



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS-ICB
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA E BIOFÍSICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS – FISILOGIA E FARMACOLOGIA**



LEIDIANA DE ALMEIDA COSTA

**TRIAGEM DE POTENCIAIS NEUROPROTETORES EM MODELO CELULAR DE
TOXICIDADE INDUZIDA POR MPP+: ANGIOTENSINA- (1-7) COMO UM
CANDIDATO**

BELO HORIZONTE-MG
2021

LEIDIANA DE ALMEIDA COSTA

**TRIAGEM DE POTENCIAIS NEUROPROTETORES EM MODELO CELULAR DE
TOXICIDADE INDUZIDA POR MPP+: ANGIOTENSINA- (1-7) COMO UM
CANDIDATO**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia.

Orientadora: Prof.^a Dr. Elaine Maria de Souza Fagundes

BELO HORIZONTE-MG
2021

043

Costa, Leidiana de Almeida.

Triagem de potenciais neuroprotetores em modelo celular de toxicidade induzida por MPP+: Angiotensina-(1-7) como um candidato [manuscrito] / Leidiana de Almeida Costa. – 2021.

103 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Prof.^a Dr. Elaine Maria de Souza Fagundes.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia.

1. Fisiologia. 2. Neuroproteção. 3. Doença de Parkinson. 4. Angiotensinas. 5. 1-Metil-4-fenilpiridínio. 6. Neuroblastoma. I. Fagundes, Elaine Maria de Souza. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 612

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Departamento de Fisiologia e Biofísica da Universidade Federal de Minas Gerais, sob orientação da Prof.^a Dr.^a Elaine Maria de Souza Fagundes.

APOIO FINANCEIRO

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES);
- Fundação Alexander von Humboldt (Alemanha);
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

COLABORADORES

- Profa. Dra. Juliana Carvalho Tavares/ICB/UFMG
- Prof. Dr. Marcel Leist/Universidade de Konstanz/Alemanha
- Prof. Dr. Robson Santos/ICB/UFMG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

FOLHA DE APROVAÇÃO DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE LEIDIANA DE ALMEIDA COSTA

"Triagem de Potenciais Neuroprotetores em Modelo Celular de Toxicidade Induzida por MPP+: Angiotensina-(1-7) Como um Candidato"

LEIDIANA DE ALMEIDA COSTA

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia **01 de julho de 2021**, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:

Profa. Dra. Juliana Carvalho Tavares, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais

Prof. Dr. Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais

Profa. Dra. Elaine Maria de Souza Fagundes, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais - Orientadora

Belo Horizonte, 01 de julho de 2021.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Elaine Maria de Souza Fagundes, Professora do Magistério Superior**, em 06/07/2021, às 15:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Juliana Carvalho Tavares, Professora do Magistério Superior**, em 06/07/2021, às 16:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Antonio Carlos Pinheiro de Oliveira, Professor do Magistério Superior**, em 29/07/2021, às 16:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0791189** e o código CRC **A3833A09**.

Dedico esta pesquisa aos meus pais, meus maiores e melhores orientadores na vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por estar sempre comigo e ter me dado forças para cumprir mais esta meta;

Aos meus pais, Francisco e Lucilene, pelo apoio que me deram e têm me dedicado;

À Prof.^a Elaine pelos ensinamentos e contribuição científica;

Ao Prof. Robson Santos pela concessão da Angiotensina- (1-7) e A779;

Ao meu noivo, Micah, pelo amor e incentivo;

Ao Daniel, pela ajuda nos experimentos;

À Daniela do centro de citometria pela ajuda e me fornecer a chave do laboratório mesmo com toda dificuldade imposta pela pandemia;

Aos ex alunos Jonas, Igor, Juliana, Bryan, Fernanda e Letícia pela convivência e aprendizado.

RESUMO

Introdução: Os modelos celulares são utilizados para estudar uma gama de doenças. Eles são particularmente úteis para explorar os aspectos fisiopatológicos isolados, os genes e proteínas envolvidas, os mecanismos de ação de neurotoxinas específicas, para triagem preliminar de compostos, além de fornecerem informações valiosas para validação em modelos animais. As células SH-SY5Y constituem a linhagem celular mais amplamente utilizada como modelo de neurônios. Esse tipo celular foi estabelecido em 1970 a partir de um tumor ósseo metastático derivado de neuroblastoma, um tumor embrionário do sistema nervoso simpático periférico e o tumor sólido extracraniano mais comum da infância. Apesar da origem tumoral, essas células são muito utilizadas para estudar doenças neurodegenerativas, como a doença de Parkinson (DP). Essas células expressam vários marcadores neuronais dopaminérgicos, tais como tirosina hidroxilase (TH), dopamina- β -hidroxilase, transportador de DA (DAT), bem como os subtipos de receptores de DA 2 e 3 (D2R e D3R). Além disso, a maioria dos genes e vias envolvidas na DP encontram-se intactos nessas células. Devido a ampla evidência para o envolvimento do estresse oxidativo na DP, as células SH-SY5Y são utilizadas na maioria dos estudos para avaliar efeito neuroprotetor de compostos diante insulto oxidativos. O insulto tóxico com 1-Metil-4-Fenilpiridínio (MPP+) é o mais amplamente utilizado e possui a vantagem de causar degeneração específica dos neurônios dopaminérgicos, uma vez que é ativamente captado unicamente por DAT. Ele inibe a atividade do complexo I da cadeia de transporte de elétrons levando à depleção de ATP mitocondrial e morte celular. Atualmente, não existem terapias neuroprotetoras comprovadas para a DP. As atuais terapias utilizadas em pacientes com DP apresentam apenas ação sintomática e não diminuem ou impedem a degeneração neuronal. Embora diversos compostos tenham demonstrado atividade neuroprotetora em ensaios pré-clínicos nos últimos anos, a maioria falhou em reproduzir esses resultados em estudos clínicos, ou são mal tolerados pelos pacientes por causa de seus efeitos colaterais. Nos últimos anos, a atenção foi dispensada aos componentes do sistema renina angiotensina como potenciais alvos neuroprotetores, tais como inibidores da Angiotensina II e Angiotensina-(1-7) (Ang- (1-7)). Estudos recentes sugerem que Ang- (1-7) possui papel neuroprotetor, porém os mecanismos envolvidos ainda não foram completamente esclarecidos. **Objetivo:** Avaliar o potencial neuroprotetor *in vitro* da Ang- (1-7) sobre a toxicidade induzida por MPP+ utilizando como modelo células neuronais humanas SH-SY5Y diferenciadas com ácido retinóico. **Método:** O efeito neuroprotetor foi avaliado pelos ensaios de viabilidade (MTT e LDH), marcação com iodeto de propídio (IP), ensaio fluorimétrico utilizando o marcador 2,7-diacetato de diclorofluoresceína (DCF- DA) e tamanho dos neuritos. **Resultados:** O pré-tratamento das células com Ang- (1-7) por 24 horas protegeu contra a perda de viabilidade celular, integridade de membrana, estresse oxidativo e degeneração dos neuritos causadas por MPP+. Tal efeito protetor foi completamente abolido quando as células foram tratadas com Ang- (1-7) + A-779, demonstrando assim que o efeito alcançado pela Ang- (1-7), neste modelo, é dependente do receptor Mas. **Conclusões:** O presente estudo permite concluir que, no modelo experimental proposto, o tratamento com Ang- (1-7) foi capaz de proteger células SH-SY5Y contra o dano por MPP+. Esses achados apoiam a ideia de que o eixo Ang- (1-7) / MasR deve ser incluído como um alvo farmacológico potencial contra lesão oxidativa em modelos mais complexos de neuroproteção e DP.

PALAVRAS CHAVES: Neuroproteção, Doença de Parkinson, SH-SY5Y, 1-Metil-4-Fenilpiridínio, Angiotensina- (1-7)

