

## 2.08.99 - Bioquímica

**PAPEL DOS RECEPTORES PURINÉRGICOS NA DOENÇA DE PARKINSON EM MODELO ANIMAL**Henning Ulrich<sup>1\*</sup>, Ágatha Oliveira- Giacomelli<sup>2</sup>, Roberta Andrejew<sup>3</sup>

1. Professor no Depto de Bioquímica, Instituto de Química (IQ), Universidade de São Paulo (USP)
2. Pós-doutoranda no Depto. de Bioquímica, IQ-USP
3. Estudante do PPG em Ciências Biológicas (Bioquímica), IQ-USP

**Resumo**

A patofisiologia da Doença de Parkinson (DP) é baseada na perda de neurônios dopaminérgicos na via nigroestriatal e na presença de agregados proteicos positivos para  $\alpha$ -sinucleína ( $\alpha$ sin) e neurodegeneração de neurônios dopaminérgicos da via nigroestriatal. Essa lesão é acompanhada por um processo neuroinflamatório, com astrogliose e microgliose, que podem atuar como pró-inflamatórias exacerbando a lesão, ou podem formar a cicatriz glial, limitando a área lesionada e prevenindo a disseminação da inflamação.

Um dos principais modelos animais de DP é a lesão da via nigro-estriatal pela infusão de 6-hidroxidopamina (6-OHDA), que utiliza os transportadores dopaminérgicos para alcançar o espaço intracelular e culmina em morte neuronal. A administração é realizada diretamente em um dos hemisférios de roedores. A confirmação da lesão pode ser feita através da injeção com apomorfina, agonista dopaminérgico que induz comportamento rotacional nos animais cuja lesão estriatal seja superior a 90%.

Burnstock e colaboradores sugeriram que o ATP e nucleotídeos relacionados podem ser neurotransmissores ou co-transmissores na sinapse do sistema nervoso central e periférico (revisado por 1). Estudos farmacológicos levaram à primeira divisão dos receptores purinérgicos em P1 e P2 (revisado por 2). Os receptores do tipo P2 são ativados por nucleosídeos di- e trifosfatados (ADP, ATP e UTP) e são subdivididos em P2X e P2Y (revisado por 1). Enquanto os receptores P2Y(1-14) são metabotrópicos associados à proteína G (3), os receptores P2X(1-7) são ionotrópicos e sua ativação induz rápido influxo de  $Ca^{2+}$  e outros cátions. Esses receptores purinérgicos podem atuar na proliferação celular, diferenciação e apoptose. Alguns estudos demonstraram que a sinalização purinérgica está envolvida no desenvolvimento embrionário e de células-tronco (4). Trabalhos do nosso grupo demonstraram a participação na proliferação e diferenciação neuronal de células pluripotentes, bem como na neuroregeneração após perdas neuronais em doenças neurodegenerativas (5). No modelo animal de DP induzido por 6-OHDA, observamos aumento da expressão gênica estriatal dos receptores P2X7 e P2Y6 em até 5 semanas após a lesão (6). Sabe-se que o receptor P2Y6 está envolvido no processo de fagocitose de neurônios viáveis por células microgлияis (revisado em 6). O receptor P2Y1 é principalmente expresso em astrócitos (7) e vários trabalhos já associaram sua função com a modulação da reatividade de astrócitos (8,9) e proliferação e migração de células progenitoras neurais (10,11). Ainda, já foi demonstrado seu papel neuroprotetor e neurotóxico em diversas doenças neurológicas (12-14), inclusive doenças neurodegenerativas (15). No entanto, seu papel na DP e na degeneração de neurônios dopaminérgicos ainda não foi estabelecido.

Para estudo dos receptores P2X7 e P2Y6, realizamos a indução de um modelo severo de neurodegeneração dopaminérgica que consiste na injeção de 21  $\mu$ g de 6-OHDA no feixe prosencefálico medial do hemisfério direito do cérebro (AP -4,4; ML -1,2; DV -8,2). Para estudo do receptor P2Y1, realizamos um modelo de lesão branda e progressiva, onde animais foram injetados com 9  $\mu$ g de 6-OHDA no estriado direito em duas coordenadas diferentes (AP1: +0,5; ML1: -2,7; DV1: -4,5; AP2: -0,5; ML2: -3,2; DV2: -5,0, 1,5  $\mu$ L cada).

