in the Etiology of Parkinson's Disease and Synucleinopathies: A Renewed Perspective, Mechanistic Insights, and Therapeutic Implications. *Journal of Parkinson's Disease*, v. 14, n. 7, p. 1301-1329, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3233/JPD-240195>.

MINCHEV, D.; KAZAKOVA, M.; SARAFIAN, V. Neuroinflammation and Autophagy in Parkinson's Disease—Novel Perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 23, n. 23, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms232314997>.

MIYAZAKI, I.; ASANUMA, M. The Rotenone Models Reproducing Central and Peripheral Features of Parkinson's Disease. *NeuroSci*, v. 1, n. 1, p. 1-14, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/neurosci1010001>.

MIZUSHIMA, N. et al. A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature*, v. 395, n. 6700, p. 395–398, 1998. DOI: <https://doi.org/10.1038/26506>.

MIZUSHIMA, N. et al. Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells. *Journal of Cell Biology*, v. 152, n. 4, p. 657–667, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1083/jcb.152.4.657>.

MOGI, M. et al. Interleukin (IL)-1 β , IL-2, IL-4, IL-6 and transforming growth factor- α levels are elevated in ventricular cerebrospinal fluid in juvenile parkinsonism and Parkinson's disease. *Neuroscience Letters*, v. 211, n. 1, p. 13–16, 1996. DOI: [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(96\)12706-3](https://doi.org/10.1016/0304-3940(96)12706-3).

MOGI, M. et al. Transforming growth factor- β 1 levels are elevated in the striatum and in ventricular cerebrospinal fluid in Parkinson's disease. *Neuroscience Letters*, v. 193, n. 2, p. 129–132, 1995. DOI: [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(95\)11686-Q](https://doi.org/10.1016/0304-3940(95)11686-Q).

MOGI, M. et al. Tumor necrosis factor- α (TNF- α) increases both in the brain and in the cerebrospinal fluid from parkinsonian patients. *Neuroscience Letters*, v. 165, n. 1–2, p. 208–210, 1994. DOI: [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(94\)90746-3](https://doi.org/10.1016/0304-3940(94)90746-3).

MOU, Y. et al. P2X7 receptor of olfactory bulb microglia plays a pathogenic role in stress-related depression in mice with allergic rhinitis. *Neurobiology of Disease*, v. 192, p. 106432, nov. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2024.106432>.

MURAKAMI, T. et al. PINK1, a gene product of PARK6, accumulates in α -synucleinopathy brains. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, v. 78, n. 6, p. 653–654, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1136/jnnp.2006.100123>.

NAKANO, I.; HIRANO, A. Parkinson's disease: Neuron loss in the nucleus basalis without concomitant Alzheimer's disease. *Annals of Neurology*, v. 15, n. 5, p. 415–418, 1984. DOI: <https://doi.org/10.1002/ana.410150503>.

NARENDRA, D.; TANAKA, A.; SUEN, D. F.; YOULE, R. J. Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *Journal of Cell Biology*, v. 183, n. 5, p. 795–803, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1083/jcb.200809125>.

NASCIMENTO, T. D. S. et al. The Rotenone-induced sporadic Parkinsonism model: Timeline of motor and non-motor features. *European Journal of Neuroscience*, v. 61, n. 3, p. 1-13, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1111/ejn.16669>.

NASCIMENTO, T. de S. et al. The Rotenone-Induced Sporadic Parkinsonism Model: Timeline of Motor and Non-Motor Features. *European Journal of Neuroscience*, v. 61, n. 3, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1111/ejn.16669>.

NECHUSHTAI, L.; FRENKEL, D.; PINKAS-KRAMARSKI, R. Autophagy in Parkinson's Disease. *Biomolecules*, v. 13, n. 10, p. 1435, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/biom13101435>.

NIE, S. et al. 7,8-Dihydroxyflavone protects nigrostriatal dopaminergic neurons from rotenone-induced neurotoxicity in rodents. *Parkinson's Disease*, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1155/2019/9193534>.