ABSTRACT

Introduction: Cellular models have been used to study a range of diseases. They are particularly useful for exploring isolated pathophysiological aspects, the genes and proteins involved, mechanisms of action of specific neurotoxins, for preliminary screening of compounds, and providing valuable information for validation in animal models. SH-SY5Y cells constitute the cell lineage most widely used as a model of neurons. This cell was established in 1970 from a metastatic bone tumor derived from neuroblastoma, an embryonic peripheral sympathetic nervous system tumor, and the most common extracranial solid tumor of childhood. Despite their tumor origin, these cells are widely used to study neurodegenerative diseases, such as Parkinson's disease (PD). These cells express several dopaminergic neuronal markers, such as tyrosine hydroxylase (TH), dopamine- β -hydroxylase, DA transporter (DAT), and DA receptor subtypes 2 and 3 (D2R and D3R). Furthermore, most of the genes and pathways involved in PD are found intact in these cells. Due to ample evidence for the involvement of oxidative stress in PD, SH-SY5Y cells are used in most studies to assess the neuroprotective effect of compounds against oxidative insult. The toxic insult with 1-Methyl-4-Phenylpyridinium (MPP⁺) is the most widely used and has the advantage of causing specific degeneration of dopaminergic neurons since it is actively captured only by DATs. It inhibits the complex I activity of the electron transport chain leading to ATP depletion and cell death. Currently, there are no proven neuroprotective therapies for PD. Current therapies used in patients with PD have only symptomatic action and do not reduce or prevent neuronal degeneration. Although several compounds have demonstrated neuroprotective activity in preclinical trials in recent years, most have failed to reproduce these results in clinical trials, or are poorly tolerated by patients because of their side effects. In the past few years, attention has been given to components of the renin-angiotensin system as potential neuroprotective targets, such as Angiotensin II inhibitors and Angiotensin- (1-7) (Ang- (1-7)). Recent studies suggest that Ang- (1-7) has a neuroprotective role, but the mechanisms involved are not yet fully understood. **Objective:** To evaluate the *in vitro* neuroprotective potential of Ang- (1-7) against the toxicity induced by MPP⁺ using human neuronal cells SH-SY5Y differentiated with retinoic acid as a model. **Method:** The neuroprotective effect was evaluated by viability assays (MTT and LDH), labeling cells with propidium iodide (IP), and a fluorimetric assay using the marker 2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCF,-DA) and neurite outgrowth. **Results:** Pretreatment of cells with Ang- (1-7) for 24 hours protected against loss of cell viability, membrane integrity, oxidative stress, and neuritic degeneration caused by MPP⁺. The protective effect was completely abolished when the cells were treated with Ang- (1-7) + A-779. This demonstrates that in this model, the neuroprotective effect of Ang- (1-7) is dependent on the Mas receptor. **Conclusions:** The present study allows us to conclude that, in the proposed experimental model, treatment with Ang- (1-7) was able to protect SH-SY5Y cells against MPP⁺ damage. These findings support the idea that the Ang- (1-7) / MasR axis should be included as a potential pharmacological target against oxidative injury in more complex models of neuroprotection and PD.

KEYWORDS: Neuroprotection, Parkinson's Disease, SH-SY5Y, 1-Methyl-4-Phenylpyridinium, Angiotensin- (1-7)

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

6-OHDA	6-Hidroxidopamina
A779	D-Alanina-Angiotensina- (1-7)
ADs	Agonistas de dopamina
AIF	Fator indutor de apoptose
AMPA	Ácido alfa-Amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol Propiônico
Ang- (1-7)	Angiotensina- (1-7)
Ang I, II, III, IV	Angiotensina I, II, III, IV
AR	Ácido retinóico
AT1R	Receptor de angiotensina II tipo I
AT2R	Receptor de angiotensina II tipo II
ATP	Trifosfato de adenosina
BHE	Barreira hematoencefálica
CI	Cadeia de transporte de elétrons I
COMT	Catecol O-metil transferase
CTE	Cadeia de transporte de elétrons
DA	Dopamina
DAQ	Dopamina orto-quinona
DAT	Transportador de dopamina
DCFH-DA	Diacetato de 2', 7'-diclorodi-hidrofluoresceína
DDC	Descarboxilase
DOPAL	3,4-Diidroxifenilacetaldeído
DP	Doença de Parkinson
EAATs	Transportadores de glutamato
ECA-2	Enzima conversora de angiotensina do tipo 2
ECP	Estimulação cerebral profunda
endoG	Endonuclease G
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROS	Espécies reativas de oxigênio

FNs	Fatores neurotróficos
GPe	Globo pálido externo
GPI	Globo pálido interno
GSH	Glutathione
GSH-Px	Glutathione peroxidase
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
IP	Iodeto de propídio
LDH	Lactato desidrogenase
L-DOPA	L-3,4-di-hidroxi-fenilalanina
LPS	Lipopolissacarídeo
MAO-B	Monoamina oxidase B
MME	Membrana mitocondrial externa
MMI	Membrana mitocondrial interna
MPP⁺	1-metil-4-fenil-piridínio
MPT	Modificações pós-traducionais
mPTP	Poros de transição de permeabilidade mitocondrial
MPTP	1-Metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NF-κB	Fator nuclear cerebral- κB
NMDA	Ácido N-metil-D-aspartato
NST	Núcleo subtalâmico
O₂^{•-}	Superóxido
ONOO⁻	Peroxinitrito
Paraquat	1,1'-Dimetil-4,4'-bipiridina-dicloreto
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico humano
PBS	Tampão fosfato-salino
RE	Retículo endoplasmático
MasR	Receptor Mas
SFB	Soro fetal bovino
SH-SY5Y	Célula humana de neuroblastoma
SNC	Sistema nervoso central

SNCA	Gene codificador da alfa-sinucleína
SNpc	Substância nigra pars compacta
SNpr	Substância nigra pars reticulata
SOD	Superóxido dismutase
SRA	Sistema renina angiotensina
SUP	Sistema ubiquitina-proteassoma
TH	Tirosina hidroxilase
UPR	Resposta a proteínas mal enoveladas
VGLUTs	Transportadores de glutamato vesicular
VMAT2	Transportador vesicular de monoamina 2
$\Delta\Psi_m$	Potencial de membrana mitocondrial

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo Glutamato Glutamina	26
Figura 2. Diagramas resumidos do circuito de modulação motora normal e na DP	27
Figura 3. O papel da neuroinflamação no processo neurodegenerativo.....	30
Figura 4. Papel central do estresse oxidativo crônico na progressão da DP	32
Figura 5. Oxidação de dopamina à neuromelanina	37
Figura 6. Via intrínseca e extrínseca da apoptose	39
Figura 7. A interação entre nível de dopamina, wearing-off e discinesias ao longo da progressão da DP.....	41
Figura 8. Modelo simplificado do SRA	49
Figura 9. Protocolo de diferenciação induzida por AR.....	56
Figura 10. Parâmetro morfológico de células SH-SY5Y diferenciadas com AR	64
Figura 11. Curva dose-resposta para o MPP+ em células SH-SY5Y diferenciadas	65
Figura 12. Efeito da Angiotensina- (1-7) sobre a viabilidade de células SH-SY5Y diferenciadas submetidas ao dano com MPP+	66
Figura 13. Efeito antiproliferativo da Angiotensina- (1-7) em células SH-SY5Y diferenciadas e em PBMCs humanas.....	67
Figura 14. Efeito da Angiotensina- (1-7) na distribuição do ciclo celular de células SH-SY5Y diferenciadas.....	68
Figura 15. Efeito da Angiotensina- (1-7) contra o dano celular por MPP+ em células SH-SY5Y diferenciadas.....	69
Figura 16. Efeito da Angiotensina- (1-7) isolada e associada a A779 contra o dano celular por MPP+ em células SH-SY5Y diferenciadas	69
Figura 17. Efeito da Angiotensina- (1-7) na progressão do ciclo celular de células SH-SY5Y diferenciadas e submetidas ao dano por MPP+	70
Figura 18. Efeito da Angiotensina- (1-7) associada com A779 na progressão do ciclo celular de células SH-SY5Y diferenciadas submetidas ao dano por MPP+	71
Figura 19. Efeito da Angiotensina- (1-7) na produção de EROs induzida por MPP+ em células SH-SY5Y diferenciadas	72
Figura 20. Efeito da Angiotensina- (1-7) associada com A779 na produção de EROs induzida por MPP+ em células SH-SY5Y diferenciadas.....	72

Figura 21. Efeito da Angiotensina- (1-7) isolada e associada com A779 no tamanho de neuritos de células SH-SY5Y diferenciadas.....73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sistemas de cultura de neurônios dopaminérgicos	44
Tabela 2. Análise de rede para módulos da DP	45

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1. DOENÇA DE PARKINSON.....	21
2.2. MECANISMOS CELULARES E MOLECULARES ENVOLVIDOS NA NEURODEGENERAÇÃO DA DP	22
2.2.1. AGREGAÇÃO DE α -SINUCLÉINA	22
2.2.2. EXCITOTOXICIDADE.....	24
2.2.3. NEUROINFLAMAÇÃO	28
2.2.4. ESTRESSE OXIDATIVO	31
2.2.5. APOPTOSE.....	38
2.3. TRATAMENTO DA DOENÇA DE PARKINSON	40
2.4. MODELOS <i>IN VITRO</i> DE NEUROPROTEÇÃO.....	43
2.5. SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA	47
2.6. ANGIOTENSINA- (1-7)	50
3. JUSTIFICATIVA.....	54
4. OBJETIVOS	55
4.1. OBJETIVO GERAL	55
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	55
5. MATERIAL E MÉTODOS	56
5.1. CULTIVO DE CÉLULAS SH-SY5Y	56
5.2. DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS SH-SY5Y.....	56
5.3. INDUÇÃO DE NEUROTOXICIDADE POR MPP+	57
5.4. REALIZAÇÃO DA CURVA DOSE-RESPOSTA DA ANGIOTENSINA- (1-7)	58
5.5. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DA ANGIOTENSINA-(1- 7) EM CÉLULAS SH-SY5Y DIFERENCIADAS E EM PBMC	58
5.5.1. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA EM LINHAGENS DE CÉLULAS SH-SY5Y	59
5.5.2. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DA ANGIOTENSINA-(1-7) EM PBMCs HUMANAS.....	60
5.6. AVALIAÇÃO DO PRÉ-TRATAMENTO COM ANGIOTENSINA- (1-7) ISOLADA E ASSOCIADA COM A779 NA VIABILIDADE CELULAR	61
5.7. AVALIAÇÃO DO PRÉ-TRATAMENTO COM ANGIOTENSINA- (1-7) ISOLADA E ASSOCIADA COM A779 NA INTEGRIDADE DA MEMBRANA	61