Após a realização do teste de apomorfina e análise imunohistoquímica (conforme descrito em 6), observamos que 1 semana após a indução do modelo severo, a lesão da via nigroestriatal já está estabelecida, ou seja, observamos comportamento rotacional no teste de apomorfina, redução de marcação para neurônios dopaminérgicos (TH) e aumento de marcação para células microgлияis reativas (Iba-1). Esse efeito persistiu nos animais analisados 5 semanas após a lesão. Adicionalmente, observamos um aumento na expressão gênica dos receptores P2X7 e P2Y6 estriatal ao longo das 5 semanas. No modelo de lesão branda, os ratos apresentaram uma morte de neurônios dopaminérgicos em torno de 20% e 40% em 7 e 30 dias após a injeção de 6-OHDA.

Estudos prévios demonstraram que o antagonismo de receptores P2X7 previnem a morte dopaminérgica em modelos de DP (17,18). Utilizamos um protocolo para análise de neuroregeneração. Para isso, uma semana após a lesão severa, os animais foram submetidos a 7 dias de tratamento com diferentes doses de Brilliant Blue G (BBG, antagonista de receptores P2X7). As doses de 50 e 75 mg/kg do composto reverteram o comportamento rotacional induzido por apomorfina e a dose de 75 mg/kg foi utilizada para dar prosseguimento aos experimentos. A análise imunohistoquímica após o tratamento com BBG indicou recuperação de células dopaminérgicas positivas pra TH e redução de células microgлияis reativas (marcação para Iba-1) na substância

negra de animais lesionados. Adicionalmente, pudemos observar que a reversão do comportamento rotacional dos animais lesionados e tratados com BBG persistiu após 7 dias do término do tratamento (21 dias após a lesão). Além disso, animais lesionados tratados com salina não apresentam melhora no comportamento rotacional.

Em outro grupo de animais, o antagonista de receptores P2Y6 (MRS2578) foi injetado 10 minutos antes da indução da lesão severa. Após 1 semana, observamos que esse tratamento preveniu parcialmente a morte de neurônios dopaminérgicos e reduziu a quantidade de células microgliais com fenótipo reativo (6).

Observamos que o modelo brando e progressivo de lesão induz uma proeminente astrogliose no estriado e na SN. O receptor P2Y1 apresentou expressão aumentada na SN e verificamos que ele não parece estar presente nos neurônios dopaminérgicos, mas em uma subpopulação de astrócitos. Realizamos uma curva de dose-resposta para avaliar se o receptor P2Y1 participaria da neurodegeneração presente na PD. Para isso, 7 dias após a indução de lesão, administramos por via intranasal seu agonista seletivo, MRS2365, nas doses de 10, 30 e 90 nmol/kg por 7 dias. 24 horas após o último dia do tratamento, verificamos que a dose de 90 nmol/kg exacerbou o prejuízo motor e a morte dos neurônios dopaminérgicos no estriado e na SN presente no grupo experimental 6-OHDA. Ainda, a dose de 10 nmol/kg também exacerbou a morte dos neurônios dopaminérgicos, que foi detectado apenas na SN.

Sendo assim, nossos resultados demonstram que o antagonismo dos receptores P2X7, P2Y6 e P2Y1 podem ser explorados como alvos terapêuticos na DP.

**Autorização legal:** Os protocolos de experimentação animal foram aprovados pelo Comitê de Ética do Instituto de Química do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (Brasil) (Certificados 15/2013, 04/2014, 57/2017, 105/2018, 167/2020).

**Palavras-chave:** 6-OHDA; P2X7; P2Y6; P2Y1; Microglia; Astrócitos.

**Apoio financeiro:** FAPESP, CNPq e CAPES

### Introdução

**Doença de Parkinson:** A Doença de Parkinson (DP) é uma doença neurodegenerativa altamente incapacitante que afeta cerca de 1% dos indivíduos entre 65 e 69 anos, alcançando cerca de 3% dos indivíduos com mais de 80 anos. A patofisiologia da doença é baseada na perda de neurônios dopaminérgicos na via nigroestriatal e na presença de agregados proteicos positivos para  $\alpha$ -sinucleína ( $\alpha$ sin), conhecidos como corpos de Lewy. Sabe-se que a neurodegeneração da substância negra (SN) resulta em atrofia de suas ramificações no estriado, acompanhado por uma diminuição da biodisponibilidade de dopamina. Essa neurodegeneração é acompanhada e exacerbada por um processo neuroinflamatório, com aumento de células microgliais reativas e proliferação de astrócitos. Ambos possuem um papel dual: além de contribuir para o ambiente inflamatório, pelo aumento da liberação de citocinas pró-inflamatórias e o consequente aumento da morte celular, também, eles podem formar a cricatriz glial, limitando a área lesionada e prevenindo a disseminação da inflamação. Atualmente, o tratamento mais utilizado é a administração de L-DOPA. Porém, essa droga apresenta eficácia limitada e diversos efeitos colaterais como sintomas de esquizofrenia.