NIKOLENKO, V. N. et al. Locus Coeruleus-Norepinephrine System: Spheres of Influence and Contribution to the Development of Neurodegenerative Diseases. *Frontiers in Bioscience - Landmark*, v. 29, n. 3, p. 1-10, 2024. DOI: <https://doi.org/10.31083/j.fb12903118>.

NODA, S. et al. Enhanced alpha-synuclein pathology and exacerbated motor dysfunction in alpha-synuclein transgenic mice with autophagy deficiency. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 758, p. 151514, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2025.151514>.

NODA, T.; OHSUMI, Y. Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast. *Journal of Biological Chemistry*, v. 273, n. 7, p. 3963–3966, 1998. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.273.7.3963>.

NORDENG, K.; MORLAND, C. From synaptic physiology to synaptic pathology: The enigma of α -synuclein. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 25, n. 2, p. 1-14, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms25020986>.

OBER, 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. DOI: <https://doi.org/10.1002/mds.27115>.

OEHRN, C. R. et al. Chronic adaptive deep brain stimulation versus conventional stimulation in Parkinson's disease: a blinded randomized feasibility trial. *Nature Medicine*, v. 30, n. 11, p. 3345-3356, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41591-024-03196-z>.

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, p. 1-13, nov. 2019. DOI: <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00476>.

OU, Z. et al. Global trends in the incidence, prevalence, and years lived with disability of Parkinson's disease in 204 countries/territories from 1990 to 2019. *Frontiers in Public Health*, v. 9, p. 776847, dez. 2021. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpubh.2021.776847>.

PADOVAN-NETO, F. E. et al. Nitric oxide synthase inhibition attenuates L-DOPA-induced dyskinesias in a rodent model of Parkinson's disease. *Neuroscience*, v. 159, n. 3, p. 927-935, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.01.034>.

PAN, T. et al. Rapamycin protects against rotenone-induced apoptosis through autophagy induction. *Neuroscience*, v. 164, n. 2, p. 541-551, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.08.014>.

PANICKER, N. et al. Neuronal NLRP3 is a parkin substrate that drives neurodegeneration in Parkinson's disease. *Neuron*, v. 110, n. 15, p. 2422-2437.e9, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2022.05.009>.

PAPP, M.; WILLNER, P.; MUSCAT, R. An animal model of anhedonia: attenuation of sucrose consumption and place preference conditioning by chronic unpredictable mild stress. *Psychopharmacology*, v. 104, n. 2, p. 255-259, 1991. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF02244188>.

PARK, H. et al. α -Synuclein pathology as a target in neurodegenerative diseases. *Nature Reviews Neurology*, v. 21, p. 32-47, jan. 2024. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41582-024-01043-w>.

PARK, S. Y.; KOH, H. C. FUNDC1 regulates receptor-mediated mitophagy independently of the PINK1/Parkin-dependent pathway in rotenone-treated SH-SY5Y cells. *Food and Chemical Toxicology*, v. 137, p. 111163, jan. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111163>.

PECHEVIS, M. et al. Effects of dyskinesias in Parkinson's disease on quality of life and health-related costs: a prospective European study. *European Journal of Neurology*, v. 12, n. 12, p. 956-963, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1468-1331.2005.01096.x>.

PEDERSEN, C. C. et al. A systematic review of associations between common SNCA variants and clinical heterogeneity in Parkinson's disease. *npj Parkinson's Disease*, v. 7, n. 1, p. 54, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41531-021-00196-5>.

PEGORARO, A. et al. P2X7 variants in pathophysiology. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 25, n. 12, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms25126673>.

PENG, K. et al. Mutual antagonism of PINK1/Parkin and PGC-1 α contributes to maintenance of mitochondrial homeostasis in rotenone-induced neurotoxicity. *Neurotoxicity Research*, v. 35, n. 2, p. 331–343, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12640-018-9957-4>.

PEREZ, R. G. et al. Erratum: “A role for α -synuclein in the regulation of dopamine biosynthesis.” *Journal of Neuroscience*, v. 22, n. 20, p. 9142, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1523/jneurosci.22-20-09142.2002>.