5.8. AVALIAÇÃO DO PRÉ-TRATAMENTO COM ANGIOTENSINA- (1-7) ISOLADA E ASSOCIADA COM A779 NA PROGRESSÃO DO CICLO CELULAR E AVALIAÇÃO DO CONTEÚDO DE DNA SUBDIPLÓIDE EM CÉLULAS SH-SY5Y DIFERENCIADAS SUBMETIDAS AO DANO COM MPP+	62
5.9. AVALIAÇÃO DO PRÉ-TRATAMENTO COM ANGIOTENSINA- (1-7) ISOLADA E ASSOCIADA COM A779 SOB O ESTRESSE OXIDATIVO	62
5.10. AVALIAÇÃO DO EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM ANGIOTENSINA- (1-7) ISOLADA E ASSOCIADA COM A779 NO TAMANHO DE NEURITOS DE CÉLULAS SH-SY5Y DIFERENCIADAS SUBMETIDAS AO DANO COM MPP+	63
5.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA	63
6. RESULTADOS	64
6.1. DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS SH-SY5Y	64
6.2. NEUROTOXICIDADE POR MPP+	64
6.3. CURVA DOSE-RESPOSTA DA ANGIOTENSINA- (1-7)	65
6.4. ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DA ANGIOTENSINA- (1-7) EM CÉLULAS SH-SY5Y DIFERENCIADAS E EM PBMCs HUMANAS	66
6.5. EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM ANGIOTENSINA- (1-7) ISOLADA E ASSOCIADA COM A779 NA VIABILIDADE E INTEGRIDADE DE MEMBRANA DE CÉLULAS SH-SY5Y DIFERENCIADAS SUBMETIDAS AO DANO COM MPP+	67
6.6. EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM ANGIOTENSINA- (1-7) ISOLADA E ASSOCIADA COM A779 NA PROGRESSÃO DO CICLO CELULAR E AVALIAÇÃO DO CONTEÚDO DE DNA SUBDIPLOIDE EM CÉLULAS SH-SY5Y DIFERENCIADAS SUBMETIDAS AO DANO COM MPP+	70
6.7. EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM ANGIOTENSINA- (1-7) ISOLADA E ASSOCIADA COM A779 SOB O ESTRESSE OXIDATIVO	72
6.8. EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM ANGIOTENSINA- (1-7) ISOLADA E ASSOCIADA COM A779 NO TAMANHO DE NEURITOS DE CÉLULAS SH-SY5Y DIFERENCIADAS SUBMETIDAS AO DANO COM MPP+	73
7. DISCUSSÃO	74
8. CONCLUSÃO	79
9. BIBLIOGRAFIA	80
ANEXO A- Efeito de 15 novos compostos derivados de piperazina (inibidores da captação de prolina) contra o dano celular desencadeado por MPP+ em células SH-SY5Y	95
ANEXO B- Notificação de Criação- Patente de Invenção- Inibidores dos transportadores de prolina como fármacos para o tratamento de doenças psiquiátricas, neurológicas e neurodegenerativas.	98

1. INTRODUÇÃO

A doença de Parkinson (DP) é uma doença neurodegenerativa progressiva complexa descrita pela primeira vez por James Parkinson em 1817 em sua publicação, “Um ensaio sobre a paralisia agitante” (PARKINSON, 2016). A neuropatologia da DP é caracterizada por uma perda seletiva de neurônios dopaminérgicos da substância nigra pars compacta (SNpc), com amplo envolvimento de outras estruturas do sistema nervoso central (SNC) e tecidos periféricos. Clinicamente, a doença caracteriza-se pela presença de bradicinesia associada a rigidez muscular, tremor de repouso (4-6 Hz) ou instabilidade postural (NICE, 2017). Os sintomas não motores também estão presentes no curso da doença e abrangem os distúrbios sensitivos, psiquiátricos, disfunções autonômicas, distúrbios do sono e fadiga, que juntos contribuem para piorar a qualidade de vida e a dependência do paciente (MAGRINELLI *et al.*, 2016; PFEIFFER, 2016).

Estima-se que 9,4 milhões de pessoas vivem com DP ao redor do mundo, sendo 229.000 apenas no Brasil (MASEREJIAN; VINIKOOR-IMLER & DILLEY, 2020). A sua prevalência aumenta com a idade, variando entre 41 e 1.903 por 100.000 em indivíduos na faixa etária de 40-49 anos e acima de 80 anos, respectivamente (PRINGSHEIM *et al.*, 2014). Estudos também mostram diferenças na distribuição da doença segundo gênero, sendo mais prevalente em homens (1729 por 100.000, >65 anos) que em mulheres (1644 por 100.000) (PRINGSHEIM *et al.*, 2014; RIEDEL *et al.*, 2016). Estudo que avaliou incidência mostra uma taxa geral de 37,55 e 61,21 por 100.000 pessoas por ano em mulheres e homens, respectivamente, na faixa etária de 40 anos ou mais (HIRSCH *et al.*, 2016).

Sabe-se que diversos fatores contribuem para a neurodegeneração da DP, entre eles o envelhecimento, fatores genéticos e exposição a toxinas ambientais (CACABELOS, 2017). Os mecanismos celulares e moleculares pelos quais esses fatores conduzem à degeneração neuronal abrangem agregação proteica, excitotoxicidade, neuroinflamação, disfunção mitocondrial que potencialmente contribuem para o estresse oxidativo celular e apoptose, isoladamente ou interagindo entre si (PUSPITA; CHUNG & SHIM, 2017). O estresse oxidativo parece ser um evento central associado ao desenvolvimento da DP ao ativar a cascata de eventos que levam à degeneração de neurônios dopaminérgicos.

Um dos principais desafios na pesquisa da DP é o desenvolvimento de fármacos neuroprotetores. As atuais terapias utilizadas em pacientes com DP apresentam apenas ação sintomática e não diminuem ou impedem a degeneração neuronal (OERTEL & SCHULZ, 2016). Embora diversos compostos tenham demonstrado atividade neuroprotetora em ensaios pré-clínicos nos últimos anos, a maioria falharam em reproduzir esses resultados em estudos clínicos, ou são mal tolerados pelos pacientes por causa de seus efeitos colaterais (ATHAUD & FOLTYNIE, 2015; SALAMON *et al.*, 2020).

Nos últimos anos, a atenção foi dispensada aos componentes do sistema renina-angiotensina (SRA) como potenciais alvos neuroprotetores, especialmente aos bloqueadores da Angiotensina II (Ang II) e à Angiotensina- (1-7) (Ang- (1-7), a última por contra regular o eixo da Ang II em outras doenças (ABIODUN & OLA, 2020). A Ang- (1-7) é um dos principais peptídeos do SRA presentes do SNC e é expressa em diferentes regiões do cérebro, incluindo hipotálamo, hipocampo e amígdala (PASSOS-SILVA; VERANO-BRAGA & SANTOS, 2013). Estudos mostram uma diversidade de atividades biológicas da Ang- (1-7) que incluem: vasodilatadora (CAMPAGNOLE-SANTOS *et al.*, 1989), neuroprotetora (JIANG *et al.*, 2012), antiproliferativa (GALLAGHER; TALLANT, 2004 & MENON *et al.*, 2007), antilipídêmica (SINGH; SINGH & SHARMA, 2011), antiangiogênica e antifibrótica (GUO *et al.*, 2017; TALLANT; DIZ & FERRARIO, 1999), anti-inflamatória (DE CARVALHO SANTUCHI *et al.*, 2019) e antioxidante (RABELO; ALENINA & BADER, 2011).

Além dessas propriedades, a injeção intraestriatal unilateral de Ang- (1-7) mostrou melhorar o desempenho motor e coordenação muscular em um modelo neurotóxico de 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA) de PD. A Ang- (1-7) foi capaz de regular positivamente a expressão estriatal de seu receptor Mas (MasR) e estimular o eixo BDNF / TrkB pela ativação de fosfoinositídeo 3-quinase / proteína quinase B / CREB (PI3K / Akt / CREB). Além disso, a Ang- (1-7) preservou neurônios dopaminérgicos por aumentar imunoreatividade para tirosina hidroxilase (TH) e dopamina (DA) (RABIE *et al.*, 2018).

Com base nos relatos da literatura sobre efeitos antioxidantes da Ang- (1-7), e o envolvimento do estresse oxidativo na patogênese da DP, nossa hipótese é que a Ang- (1-7) protege contra a neurodegeneração, especificamente contra o estresse oxidativo *in vitro*.