Modelos animais que mimetizam o comportamento e as alterações bioquímicas de diferentes enfermidades são comumente utilizados em estudos de alternativas terapêuticas. Um dos principais modelos animais de DP é a lesão da via nigro-estriatal pela infusão de 6-hidroxidopamina (6-OHDA). A 6-OHDA é uma neurotoxina de estrutura análoga à dopamina que utiliza os transportadores dopaminérgicos para alcançar o espaço intracelular e alterar a homeostase celular, induzir disfunção mitocondrial, produção de espécies reativas de oxigênio e por fim levar a morte neuronal. A administração pode ser realizada por cirurgia estereotáxica em um dos hemisférios de roedores, utilizando o hemisfério contralateral como controle. A confirmação da lesão pode ser feita através da injeção com apomorfina, agonista dopaminérgico que induz comportamento rotacional nos animais cuja lesão da via nigro-estriatal seja superior a 90%. Desde o descobrimento da presença de neurogênese no cérebro adulto e a presença de células multipotentes em determinadas regiões, muitos estudos envolvendo possibilidades de repopulação dopaminérgica surgiram. Entre eles, a estimulação de células neuroprogenitoras endógenas tem se tornado um importante alvo de estudo, uma vez que soluciona o problema de rejeição de células exógenas.

**Sinalização purinérgica:** Em 1929, Drury e Szent-Gyorgyi demonstraram a ação de compostos de adenina em meio extracelular; mais tarde, na década de 50, Pamela Holton demonstrou a liberação de ATP pelos nervos terminais. Todavia, somente em 1970, Burnstock e colaboradores sugeriram que o ATP e nucleotídeos relacionados podem ser neurotransmissores ou co-transmissores na sinapse do sistema nervoso central e periférico (revisado por 1). Estudos farmacológicos comparando agonistas e suas respectivas respostas em diferentes tecidos levaram à primeira divisão dos receptores purinérgicos em P1 e P2 (revisado por 2). Os receptores do tipo P2 são ativados por nucleosídeos di- e trifosfatados (ADP, ATP e UTP) e são subdivididos em P2X e P2Y (revisado por 1). Os receptores P2Y(1-14) são metabotrópicos, associados à proteína G e podem agir principalmente ativando a fosfolipase C PLC- $\beta$ , levando à formação de inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) e à mobilização de cálcio citoplasmático, ou inibindo a atividade da adenilato ciclase por estimular proteínas G inibitórias (3). Os receptores P2X(1-7) são ionotrópicos e sua ativação induz rápido influxo de Ca<sup>2+</sup> e outros cátions, como Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup>, por formarem poros na membrana plasmática. Existem evidências crescentes que os receptores purinérgicos podem apresentar função na comunicação celular de longa duração, incluindo

proliferação celular, diferenciação e apoptose. Alguns estudos demonstraram que a sinalização purinérgica está envolvida no desenvolvimento embrionário e de células-tronco (4), entre eles, trabalhos do nosso grupo demonstrou a participação na proliferação e diferenciação neuronal de células pluripotentes, como também na neuroregeneração na tentativa de compensar ou reverter as perdas neuronais em doenças neurodegenerativas (5). No modelo animal de DP induzido por 6-OHDA, observamos aumento da expressão gênica estriatal dos receptores P2X7 e P2Y6 em até 5 semanas após a lesão (6). Sabe-se que o receptor P2Y6 está envolvido no processo de fagocitose de neurônios viáveis por células microgliais (revisto em 6). O receptor P2Y1 é principalmente expresso em astrócitos (7) e vários trabalhos já associaram sua função com a modulação da reatividade de astrócitos (8,9) e proliferação e migração de células progenitoras neurais (10,11). Ainda, já foi demonstrado seu papel neuroprotetor e neurotóxico em diversas doenças neurológicas (12-14), inclusive doenças neurodegenerativas, como a Doença de Alzheimer (15). No entanto, seu papel na DP e na degeneração de neurônios dopaminérgicos ainda não foi estabelecido. Partes do trabalho que serão apresentados no congresso da Sociedade Brasileira de Ciências em 2023 foram publicados nos periódicos *Cell Transplantation* e na *Frontiers of Pharmacology* (6, 16).