PERRY, E. K. et al. Cholinergic correlates of cognitive impairment in Parkinson’s disease: Comparisons with Alzheimer’s disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, v. 48, n. 5, p. 413–421, 1985. DOI: <https://doi.org/10.1136/jnnp.48.5.413>.

PETZOLD, G. C.; HAGIWARA, A.; MURTHY, V. N. Serotonergic modulation of odor input to the mammalian olfactory bulb. *Nature Neuroscience*, v. 12, n. 6, p. 784–791, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1038/nn.2335>.

PHAN, J.-A. et al. Early synaptic dysfunction induced by α -synuclein in a rat model of Parkinson’s disease. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, p. 6363, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06724-9>.

POTHION, S. et al. Strain differences in sucrose preference and in the consequences of unpredictable chronic mild stress. *Behavioural Brain Research*, v. 155, n. 1, p. 135–146, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2004.04.008>.

QIAN, M.; FANG, X.; WANG, X. Autophagy and inflammation. *Clinical and Translational Medicine*, v. 6, n. 1, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40169-017-0154-5>.

RAJAMANI, N. et al. Deep brain stimulation of symptom-specific networks in Parkinson’s disease. *Nature Communications*, [S. l.], v. 15, n. 1, p. 4662, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-024-48731-1>.

RAMALINGAM, M. et al. Rotenone and Its Derivative, Rotenoin A, Induce Neurodegeneration Differentially in SH-SY5Y Cells. *Biomedicines*, v. 12, n. 8, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/biomedicines12081703>.

RAPPE, A.; McWILLIAMS, T. G. Mitophagy in the aging nervous system. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, [S. l.], v. 10, p. 1–14, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.978142>.

REALE, M. et al. Peripheral cytokines profile in Parkinson’s disease. *Brain, Behavior, and Immunity*, [S. l.], v. 23, n. 1, p. 55–63, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2008.07.003>.

RECOURT, K. et al. Characterisation of the pharmacodynamic effects of the P2X7 receptor antagonist JNJ-54175446 using an oral dexamphetamine challenge model in healthy males in a randomised, double-blind, placebo-controlled, multiple ascending dose trial. *Journal of Psychopharmacology*, [S. l.], v. 34, n. 9, p. 1030–1042, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1177/0269881120914206>.

RECOURT, K. et al. Characterization of the central nervous system penetrant and selective purine P2X7 receptor antagonist JNJ-54175446 in patients with major depressive disorder. *Translational Psychiatry*, [S. l.], v. 13, n. 1, p. 266, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41398-023-02557-5>.

REES, R. N.; NOYCE, A. J.; SCHRAG, A. E. Identification of Prodromal Parkinson Disease. *Neurology*, [S. l.], v. 102, n. 11, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000209394>.

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*, [S. l.], v. 12, n. 7, p. 1262-1272, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.1c00095>.

REN, C. et al. P2X7 receptor of microglia in olfactory bulb mediates the pathogenesis of olfactory dysfunction in a mouse model of allergic rhinitis. *The FASEB Journal*, [S. l.], v. 37, n. 6, p. 1-14, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1096/fj.202300160RR>.

RIBEIRO, D. E. et al. P2X7 receptor signaling in stress and depression. *International Journal of Molecular Sciences*, [S. l.], v. 20, n. 11, p. 1-26, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms20112778>.

RIGATO, C. et al. Microglia proliferation is controlled by P2X7 receptors in a pannexin-1-independent manner during early embryonic spinal cord invasion. *Journal of Neuroscience*, [S. l.], v. 32, n. 34, p. 11559–11573, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1042-12.2012>.

ROCHA, E. et al. Aging, Parkinson's Disease, and Models: What Are the Challenges? *Aging Biol.*, [S. l.], 2024. DOI: <https://doi.org/10.59368/agingbio.20230010.Aging>.