Nesta dissertação de mestrado, no primeiro momento serão descritos os principais aspectos da DP, os mecanismos celulares e moleculares de neurodegeneração, os tratamentos atualmente disponíveis, os modelos *in vitro* de neuroproteção e uma breve descrição do SRA e da Ang- (1-7). E por fim, serão apresentados nossos estudos sobre a atividade da Ang- (1-7) em modelo *in vitro* de neuroproteção.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. DOENÇA DE PARKINSON

A DP representa um distúrbio multissistêmico e a segunda doença neurodegenerativa relacionada ao envelhecimento mais comum do SNC, seguida pela doença de Alzheimer (KLINGELHOEFER & REICHMANN, 2017; TYSNES & STORSTEIN, 2017).

A neuropatologia da DP caracteriza-se pela perda de neurônios dopaminérgicos especialmente da SNpc e de suas projeções ascendentes para o estriado (caudado e putâmen), levando a anormalidade no controle dos movimentos, devido a diminuição da DA. A degeneração também atinge o locus ceruleus, núcleo basal, hipotálamo, córtex cerebral, núcleo motor do nervo craniano e as divisões centrais e periféricas do sistema nervoso autônomo, resultando no amplo espectro de sintomas clínicos da doença (CACABELOS, 2017; PARKINSON, 2016).

A DP é considerada um distúrbio neurodegenerativo lentamente progressivo. Estudos sugerem que haja um período pré-sintomático de vários anos entre o aparecimento das alterações neuropatológicas e subsequente depleção de DA e a manifestação de sintomas clínicos (OERTEL & SCHULZ, 2016). A perda progressiva de neurônios dopaminérgicos é uma característica do envelhecimento natural, mas a maioria das pessoas não perde o suficiente para desenvolver a doença. Estudo realizado por BERNHEIMER *et al.* (1973) mostrou que sintomas como acinesia, rigidez e tremor manifestam-se após a deficiência de DA nos núcleos estriados atinge graus comparativamente de 70-80%.

Além do envelhecimento, a associação de fatores genéticos e ambientais, isolados ou associados, foi relacionada ao surgimento da neurodegeneração da DP (CACABELOS, 2017). O fator genético foi sugerido pela primeira vez em 1997 por ocasião da descoberta da mutação no gene de α -sinucleína (SNCA) (POLYMEROPOULOS *et al.*, 1997). Mutações nos genes SNCA, LRRK2 e VPS35 mostraram causar formas autossômicas dominantes de DP, enquanto que mutações em PINK1, DJ-1, Parkin, ATP13A2, FBXO7 e PLA2GB demonstraram causar as formas autossômicas recessivas e/ ou parkinsonismo. Entretanto, as formas monogênicas respondem apenas por 30% dos casos familiares e 3 a 5% dos casos esporádicos da doença

(HERNANDEZ; REED & SINGLETON, 2016). Os genes identificados codificam proteínas que participam principalmente no turnover mitocondrial, autofagia, endocitose, sistema imunológico e / ou função lisossômica (BILLINGSLEY *et al.*, 2018). A maioria dos casos de DP, entretanto, corresponde a formas complexas que resultam da interação de risco genético com a provável influência ambiental (BILLINGSLEY *et al.*, 2018). A exposição a pesticidas como a rotenona, paraquat, maneb, organoclorados, organofosforados e piretróides; metais como o ferro e manganês; policlorobifenilos são os principais fatores ambientais implicados no surgimento da doença (NANDIPATI & LITVAN, 2016).

2.2. MECANISMOS CELULARES E MOLECULARES ENVOLVIDOS NA NEURODEGENERAÇÃO DA DP

Os mecanismos pelos quais o envelhecimento, fatores genéticos e ambientais conduz à degeneração neuronal ainda não é totalmente compreendida. Estudos apontam que vários eventos moleculares e celulares podem estar envolvidos, incluindo agregação de α -sinucleína, excitotoxicidade, neuroinflamação, disfunção mitocondrial, estresse oxidativo e apoptose.

2.2.1. AGREGAÇÃO DE α -SINUCLEÍNA

A α -sinucleína é uma pequena proteína de 140 aminoácidos que se localiza nos terminais pré-sinápticos, isolada pela primeira vez a partir do peixe da espécie *Torpedo californica* em 1988 (MAROTEAUX; CAMPANELLI & SCHELLER, 1988). Mesmo sendo uma das proteínas relacionadas a doenças neurodegenerativas mais estudadas atualmente, suas funções fisiológicas ainda não foram completamente elucidadas. Ela parece modular a exocitose vesicular e endocitose, embora em condições patológicas, ela possa se agregar dentro do corpo da célula (corpos de Lewy) e processos dos neurônios (neuritos de Lewy) (SCHASER *et al.*, 2019).

A relação entre α -sinucleína e DP foi relatada pela primeira vez por POLYMEROPOULOS *et al.* (1997) que identificou uma mutação pontual (Ala53Thr) no gene SNCA em uma grande família com diagnóstico de DP em Contursi, Itália, e em outras 3 famílias gregas com padrão autossômico dominante. Nos anos seguintes, várias outras mutações

pontuais em SNCA associadas ao padrão dominante da DP foram identificados, tais como E46K, H50Q, G51D, A53E, A53V e A30P (SPILLANTINI *et al.*, 1997). Além dessas mutações, a DP familiar autossômica dominante é observada quando o gene SNCA é duplicado ou triplicado (CHARTIER-HARLIN *et al.*, 2004).

A α -sinucleína é usualmente encontrada na forma de monômeros e algumas vezes na forma de tetrâmeros, porém após mutações, ocorrem mudanças distintas na sua conformação para fibrilas e oligômeros e mudanças na taxa de agregação. Por exemplo, E46K, H50Q e as mutações A53T levam a um aumento da taxa de formação de fibrilas, enquanto as mutações G51D, A30P e A53E parecem retardar a taxa de formação de fibrilas. Todas essas mutações, entretanto, levam a um aumento na taxa de agregação (MEADE; FAIRLIE & MASON, 2019). A toxicidade relativa de oligômeros ou fibrilas de α -sinucleína permanece um assunto de intensa discussão. Embora os oligômeros estejam possivelmente implicados no colapso da homeostase neuronal, apenas os conjuntos fibrilares demonstraram se propagar e desencadear sinucleinopatias quando injetados em modelos animais (ALAM *et al.*, 2019).

A agregação de α -sinucleína também pode ocorrer por modificações pós-traducionais (MPT) (acetilação, oxidação, nitratação, ubiquitinação, etc.). No geral, as MPT comprometem a formação de fibrilas, provavelmente pela introdução de novos grupos funcionais na α -sinucleína que são incompatíveis com arranjos fibrilares (ALAM *et al.*, 2019). O envelhecimento é um dos principais fatores de MPT. O envelhecimento não só afeta os processos homeostáticos que protegem contra o envelhecimento das proteínas, como também está associado a um aumento do estresse oxidativo, neuroinflamação e disfunção mitocondrial-lisossomal. Estudo realizado por VAN DEN BERGE *et al.* (2021) que pesquisou o efeito da injeção intragástrica de fibrilas pré-formadas de α -sinucleína em ratos jovens (3 meses de idade), adultos (10-12 meses de idade) e velhos (18 meses), mostrou depósitos de α -sinucleína fosforilada em todo o cérebro 10 semanas após a injeção em ratos adultos e velhos, enquanto que ratos jovens não apresentaram nenhuma patologia no SNC bem definida.

A proteína α -sinucleína é reparada e removida no interior da célula, principalmente através do sistema ubiquitina-proteassoma (SUP), por autofagia mediada por chaperona ou proteases (neurosina, metaloprotease de matriz ou plasmina) (STEFANIS *et al.*, 2019). Sendo assim, qualquer processo que iniba ou diminua a função destes sistemas pode também levar ao emparelhamento incorreto da α -sinucleína e à sua agregação. Os processos mais conhecidos

por prejudicar a degradação proteica são as MPT, mutações gênicas específicas e neurotoxinas. Os estudos genéticos mostram que dois dos genes ligados a PD monogênica codificam proteínas envolvidas na função do SUP, a saber, parkin (E3 ubiquitina ligase) e UCH-L1 (ubiquitina hidrolase c-terminal). O gene parkin é responsável pela expressão de uma E3-ubiquitina ligase e constitui a mutação autossômica recessiva mais comum encontrada no início precoce da DP e está relacionada com aproximadamente 50% e 20% dos casos familiares e idiopáticos, respectivamente (CHIA; TAN & CHAO, 2020). Em relação a neurotoxinas, o pesticida rotenona, um inibidor do CI, é o mais conhecido por induzir agregados de α -sinucleína em modelos animais de DP. O mecanismo para isso não é ainda completamente esclarecido, mas parece envolver distúrbio no processo de autofagia (YUAN *et al.*, 2015).

Existe controvérsia se os agregados de α -sinucleína promovem a toxicidade ou se talvez sejam mecanismos de defesa das células, porém há forte evidência que eles induzem danos às mitocôndrias, aos microtúbulos, induzam vazamento lisossomal e alteram a permeabilidade da membrana, resultando em um aumento do influxo de cálcio do espaço extracelular para o intracelular, levando à morte celular (LASHUEL *et al.*, 2013).