**Objetivos:** Analisar o efeito do antagonismo dos receptores P2X7 e P2Y6 na neuroregeneração dopaminérgica e ativação microglial em modelo animal severo de Doença de Parkinson; analisar o efeito do antagonismo dos receptores P2Y1 na neuroregeneração dopaminérgica e astrogliose em modelo animal brando de Doença de Parkinson

## Metodologia

**Lesão da via nigro-estriatal com 6-hidroxidopamina (6-OHDA) para indução do modelo da Doença de Parkinson:** Os protocolos de experimentação animal foram aprovados pelo Comitê de Ética do Instituto de Química do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (Brasil) (Certificados 15/2013, 04/2014, 57/2017, 105/2018, 167/2020). Ratos machos Sprague- Dawley com idade de 60 dias foram mantidos em gaiolas em sala com ciclos de 12h de claro e escuro e acesso irrestrito à água e comida. Para estudo dos receptores P2X7 e P2Y6, realizamos a indução de um modelo severo de neurodegeneração dopaminérgica, os animais foram anestesiados com uma solução 50%-50% xilazina-quetamina (33mg/kg) e injetados com 3µL de 6-OHDA (7µg/µl) no feixe prosencefálico medial do hemisfério direito do cérebro (AP -4,4; ML -1,2; DV -8,2). Para estudo do receptor P2Y1, realizamos um modelo de lesão branda e progressiva, onde animais foram anestesiados com isoflurano, na dose de 4% para indução e 1% para manutenção, seguido da cirurgia de estereotaxia para injeção de 9 µg no estriado direito em duas coordenadas diferentes (AP1: +0.5; ML1: -2.7; DV1: -4.5; AP2: -0.5; ML2: -3.2; DV2: -5.0, 1,5 µL cada).

**Teste rotacional induzido por apomorfina para avaliação de disfunção motora:** Os testes rotacionais foram realizados nos animais com lesão severa 1, 3 e 5 semanas após a lesão e ao final do tratamento com Brilliant-Blue G (inibidor do receptor P2X7, i.p., durante 7 dias) ou 1 semana após a injeção de MRS2578 (inibidor seletivo do receptor P2Y6, injetado no estriado direito 10 min antes da injeção de 6-OHDA). Os animais foram injetados com uma dose de apomorfina recém preparada de 0,5 mg/kg, em solução salina 0,9% com ácido ascórbico 0,02%. O número de rotações/min no sentido anti-horário, isto é, para o lado oposto à lesão, foi avaliado.

**Análise imuno-histoquímica:** Para análise imuno-histoquímica, os animais foram perfundidos com paraformaldeído 4% e os cérebros seccionados e marcados com anticorpos anti-tirosina hidroxilase (TH, enzima presente em neurônios dopaminérgicos), anti-Iba-1 (marcador de células microgliais), anti-P2Y1, anti-proteína fibrilar ácida da glia (GFAP, marcador de astrócitos). As imagens foram obtidas e analisadas por citometria de tecido, conforme descrito anteriormente (6).

## Resultados e Discussão

**1. Progressão da lesão induzida por 6-OHDA:** A progressão da lesão dopaminérgica da via nigroestriatal induzida pela administração de 6-OHDA em ratos foi avaliada durante 5 semanas. Para isso, os animais foram submetidos ao teste rotacional induzido por apomorfina, cujo comportamento rotacional é indicativo de lesão, 1, 3 ou 5 semanas após a lesão. Apesar de haver um aumento no número de rotações, essa diferença não apresentou significância estatística, indicando que após 1 semana a lesão está estabelecida. Corroborando com esses dados, a análise imunohistoquímica com anticorpo anti-tirosina hidroxilase (para neurônios dopaminérgicos) apresentou redução com significância estatística semelhante 1 e 5 semanas após a lesão. No modelo de lesão branda, os ratos apresentaram uma morte de neurônios dopaminérgicos em torno de 20% e 40% em 7 e 30 dias após a injeção de 6-OHDA.

**2. Reversão ou prevenção de neurodegeneração dopaminérgica por antagonistas do receptor P2X7 e de P2Y6 em modelo animal de Doença de Parkinson:** Estudos prévios demonstraram a importância dos P2X7R na lesão com 6-OHDA, onde o antagonista A-438079 e Brilliant Blue G (BBG) preveniram ou reverteram o déficit do neurotransmissor dopaminérgico (17,18). Uma semana após a lesão, os animais submetidos a 7 dias de tratamento com BBG nas doses de 50 e 75 mg/kg do composto, mas não as de 5 e 25 mg/kg, reverteram o comportamento hemiparkinsoniano no teste rotacional induzido por apomorfina. Assim, a dose de 75 mg/kg foi utilizada para dar prosseguimento aos experimentos. A análise imunohistoquímica de marcação de TH dos animais após o tratamento com BBG indicou recuperação de células dopaminérgicas positivas pra TH na substância negra de animais lesionados com 6-OHDA em relação ao hemisfério intacto. Além do P2X7R, a expressão gênica estriatal do P2Y6R aumentou em até 5 semanas após a lesão dopaminérgica induzida por 6-OHDA, e sua antagonização com a droga MRS2578 foi capaz de prevenir o

comportamento rotacional típico desse modelo animal de DP. Adicionalmente, ambos tratamentos reduziram a quantidade de células microgliais com fenótipo reativo, como observado pela marcação com Iba-1 (6).