ROCHA, S. M. et al. Rotenone induces regionally distinct α -synuclein protein aggregation and activation of glia prior to loss of dopaminergic neurons in C57Bl/6 mice. *Neurobiology of Disease*, [S. l.], v. 167, p. 105685, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2022.105685>.

RODRIGUES, R. J.; TOMÉ, A. R.; CUNHA, R. A. ATP as a multi-target danger signal in the brain. *Frontiers in Neuroscience*, [S. l.], v. 9, p. 1-11, 2015. DOI: <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00148>.

ROGERS, J. D.; BROGAN, D.; MIRRA, S. S. The nucleus basalis of Meynert in neurological disease: A quantitative morphological study. *Annals of Neurology*, [S. l.], v. 17, n. 2, p. 163–170, 1985. DOI: <https://doi.org/10.1002/ana.410170210>.

ROSENBERG, P. A.; AIZENMAN, E. Hundred-fold increase in neuronal vulnerability to glutamate toxicity in astrocyte-poor cultures of rat cerebral cortex. *Neuroscience Letters*, [S. l.], v. 103, n. 2, p. 162–168, 1989. DOI: [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(89\)90569-7](https://doi.org/10.1016/0304-3940(89)90569-7).

SANDERS, L. H.; GREENAMYRE, J. T. Oxidative damage to macromolecules in human Parkinson disease and the rotenone model. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 62, p. 111-120, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.01.003>.

SANT'ANNA, R. et al. Alpha-synuclein oligomers activate NFAT proteins modulating synaptic homeostasis and apoptosis. *bioRxiv*, 22 fev. 2023. <https://doi.org/10.1101/2023.02.21.529374>.

SARAMOWICZ, K. et al. Alpha-Synuclein Contribution to Neuronal and Glial Damage in Parkinson's Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 25, n. 1, 2024. <https://doi.org/10.3390/ijms25010360>.

SARKAR, D. et al. Paper Spray Ionization Ion Mobility Mass Spectrometry of Sebum Classifies Biomarker Classes for the Diagnosis of Parkinson's Disease. *JACS Au*, v. 2, n. 9, p. 2013-2022, 2022. <https://doi.org/10.1021/jacsau.2c00300>.

SARTER, M.; BODEWITZ, G.; STEPHENS, D. N. Attenuation of scopolamine-induced impairment of spontaneous alternation behaviour by antagonist but not inverse agonist and agonist β -carbolines. *Psychopharmacology*, v. 94, n. 4, p. 491-495, 1988. <https://doi.org/10.1007/BF00212843>.

SCHEIBLICH, H. et al. Microglia jointly degrade fibrillar alpha-synuclein cargo by distribution through tunneling nanotubes. *Cell*, v. 184, n. 20, p. 5089–5106.e21, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.09.007>.

SCHLOSSMACHER, M. G. et al. Parkin localizes to the Lewy bodies of Parkinson disease and dementia with Lewy bodies. *American Journal of Pathology*, v. 160, n. 5, p. 1655–1667, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)61113-3](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)61113-3).

SCHNEIDER, M. et al. Interaction of purinergic P2X4 and P2X7 receptor subunits. *Frontiers in Pharmacology*, v. 8, nov., p. 1-14, 2017. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00860>.

SEKAR, P. et al. AMPK-dependent and independent actions of P2X7 in regulation of mitochondrial and lysosomal functions in microglia. *Cell Communication and Signaling*, v. 16, n. 1, p. 1–15, 2018. <https://doi.org/10.1186/s12964-018-0293-3>.

SEPPI, K. et al. Update on treatments for nonmotor symptoms of Parkinson's disease—an evidence-based medicine review. *Movement Disorders*, v. 34, n. 2, p. 180-198, 2019. <https://doi.org/10.1002/mds.27602>.

SHARMA, M.; BURRÉ, J. α -Synuclein in synaptic function and dysfunction. *Trends in Neurosciences*, v. 46, n. 2, p. 153-166, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2022.11.007>.