2.2.2. EXCITOTOXICIDADE

O funcionamento adequado do SNC depende do equilíbrio entre as conexões neuronais excitatórias e inibitórias. A maioria dos sinais excitatórios são mediados pelo glutamato, que é aminoácido livre mais abundante no cérebro e o neurotransmissor excitatório rápido mais importante do SNC (FONNUM, 1984; ZHOU. & DANBOLT, 2014). Em condições fisiológicas, ele é o principal mediador da cognição, emoções, informações sensoriais e coordenação motora e está ligado à atividade da maioria dos outros sistemas neurotransmissores (DA, acetilcolina, serotonina, etc.) (IOVINO; TREMBLAY & CIVIERO, 2020). Além disso, o glutamato é o precursor para a síntese do neurotransmissor inibitório ácido gama-aminobutírico (GABA) pela enzima descarboxilase do ácido glutâmico (GAD) (FONNUM, 1984).

O glutamato é liberado pelos neurônios na fenda sináptica onde se liga a receptores específicos localizados na superfície da membrana celular que podem ser os receptores

ionotrópicos (NMDA, AMPA e cainato) ou metabotrópicos (FONNUM, 1984). Enquanto os receptores AMPA e cainato medeiam principalmente o influxo de sódio, os receptores NMDA têm alta condutividade de cálcio. Os receptores AMPA e cainato medeiam a despolarização rápida na maioria das sinapses no cérebro e na medula espinhal, enquanto que os receptores NMDA estão mais intimamente associados à indução de várias formas de plasticidade sináptica (GOODMAN & GILMAN, 2012).

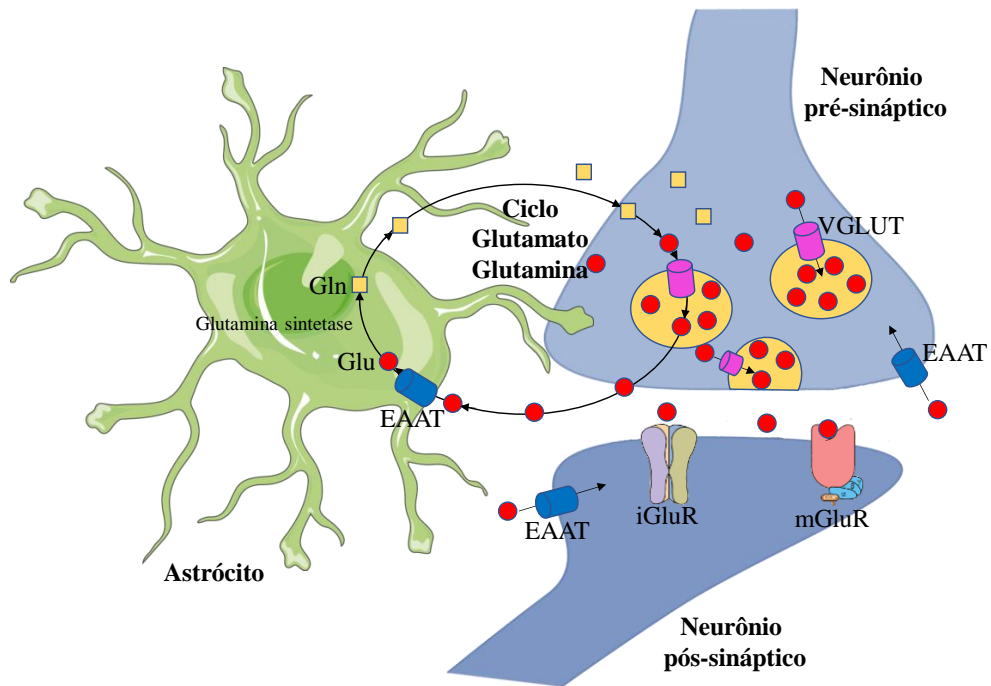
Em condições normais, o glutamato é rapidamente removido da fenda sináptica por transportadores de alta afinidade expressos em neurônios e células gliais. Existem duas classes gerais de transportadores, aqueles que são dependentes de um gradiente eletroquímico de sódio (EAATs) e aqueles que não são (VGLUTs). Em humanos, cinco subtipos de EAATs foram identificados e denominados EAAT1-5 (SLC1A3, SLC1A2, SLC1A1, SLC1A6, SLC1A7). Uma vez absorvido pelos astrócitos pelos EAATs, o glutamato reage com amônia para formar glutamina através da atividade da glutamina sintetase. A glutamina é então exportada para o meio extracelular, onde é absorvida pelos neurônios pré-sinápticos, iniciando o processo de síntese do glutamato novamente. Em seguida, o glutamato é absorvido em vesículas sinápticas pela ação dos VGLUTs. Este ciclo é chamado de ciclo glutamato-glutamina e garante manutenção de um suprimento adequado de glutamato (Figura 1) (IOVINO; TREMBLAY & CIVIERO, 2020).

A manutenção dos níveis extracelulares de glutamato é crucial para o correto funcionamento da transmissão sináptica (IOVINO; TREMBLAY & CIVIERO, 2020). Tanto o excesso quanto a escassez de glutamato são prejudiciais. A ativação excessiva dos receptores de glutamato pode excitar as células nervosas até a morte em um processo conhecido como “excitotoxicidade” (ZHOU & DANBOLT, 2014). Essa condição tem sido relacionada aos processos fisiopatológicos de muitas doenças neurológicas e neurodegenerativas como a DP.

O estriado recebe projeções glutamatérgicas do córtex cerebral e dopaminérgicas da SNpc e os neurônios que o compõe são divididos em duas subpopulações: os neurônios estriatonigrais que estão conectados à substância nigra pars reticulata (SNpr) e os neurônios estriatopálidais que se projetam para neurônios do globo pálido interno (GPi) diretamente (via direta) ou se comunica com o globo pálido externo (GPe) e com o núcleo subtalâmico (NST) por meio da liberação de glutamato (via indireta). Além disso, existe uma conexão glutamatérgica direta entre o NST e o SNpc. Tanto as vias direta e indireta, quanto a via do GPe

para NST são GABAérgicas, e, portanto, inibitórias (Figura 2A) (BLANDINI; PORTER & GREENAMYRE, 1996).

Figura 1. Ciclo Glutamato Glutamina



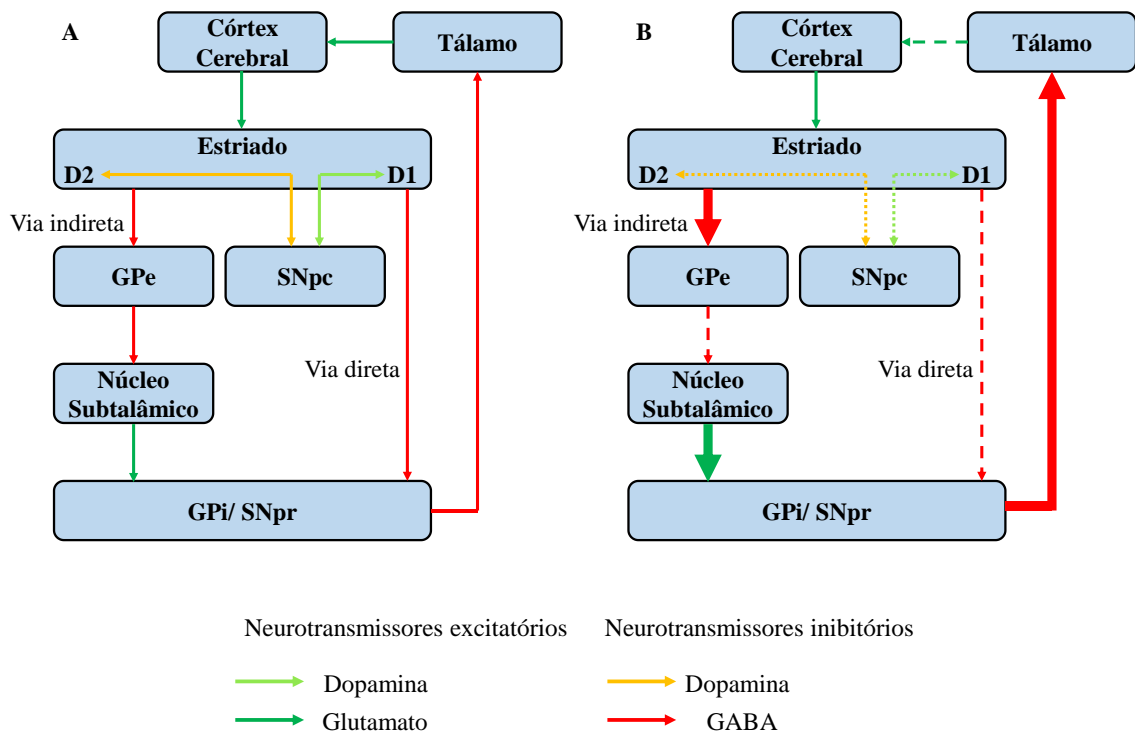
Glu- Glutamato, Gln- Glutamina, iGluR- receptores ionotrópicos (NMDA, AMPA e cainato), mGluR- receptores metabotrópicos, EAAT- transportador de glutamato, VGLUT- transportador vesicular de glutamato. Fonte: Elaborado pelo autor.