Avaliamos se o efeito comportamental observado com a administração de BBG na dose de 50 mg/kg persistia 7 dias após o término do tratamento (21 dias após a cirurgia de lesão). Pudemos observar que os animais lesionados (7 dias após a lesão) apresentam comportamento rotacional significativamente maior do que os animais tratados com BBG por 7 dias (14 dias após a lesão) e esse efeito persistiu após 7 dias do término do tratamento (21 dias após a lesão). Além disso, animais lesionados tratados com salina não apresentam melhora no comportamento rotacional.

### **3. O receptor P2Y1 parece participar da neurodegeneração dos neurônios dopaminérgicos**

Inicialmente, verificamos que o modelo brando e progressivo de lesão induz uma proeminente astrogliose no estriado e na SN. O receptor P2Y1 apresentou expressão aumentada na SN e verificamos que ele não parece estar presente nos neurônios dopaminérgicos, mas em uma subpopulação de astrócitos. Realizamos uma curva de dose-resposta para avaliar se o receptor P2Y1 participaria da neurodegeneração presente na PD. Para isso, 7 dias após a indução de lesão, administramos por via intranasal seu agonista seletivo, MRS2365, nas doses de 10, 30 e 90 nmol/kg por 7 dias. 24 horas após o último dia do tratamento, verificamos que a dose de 90 nmol/kg exacerbou o prejuízo motor e a morte dos neurônios dopaminérgicos no estriado e na SN presente no grupo experimental 6-OHDA. Ainda, a dose de 10 nmol/kg também exacerbou a morte dos neurônios dopaminérgicos, que foi detectado apenas na SN.

### **Conclusões**

O antagonismo dos receptores P2X7 após a indução de neurodegeneração resulta na regeneração de neurônios dopaminérgicos, enquanto o antagonismo do receptor P2Y6 previne a neurodegeneração de neurônios dopaminérgicos no modelo de Parkinson induzido por injeção de 6-OHDA, ambos acompanhados por redução de células microgliais reativas. O estudo do receptor P2Y1 sugere-o como um novo alvo para entendermos melhor como a degeneração dos neurônios dopaminérgicos ocorrem. Nossos resultados indicam que o receptor P2Y1 pode modular a morte de neurônios dopaminérgico pela modulação da atividade dos astrócitos, possivelmente exacerbando uma excitotoxicidade presente no microambiente. Os receptores P2X7, P2Y6 e P2Y1 podem ser explorados como alvos na DP.

### **Referências bibliográficas**

1. Burnstock G. Trends Pharmacol Sci. 2006;27(3):166-76.
2. Burnstock G. Braz J Med Biol Res. 2009;42(1):3-8.
3. Burnstock G. Brain Neurosci Adv. 2018 ;2:2398212818817494.
4. Burnstock G, Ulrich H. Cell Mol Life Sci. 2011;68(8):1369-94.
5. Ulrich H et al. Stem Cell Rev Rep. 2012;8:755-67.
6. Oliveira-Giacomelli Á et al. Front Cell Neurosci. 2019;13:476.
7. Burnstock G, Knight GE. Int Rev Cytol. 2004;240:31-304.
8. Franke H, et al. Purinergic Signal. 2012 Sep;8(3):629-57.
9. Yang J, et al. Elife. 2016;5:e15043.
10. Suyama S, et al. J Neurosci. 2012;32(27):9238-47.
11. Mishra SK, et al. Development. 2006;133(4):675-84.
12. Noguchi Y, et al PLoS One. 2013;8(2):e57898.
13. Zheng W, et al. J Cereb Blood Flow Metab. 2013;33(4):600-11.
14. Alves M, et al. J Neurosci 2019;39(27):5377-5392.
15. Reichenbach N, et al. J Exp Med. 2018;215(6):1649-1663.
16. Ferrazoli, EG et al. Cell Transplant. 201;26(4):669-677.
17. Marcellino D et al. J Neural Transm (Vienna). 2010;117(6):681-7.
18. Carmo MR et al. Neuropharmacology. 2014;81:142-52.