SHARRAD, D. F.; GAI, W. P.; BROOKES, S. J. H. Selective coexpression of synaptic proteins, α -synuclein, cysteine string protein- α , synaptophysin, synaptotagmin-1, and synaptobrevin-2 in vesicular acetylcholine transporter-immunoreactive axons in the guinea pig ileum. *Journal of Comparative Neurology*, v. 521, n. 11, p. 2523–2537, 2013. <https://doi.org/10.1002/cne.23296>.

SHRESTHA, S. et al. Pesticide use and incident Parkinson's disease in a cohort of farmers and their spouses. *Environmental Research*, v. 191, jun., 110186, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.110186>.

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. <https://doi.org/10.1016/j.cger.2019.08.002>.

SIMUNI, T. et al. A biological definition of neuronal α -synuclein disease: towards an integrated staging system for research. *The Lancet Neurology*, v. 23, n. 2, p. 178-190, 2024. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(23\)00405-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(23)00405-2).

SLUYTER, R. The P2X7 Receptor. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*. v. 1051, p. 17-53, 2017. https://doi.org/10.1007/5584_2017_59.

SOLINI, A. et al. P2X7 receptor/NLRP3 inflammasome complex and α -synuclein/parkin balance in neo-diagnosed, treatment-naïve Parkinson disease: a prospective study. *Research Square*, 1 jul. 2020. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-38800/v1>.

SONG, L. et al. Parkinson's disease constipation effect of electroacupuncture at ST25 through colonic motility and enteric neuropathology. *Frontiers in Neurology*, v. 13, 2023. <https://doi.org/10.3389/fneur.2022.1092127>.

SOTZNY, F. et al. TCF11/Nrf1-Mediated induction of proteasome expression prevents cytotoxicity by rotenone. *Antioxidants and Redox Signaling*, v. 25, n. 16, p. 870-885, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1089/ars.2015.6539>.

SPERLÁGH, B.; ILLES, P. P2X7 receptor: An emerging target in central nervous system diseases. *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 35, n. 10, p. 537-547, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2014.08.002>.

SPERLÁGH, B.; ILLES, P. Purinergic modulation of microglial cell activation. *Purinergic Signalling*, v. 3, n. 1-2, p. 117-127, 2007. <https://doi.org/10.1007/s11302-006-9043-x>.

SPERLÁGH, B.; VIZI, S. E. Neuronal synthesis, storage and release of ATP. *Seminars in Neuroscience*, v. 8, n. 4, p. 175-186, 1996. <https://doi.org/10.1006/smns.1996.0023>.

STOCCHI, F. et al. Parkinson disease therapy: current strategies and future research priorities. *Nature Reviews Neurology*, v. 20, dez., p. 695-707, 2024. <https://doi.org/10.1038/s41582-024-01034-x>.

STOCCHI, F.; TAGLIATI, M.; OLANOW, C. W. Treatment of levodopa-induced motor complications. *Movement Disorders*, v. 23, supl. 3, p. S599-S612, 2008. <https://doi.org/10.1002/mds.22052>.

SUN, J. et al. Functional cooperation of α -synuclein and VAMP2 in synaptic vesicle recycling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 166, n. 23, p. 11113-11115, 2019. <https://doi.org/10.1073/pnas.1903049116>.

SZPAKOWSKI, P. et al. Human primary astrocytes differently respond to pro- and anti-inflammatory stimuli. *Biomedicines*, v. 10, n. 8, 2022. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10081769>.