Após a degeneração nigroestriatal, neurônios gabaérgicos estriatal projetando-se diretamente para o globo pálido e SNpr tornam-se subativos. A redução de projeções glutamatérgicas do GPe para o NST leva à hiperatividade do NST que, por meio de suas projeções glutamatérgicas, superestimula GPi e SNpr. Como resultado da hiperatividade das projeções GABAérgicas do GPi e SNpr, os neurônios do tálamo ventrolateral que se projetam para o córtex tornam-se subativos (Figura 2B). Acredita-se que esta redução no fluxo do tálamo motor para o córtex motor seja a base muitas das manifestações clínicas da DP (BLANDINI; PORTER & GREENAMYRE, 1996).

Além disso, acredita-se que o acúmulo de glutamato na sinapse desencadeia a morte celular devido à sobrecarga de Ca^{2+} após a superestimulação dos receptores de glutamato. Consequentemente, o receptor NMDA, sendo altamente permeável ao cálcio, é considerado o

principal receptor associado à neurodegeneração da DP (IOVINO; TREMBLAY & CIVIERO, 2020). O aumento do Ca^{2+} citoplasmático, além de aumentar a liberação de glutamato, ativa uma série de enzimas dependentes de cálcio, incluindo proteína quinase C, fosfolipase A2, fosfolipase C, proteínas quinase dependentes de Ca^{2+} , óxido nítrico sintase, e várias proteases e nucleases, as quais podem conduzir à apoptose celular por diferentes vias (BLANDINI; PORTER & GREENAMYRE, 1996).

Figura 2. Diagramas resumidos do circuito de modulação motora normal e na DP



Modulação motora normal (A) e na DP (B). GPe- Globo pálido externo, SNpc- Substância nigra pars compacta, GPi- Globo pálido interno, SNpr- Substância nigra pars reticulata. Fonte: Elaborado pelo autor.

A contribuição relativa de cada uma dessas vias ainda não é totalmente compreendida. Por exemplo, a ativação da fosfolipase A2 e subsequente produção de ácido araquidônico parece aumentar a produção de radicais livres, o qual também está relacionado com a inflamação. A ativação da enzima óxido nítrico sintase causa a liberação de óxido nítrico, que em excesso forma peroxinitrito (ONOO^-) que é letal para neurônios e a ativação de proteases parece determinar mudanças na organização microtubular do citoesqueleto (BLANDINI; PORTER & GREENAMYRE, 1996). Além disso, o aumento do Ca^{2+} intracelular causa

toxicidade nos neurônios, agindo nas próprias mitocôndrias. O influxo de Ca^{2+} leva à despolarização do potencial da membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) e alterações na síntese de ATP, bem como a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) (KEANE *et al.*, 2011).

2.2.3. NEUROINFLAMAÇÃO

A neuroinflamação pode ser definida como um processo de inflamação que ocorre no SNC devido a moléculas liberadas por células imunes residentes no cérebro e / ou derivadas do sangue (TRONCOSO-ESCUADERO *et al.*, 2018). Recentemente, foi postulado que ela desempenha um papel crucial na patogênese da DP, mas se os processos neuroinflamatórios são uma causa ou consequência da degeneração neuronal permanece sem resposta (GELDERS; BAEKELANDT & VAN DER PERREN, 2018).

Numerosos estudos de imagem, *post mortem*, epidemiológicos e em animais evidenciaram o envolvimento da inflamação na neurodegeneração. MCGEER *et al.* (1988) relataram a presença de micróglia reativa positiva para o antígeno leucocitário humano (HLA), um receptor de superfície celular MHC classe II, na SNpc de pacientes com DP. GARCÍA-DOMÍNGUEZ *et al.* (2018) mostrou que a inflamação periférica induzida por lipopolissacarídeo (LPS) e o 1-metil-4-fenil-1,2,3,6 tetrahidropiridina (MPTP), duas toxinas potentes, agem sinergicamente para aumentar a resposta inflamatória central, a ruptura da barreira hematoencefálica (BHE) e o aparecimento de micróglia expressando galectina-3, recentemente identificada como um marcador de micróglia associada à doença. Outro estudo mostrou que o uso regular de anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) pode diminuir o risco de DP entre portadores da variante LRRK2 (SAN LUCIANO *et al.*, 2020).

A neuroinflamação é mediada principalmente por micróglia ativada (TRONCOSO-ESCUADERO *et al.*, 2018). A micróglia é um tipo celular do sistema imune inato cerebral com fundamental importância na homeostase do SNC. Essas células são mantidas em estado quiescente na ausência de qualquer estímulo, o que é obtido por um microambiente imunossupressor presente no SNC (TRONCOSO-ESCUADERO *et al.*, 2018). Elas representam a primeira linha de defesa do cérebro e reagem a patógenos (padrões moleculares associados a patógenos ou PAMPS), a danos teciduais (padrões moleculares associados a danos ou DAMPS)

e neurotoxinas aumentando a expressão de receptores do tipo Toll (TLR) (GELDERS; BAEKELANDT & VAN DER PERREN, 2018). Além de suas funções imunológicas, a micróglia desempenha outras funções benéficas para os neurônios, como liberação de fatores neurotróficos (FNs), remoção de substâncias tóxicas, reparo neuronal, remodelação sináptica e poda sináptica (TRONCOSO-ESCUADERO *et al.*, 2018).

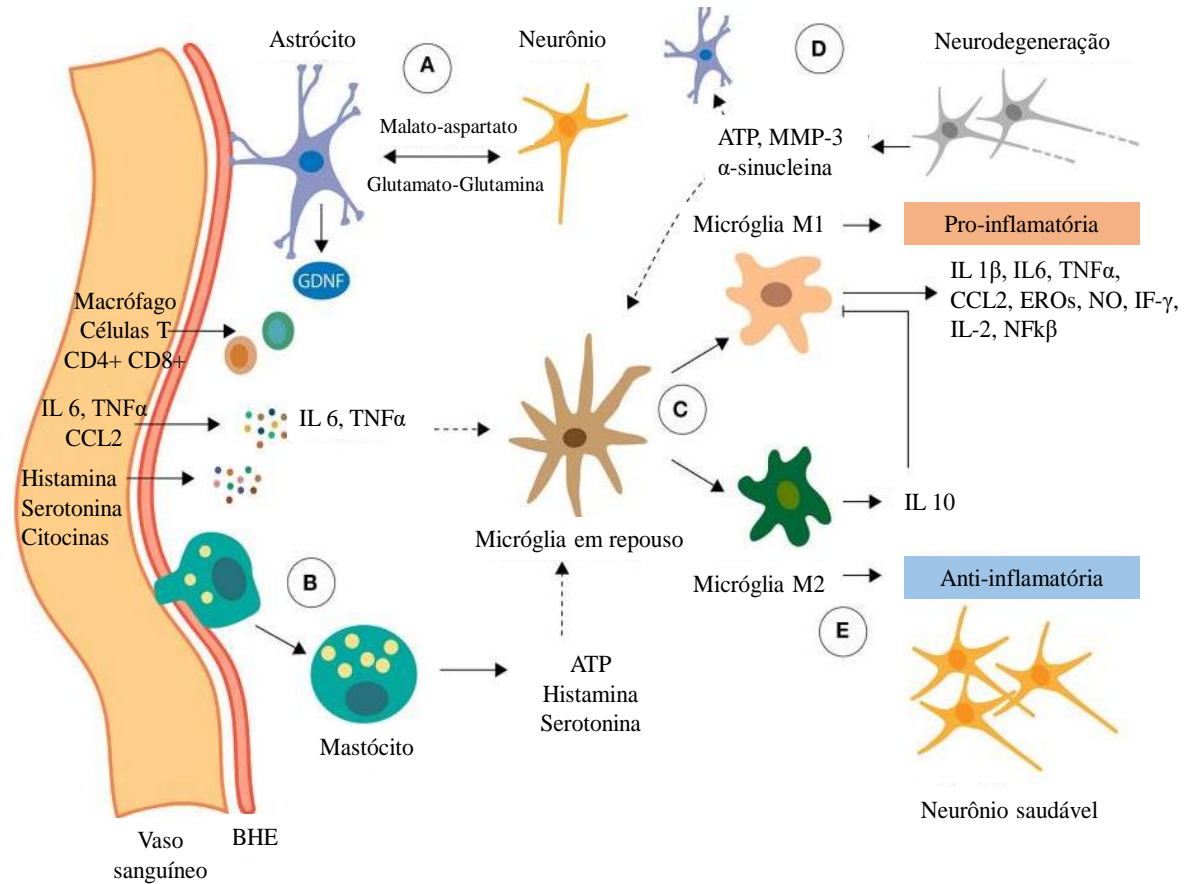
Quando a micróglia é ativada, ela transforma-se em micróglia reativa, amebóide, que se diferencia em dois fenótipos distintos: o fenótipo M1 (pró-inflamatório) e o fenótipo M2 (anti-inflamatório) (TRONCOSO-ESCUADERO *et al.*, 2018). A micróglia M1 reativa libera citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL1 β , IL-2, IL-4 e IL-6, IFN- γ , NF- κ B) que atuam no endotélio da BHE, causando aumento da sua permeabilidade e estimulando a expressão de moléculas de adesão e quimiocinas que recrutam células mononucleares do sangue periférico (PBMC), como células dendríticas, monócitos e linfócitos e os mastócitos com o objetivo de restaurar a homeostase do tecido (GELDERS; BAEKELANDT & VAN DER PERREN, 2018; HARMS *et al.*, 2018). Além disso, a micróglia M1 reativa é conhecida por participar na produção de EROS, espécies reativas de nitrogênio (ERNs) e prostaglandinas durante o processo neurodegenerativo (TANSEY & GOLDBERG, 2010). A micróglia M2, por sua vez, desregula as funções da micróglia M1 pela liberação de citocinas IL-10 que contribuem para o processo anti-inflamatório do SNC (Figura 3) (TRONCOSO-ESCUADERO *et al.*, 2018).

O desequilíbrio entre sinais pró e anti-inflamatórios pode favorecer um processo inflamatório crônico, com hiperativação da micróglia que participa no processo neurodegenerativo. Os estímulos que levam a hiperativação e a desregulação da micróglia podem ser diversos, variando de toxinas ambientais, como o pesticida rotenona, à morte ou dano neuronal. Além disso, neurônios em degeneração liberam vários fatores, tais como metaloproteinase de matriz 3 (MMP3), α -sinucleína e neuromelanina que parecem também ativar a micróglia formando um ciclo neuroinflamatório que se retroalimenta durante a neurodegeneração neuronal (BLOCK; ZECCA & HONG, 2007).

Além da micróglia, os astrócitos também participam da neuropatologia da DP. Os astrócitos são as células gliais mais abundantes no SNC, participam da manutenção e permeabilidade da BHE e são os principais reguladores da atividade neuronal e do fluxo sanguíneo cerebral. Além disso, os astrócitos secretam FNs, fatores antioxidantes, fornecem equilíbrio iônico extracelular, regula a recaptação de glutamato e fornece suporte bioquímico e

nutricional aos neurônios através dos sistemas de transporte malato-aspartato e glutamato-glutamina (TRONCOSO-ESCUADERO *et al.*, 2018).

Figura 3. O papel da neuroinflamação no processo neurodegenerativo



Moléculas pró-inflamatórias podem atingir o SNC da periferia atravessando a BHE. (A) Os astrócitos, as células mais abundantes no SNC, estão funcionalmente conectados com a BHE, recebendo sinais da periferia e de dentro do SNC. Além disso, os astrócitos suportam metabolicamente os neurônios através dos sistemas de transporte malato-aspartato e glutamato-glutamina. (B) Os mastócitos podem se infiltrar no SNC, induzindo alterações na micróglia através de efetores pró-inflamatórios, incluindo ATP, que estimula a transcrição de citocinas pró-inflamatórias por meio da PKC. (C) A micróglia em repouso pode ser ativada em dois fenótipos clássicos, M1 e M2, dependendo dos sinais efetores de seu microambiente. (D) Na presença de LPS e IFN- γ , as células da micróglia se polarizam para o fenótipo M1 e secretam as citocinas pró-inflamatórias que contribuem para a disfunção dos neurônios dopaminérgicos (neurodegeneração). Além disso, neurônios em degeneração liberam α -sinucleína, ATP, MMP-3, entre outras moléculas, em uma sinalização cruzada com astrócitos e micróglia, aumentando o processo neuroinflamatório. (E) IL 4 e IL 13, por outro lado, induzem a ativação da micróglia para o fenótipo M2 que regula negativamente as funções de M1 pela liberação de IL 10 que contribuem para a ação antiinflamatória do SNC. Fonte: Adaptado de TRONCOSO-ESCUADERO *et al.*, (2018).

Em situações patológicas, os astrócitos são ativados, condição chamada de astrogliose reativa, cujo papel ainda é controverso. Recentemente, foi demonstrado que os astrócitos se diferenciam em dois tipos, A1 e A2. Os astrócitos A1 regulam positivamente muitos genes

tóxicos, sugerindo que podem ser prejudiciais, enquanto os astrócitos A2 regulam positivamente muitos FNs, sugerindo que são neuroprotetores. Acredita-se que os astrócitos A1 neurotóxicos possam ser induzidos por micróglia ativada e regulam positivamente fatores pró-inflamatórios, como IL-1 α , IL-1 β e TNF- α . Esses fatores, por sua vez, inibem a captação de glutamato em astrócitos levando à toxicidade do glutamato e neuroinflamação. Além disso, o prejuízo na comunicação dos astrócitos com o endotélio como consequência da sua ativação pode estar envolvido no aumento da permeabilidade da BHE observada no cérebro em neurodegeneração (MIYAZAKI & ASANUMA, 2020).

2.2.4. ESTRESSE OXIDATIVO

O termo estresse oxidativo foi criado em 1985 por Helmut Sies e define uma condição em que os níveis de EROs superam significativamente a capacidade das defesas antioxidantes, levando a danos potenciais em um sistema biológico (LI; JIA & TRUSH, 2016).

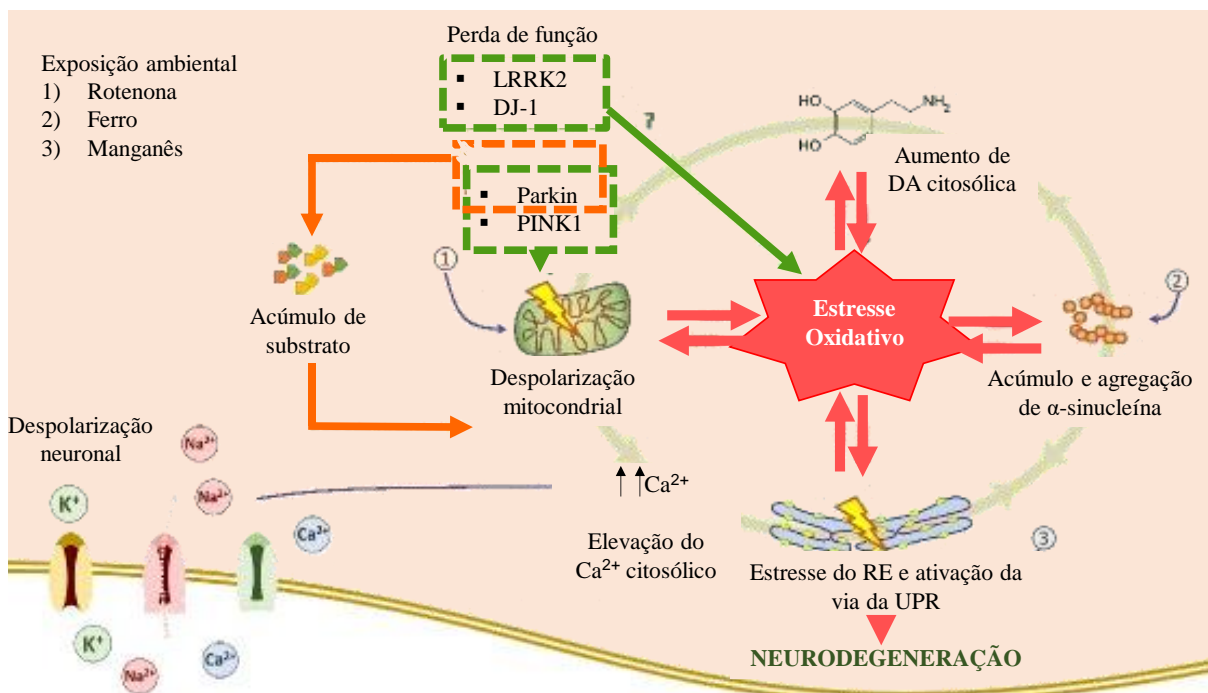
O envolvimento do estresse oxidativo na patogênese da DP foi sugerido pela primeira vez depois que indivíduos desenvolveram parkinsonismo após consumiram heroína contaminada com MPTP em 1982 que hoje sabe-se que inibe o CI da cadeia de transporte de elétrons (CTE) (WILLIAM LANGSTON *et al.*, 1983). Estudos do sangue de pacientes com DP mostraram níveis significativamente mais altos de marcadores de estresse oxidativo em comparação com indivíduos saudáveis para ferritina, 8-hidroxi-2-deoxiguanosina (8-OhdG), nitrito e malondialdeído (MDA). Em contraste, as concentrações de enzimas antioxidantes foram significativamente menores em pacientes com DP em comparação com indivíduos saudáveis (WEI *et al.*, 2018). A ligação entre o estresse oxidativo e a patogênese da DP é ainda apoiada por modelos animais induzidos por neurotoxinas que causam a produção de EROs e a perda progressiva de neurônios dopaminérgicos (NANDIPATI & LITVAN, 2016).

Acredita-se que o estresse oxidativo seja o responsável pela disfunção gradual da doença e seja resultado de depósitos de α -sinucleína, de mitocôndrias e retículo endoplasmático (RE) disfuncionais e níveis elevados de DA citosólica (Figura 4) (PUSPITA; CHUNG & SHIM, 2017). Entretanto, ainda é difícil determinar se o estresse oxidativo leva ou é uma consequência desses eventos ou ambos (JENNER, 2003).