- TAKEDA, A. et al. Olfactory dysfunction and dementia in Parkinson's disease. *Journal of Parkinson's Disease*, v. 4, n. 2, p. 181-187, 2014. DOI: <https://doi.org/10.3233/JPD-130277>.
- TAKENOUCHI, T. et al. The activation of P2X7 receptor impairs lysosomal functions and stimulates the release of autophagolysosomes in microglial cells. *The Journal of Immunology*, v. 182, n. 4, p. 2051-2062, 2009. DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0802577>.
- TAN, Y.-Y.; JENNER, P.; CHEN, S.-D. Monoamine oxidase-B inhibitors for the treatment of Parkinson's disease: past, present, and future. *Journal of Parkinson's Disease*, v. 12, n. 2, p. 477-493, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3233/JPD-212976>.
- TANAKA, G. et al. Biochemical and morphological classification of disease-associated alpha-synuclein mutants aggregates. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 508, n. 3, p. 729-734, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.11.200>.
- TELAROVIC, S. Epidemiology of Parkinson's disease. *Archives of Psychiatry Research*, v. 59, n. 1, p. 147-148, 2023. DOI: <https://doi.org/10.20471/may.2023.59.01.24>.
- THEIS, H. et al. Imaging biomarkers in prodromal and earliest phases of Parkinson's disease. *Journal of Parkinson's Disease*, p. 1-13, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3233/JPD-230385>.
- THEMISTOKLEOUS, C. et al. Role of autophagy pathway in Parkinson's disease and related genetic neurological disorders. *Journal of Molecular Biology*, v. 435, n. 12, p. 168144, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2023.168144>.
- TIMMERS, M. et al. Clinical pharmacokinetics, pharmacodynamics, safety, and tolerability of JNJ-54175446, a brain permeable P2X7 antagonist, in a randomised single-ascending dose study in healthy participants. *Journal of Psychopharmacology*, v. 32, n. 12, p. 1341-1350, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1177/0269881118800067>.
- TOULORGE, D.; SCHAPIRA, A. H. V.; HAJJ, R. Molecular changes in the postmortem parkinsonian brain. *Journal of Neurochemistry*, v. 139, suppl. 1, p. 27-58, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1111/jnc.13696>.
- TRINCA, B. F. R. et al. Descrição do perfil epidemiológico por doença de Parkinson entre 2021 e 2023. *Brazilian Journal of Implantology and Health Sciences*, v. 6, n. 9, p. 321-332, 2024. DOI: <https://doi.org/10.36557/2674-8169.2024v6n9p321-332>.
- TROSHEV, D. et al. The dynamics of nigrostriatal system damage and neurobehavioral changes in the rotenone rat model of Parkinson's disease. *Brain Research Bulletin*, v. 173, p. 1-13, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2021.04.006>.
- TROSHEV, D. et al. Time course of neurobehavioral disruptions and regional brain metabolism changes in the rotenone mice model of Parkinson's disease. *Biomedicine*, v. 10, n. 2, p. 466, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/biomedicine10020466>.
- TU, H. et al. Increased expression of pathological markers in Parkinson's disease dementia post-mortem brains compared to dementia with Lewy bodies. *BMC Neuroscience*, v. 23, n. 1, p. 1-13, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12868-021-00687-4>.

UGUR, M.; UGUR, Ö. A mechanism-based approach to P2X7 receptor action. *Molecular Pharmacology*, v. 95, n. 4, p. 442-450, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1124/mol.118.115022>.

ULLAH, I. et al. Metal elements and pesticides as risk factors for Parkinson's disease: a review. *Toxicology Reports*, v. 8, p. 607-616, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2021.03.009>.

VALENTE, E. M. et al. Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science*, v. 304, n. 5674, p. 1158-1160, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1096284>.

VIRACHIT, S. et al. Levels of glial cell line-derived neurotrophic factor are decreased, but fibroblast growth factor 2 and cerebral dopamine neurotrophic factor are increased in the hippocampus in Parkinson's disease. *Brain Pathology*, v. 29, n. 6, p. 813-825, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1111/bpa.12730>.

WALSH, R. N.; CUMMINS, R. A. The open-field test: A critical review. *Psychological Bulletin*, v. 83, n. 3, p. 482-504, 1976. DOI: <https://doi.org/10.1037/0033-2909.83.3.482>.

WALUSINSKI, O. Jean-Martin Charcot and Parkinson's disease: Teaching and teaching materials. *Revue Neurologique*, v. 174, n. 7-8, p. 491-505, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neurol.2017.08.005>.

WANG, C. et al. Alpha-synuclein and calpains disrupt SNARE-mediated synaptic vesicle fusion during manganese exposure in SH-SY5Y cells. *Cells*, v. 7, n. 12, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3390/cells7120258>.

WANG, D. et al. P2X7 receptor mediates NLRP3 inflammasome activation in depression and diabetes. *Cell and Bioscience*, v. 10, n. 1, p. 1-9, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13578-020-00388-1>.

WANG, L. et al. α -Synuclein multimers cluster synaptic vesicles and attenuate recycling. *Current Biology*, v. 24, n. 19, p. 2319-2326, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.08.027>.

WANG, S. J. et al. Effect of moxibustion on mTOR-mediated autophagy in rotenone-induced Parkinson's disease model rats. *Neural Regeneration Research*, v. 13, n. 1, p. 112-118, 2018. DOI: <https://doi.org/10.4103/1673-5374.224380>.

WANG, T.; SUN, Y.; DETTMER, U. Astrocytes in Parkinson's Disease: From Role to Possible Intervention. *Cells*, v. 12, n. 19, p. 2336, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/cells12192336>.

WANG, X. H. et al. Inhibiting purinergic P2X7 receptors with the antagonist brilliant blue G is neuroprotective in an intranigral lipopolysaccharide animal model of Parkinson's disease. *Molecular Medicine Reports*, v. 15, n. 2, p. 768-776, 2017. DOI: <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.6070>.

WATANABE, Y. *et al.* p62/SQSTM1-Dependent Autophagy of Lewy Body-Like α -Synuclein Inclusions. *PLoS ONE*, v. 7, n. 12, p. 1–12, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052868>.

WEISH, P. *et al.* Super-resolution microscopy informs on the molecular architecture of alpha-synuclein inclusions in model systems and in the human brain. *bioRxiv*, 2021.04.25.441304, 2021. Disponível em: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.04.25.441304v1>. Acesso em: 6 maio 2025.

WERSINGER, C.; SIDHU, A. Attenuation of dopamine transporter activity by α -synuclein. *Neuroscience Letters*, v. 340, n. 3, p. 189–192, 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(03\)00097-1](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(03)00097-1).

WHO. Parkinson disease: A public health approach – Technical brief. Geneva: World Health Organization, 2022. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/305320484>. Acesso em: 6 maio 2025.

WILKANIEC, A. *et al.* P2X7 receptor is involved in mitochondrial dysfunction induced by extracellular alpha synuclein in neuroblastoma SH-SY5Y cells. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 11, p. 11-14, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms21113959>.

WILKANIEC, A. *et al.* P2X7 receptor-pannexin 1 interaction mediates extracellular alpha-synuclein-induced ATP release in neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Purinergic Signalling*, v. 13, n. 3, p. 347-361, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11302-017-9567-2>.

WINSLOW, A. R.; RUBINSZTEIN, D. C. The Parkinson disease protein α -synuclein inhibits autophagy. *Autophagy*, v. 7, n. 4, p. 429-431, 2011. DOI: <https://doi.org/10.4161/auto.7.4.14393>.

WU, F. *et al.* Rotenone impairs autophagic flux and lysosomal functions in Parkinson's disease. *Neuroscience*, v. 284, p. 900–911, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.11.004>.

WU, S.; SCHEKMAN, R. W. Intercellular transmission of alpha-synuclein. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, v. 17, set., p. 1-12, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3389/fnmol.2024.1470171>.

XIA, Q. *et al.* Proteomic identification of novel proteins associated with Lewy bodies. *Frontiers in Bioscience*, v. 13, n. 10, p. 3850-3856, 2008. DOI: <https://doi.org/10.2741/2973>.

XILOURI, M. *et al.* α -Synuclein degradation by autophagic pathways: A potential key to Parkinson's disease pathogenesis. *Autophagy*, v. 4, n. 7, p. 917-919, 2008. DOI: <https://doi.org/10.4161/auto.6685>.

XIONG, N. *et al.* Potential autophagy enhancers attenuate rotenone-induced toxicity in SH-SY5Y. *Neuroscience*, v. 199, p. 292-302, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.10.031>.

XIONG, N. *et al.* The role of autophagy in Parkinson's disease: Rotenone-based modeling. *Behavioral and Brain Functions*, v. 9, n. 1, p. 13, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1186/1744-9081-9-13>.

XU, J. *et al.* Dopamine-dependent neurotoxicity of α -synuclein: A mechanism for selective neurodegeneration in Parkinson disease. *Nature Medicine*, v. 8, n. 6, p. 600-606, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1038/nm0602-600>.

XU, S. *et al.* Analysis of serum levels of organochlorine pesticides and related factors in Parkinson's disease. *NeuroToxicology*, v. 88, p. 216-223, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2021.12.001>.

YAMAMOTO, H.; MATSUI, T. Molecular Mechanisms of Macroautophagy, Microautophagy, and Chaperone-Mediated Autophagy. *Journal of Nippon Medical School*, v. 91, n. 1, p. JNMS.2024_91-102, 2024. DOI: https://doi.org/10.1272/jnms.JNMS.2024_91-102.

YAMASAKI, M.; TAKEUCHI, T. Locus Coeruleus and Dopamine-Dependent Memory Consolidation. *Neural Plasticity*, v. 2017, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1155/2017/8602690>.

YANG, X. *et al.* Combination of liquid crystal and deep learning reveals distinct signatures of Parkinson's disease-related wild-type α -synuclein and six pathogenic mutants. *Chemistry - An Asian Journal*, v. 17, n. 2, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1002/asia.202101251>.

YAO, L. *et al.* Genetic Imaging of Neuroinflammation in Parkinson's Disease: Recent Advancements. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, v. 9, p. 1-17, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.655819>.

YONG, V. W. *et al.* Progressive and accelerated weight and body fat loss in Parkinson's disease: A three-year prospective longitudinal study. *Parkinsonism & Related Disorders*, v. 77, p. 28-35, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2020.06.015>.

YU, H. *et al.* Association between Parkinson's Disease and Diabetes Mellitus: From Epidemiology, Pathophysiology and Prevention to Treatment. *Aging and Disease*, v. 13, n. 6, p. 1591-1605, 2022. DOI: <https://doi.org/10.14336/AD.2022.0325>.

YUAN, X.; TIAN, Y.; LIU, C.; ZHANG, Z. Environmental factors in Parkinson's disease: New insights into the molecular mechanisms. *Toxicology Letters*, v. 356, p. 1-10, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2021.12.003>.

ZENG, R. *et al.* Icaritin-mediated activation of autophagy confers protective effect on rotenone-induced neurotoxicity in vivo and in vitro. *Toxicology Reports*, v. 6, p. 637-644, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2019.06.014>.

ZHANG, J.; LIU, H.; JIANG, H. Dopamine-Dependent Early Synaptic and Motor Dysfunctions Induced by α -Synuclein in the Nigrostriatal Circuit. *Frontiers in Aging Neuroscience*, v. 13, p. 3477-3491, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3389/fnagi.2021.790224>.

ZHANG, T.; YANG, R.; PAN, J.; HUANG, S. Parkinson's disease related depression and anxiety: A 22-year bibliometric analysis (2000-2022). *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, v. 19, p. 1477-1489, 2023. DOI: <https://doi.org/10.2147/NDT.S403002>.

ZHANG, W.; XIAO, D.; MAO, Q.; XIA, H. Role of neuroinflammation in neurodegeneration development. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, v. 8, n. 1, p. 267, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01486-5>.

ZHENG, H. *et al.* Role and therapeutic targets of P2X7 receptors in neurodegenerative diseases. *Frontiers in Immunology*, v. 15, p. 1-18, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1345625>.

ZHU, J. *et al.* Temporal trends in the prevalence of Parkinson's disease from 1980 to 2023: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Healthy Longevity*, v. 5, n. 7, p. e464-e479, 2024. DOI: [https://doi.org/10.1016/S2666-7568\(24\)00094-1](https://doi.org/10.1016/S2666-7568(24)00094-1).