2.2.4.1. AGREGADOS DE α -SINUCLEÍNA

O mecanismo pelo qual os agregados de α -sinucleína induzem o estresse oxidativo e a morte neuronal ainda não é totalmente compreendido. DEAS *et al.* (2016) sugere que tanto as formas oligoméricas e fibrilares são capazes de gerar a produção de radicais livres, mas apenas a forma oligomérica resulta na redução de enzimas antioxidantes e subsequente toxicidade neuronal. O mesmo estudo mostra que isso ocorre de forma independente dos principais sistemas enzimáticos de produção de EROs celulares e é inteiramente dependente da presença de íons metálicos livres. Outra postulação é que a agregação de α -sinucleína conduza a morte celular por peroxidação lipídica e por sobrecarga de cálcio que induz abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (mPTP) culminando com apoptose celular (ANGELOVA *et al.*, 2015; ZAKHAROV *et al.*, 2007).

Figura 4. Papel central do estresse oxidativo crônico na progressão da DP



A despolarização mitocondrial, o estresse do RE, o acúmulo de α -sinucleína e o aumento de DA citosólica são características comuns da DP que potencialmente contribuem para o estresse oxidativo celular, sozinhos ou interagindo entre si. Fonte: Adaptado de PUSPITA; CHUNG & SHIM (2017).

2.2.4.2. DISFUNÇÃO MITOCONDRIAL

As mitocôndrias são organelas vitais encontradas em todas as células eucarióticas e funcionam para gerar energia celular na forma de ATP por fosforilação oxidativa. Elas também estão envolvidas na regulação da morte celular por meio de apoptose, homeostase de cálcio, biossíntese de heme, formação e exportação de aglomerados de ferro-enxofre (Fe-S) e controle da divisão e crescimento celular (KEANE *et al.*, 2011).

Estruturalmente, as mitocôndrias são compostas por uma dupla camada lipídica, a membrana mitocondrial externa (MME) e a membrana mitocondrial interna (MMI) que são separadas por um espaço contendo proteínas associadas à apoptose (caspases 2, 3, 8 e 9, a Smac/DIABLO, a HtrA2/Omi, a AIF, a Endo G, e o citocromo c). A MME envolve toda a organela e tem uma proporção de proteínas e de fosfolípidos semelhante ao da membrana plasmática eucariótica. Na MMI, por sua vez, encontra-se proteínas transportadoras e a CTE composta por cinco complexos (CI-CIV e ATP sintase) com objetivo de criar um gradiente de prótons para produção de energia na forma de ATP (PUSPITA; CHUNG & SHIM, 2017).

O fornecimento de energia por fosforilação oxidativa é provavelmente a característica mais marcante das mitocôndrias. Durante o processo de fosforilação oxidativa, os elétrons podem vazar da CTE, principalmente do CI e CIII, e reagir com o oxigênio molecular para formar superóxido ($O_2^{\bullet-}$), uma das principais EROs. Em condições fisiológicas, essa produção ocorre em níveis relativamente baixos e é removida por antioxidantes. Os antioxidantes podem ser endógenos (enzimáticos ou não) e exógenos. As principais enzimas antioxidantes são a enzima superóxido dismutase (SOD), catalase e a glutatona peroxidase (GSH-Px). A SOD catalisa a conversão de $O_2^{\bullet-}$ em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e então H_2O_2 é convertido em água e oxigênio pela catalase e GSH-Px (LIGUORI *et al.*, 2018; PISOSCHI & POP, 2015).

Os antioxidantes não enzimáticos são moléculas que interagem com EROs e encerram as reações em cadeia dos radicais livres, dentre as quais se destacam o ácido úrico, tióis, bilirrubina, melatonina, metaloproteínas, coenzima Q reduzida, ácido alfa-lipóico, selênio e a prolina (LIANG *et al.*, 2013; PISOSCHI & POP, 2015). As moléculas antioxidantes exógenas, por sua vez, são diversas e abrangem o ácido ascórbico, vitamina E, carotenoides, compostos

fenólicos (resveratrol e ácido gálico), flavonoides, lecitinas, acetilcisteína, selênio exógeno, zinco, dentre outras (PISOSCHI & POP, 2015).

Pensa-se que a disfunção na CTE ou nos mecanismos antioxidantes conduzindo ao aumento da produção de EROs e como consequência, ao estresse oxidativo, pode ser um dos principais responsáveis pela morte celular na DP (KEANE *et al.*, 2011). A primeira linha de evidência para uma ligação entre a disfunção mitocondrial e a DP veio da descrição da deficiência de CI no SNpc *post-mortem* de pacientes com DP (SCHAPIRA *et al.*, 1990). Além disso, mutações em várias proteínas mitocondriais foram associadas a formas familiares de DP, dentre elas, as mutações SNCA, Parkin, PINK1, DJ-1 e LRRK2 (PUSPITA; CHUNG & SHIM, 2017). Destas mutações, a SNCA no gene que codifica a α -sinucleína é a mais comumente associada à patogênese da DP e parece induzir dano oxidativo e liberação mitocondrial de citocromo c (HENCHCLIFFE & BEAL, 2008). PINK1 fosforila a Parkin em Ser65, a qual modifica proteínas na membrana mitocondrial adicionando cadeias de ubiquitina que funcionam como sinais para autofagia e a perda da função dessas proteínas leva ao acúmulo de mitocôndrias danificadas (PUSPITA; CHUNG & SHIM, 2017). DJ-1 está envolvido em muitas funções celulares, entre elas como um sensor de estresse oxidativo e como uma proteína chaperona redox. A função fisiológica de LRRK2, por sua vez, é menos compreendida, mas as mutações nesse gene representam a causa conhecida mais comum de DP familiar e podem explicar os casos de DP esporádica de início tardio (HENCHCLIFFE & BEAL, 2008). Além disso, os neurônios com mutações nesta proteína exibem maior vulnerabilidade às toxinas mitocondriais (PUSPITA; CHUNG & SHIM, 2017).

A disfunção mitocondrial pode sujeitar as células ao estresse oxidativo que juntos afetam diversos processos celulares. O aumento do estresse oxidativo pode levar ao comprometimento da função do SUP levando ao acúmulo de proteínas mal enoveladas ou danificadas, distúrbio da homeostase intracelular de cálcio e do limite de excitotoxicidade que pode diminuir se a produção de ATP mitocondrial for prejudicada. Além disso, a disfunção mitocondrial resulta em despolarização do $\Delta\Psi_m$ que leva à liberação mitocondrial de fatores pró-apoptóticos no citoplasma que desencadeiam uma cascata de eventos, culminando na morte celular (HENCHCLIFFE & BEAL, 2008).

2.2.4.3. ESTRESSE DO RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO

O estresse oxidativo pode também estar associado ao estresse do RE. Esta organela além de regular a síntese, dobramento e tráfego de proteínas, é responsável pela homeostase de cálcio e síntese de lipídeos (RAO; ELLERBY & BREDESEN, 2004). Segundo MOU *et al.* (2020), fatores genéticos e ambientais relacionados à DP poderiam iniciar a ativação do estresse do RE e desencadear vazamento de cálcio, inflamação, acúmulo de proteínas mal enoveladas e defeitos de autofagia. Essas alterações poderiam afetar significativamente as mitocôndrias e desencadear estresse oxidativo (PUSPITA; CHUNG & SHIM, 2017).

O vazamento de cálcio do RE para o citosol pode desencadear o acúmulo de cálcio na matriz mitocondrial e como consequência, a permeabilização da membrana mitocondrial. Além disso, o aumento de cálcio nas mitocôndrias leva à estimulação da CTE e pode exacerbar a formação de EROs, vazamento de GSH da matriz e induzir a ativação de vias apoptóticas (DENIAUD *et al.*, 2008).

A resposta do RE diante do acúmulo de proteínas mal enoveladas, por sua vez, inicia a sinalização da via da resposta a proteínas mal enoveladas (UPR), um mecanismo adaptativo importante que pode contribuir para o estresse oxidativo. Como consequência da ativação da UPR, três vias apoptóticas podem ser ativadas, a via PERK-eIF2 α -ATF4-CHOP, a via IRE1 α -XBP1 e a via ATF6 que normalmente são mantidas inativadas pela presença de uma proteína chaperona, BiP (do inglês Binding Protein) em seus domínios luminais. A via PERK-eIF2 α -ATF4-CHOP é a principal dentre elas na indução de estresse oxidativo, considerando que a proteína CHOP ativa ERO1A que regula o fluxo de cálcio mitocondrial, induz a subunidade Nox2 da NADPH oxidase e apoptose (CAO & KAUFMAN, 2014).

Além disso, o mal dobramento de proteínas no RE é uma fonte importante de EROs através da formação da ligação dissulfeto. Durante o dobramento oxidativo de proteínas no RE, os grupos tiol nas cisteínas dos peptídeos substrato são oxidados e formam ligações dissulfeto com a geração de H₂O₂ como um subproduto. Em um RE estressado, a formação e quebra desregulada da ligação dissulfeto, portanto, resulta em aumento de produção de H₂O₂ e estresse oxidativo (CAO & KAUFMAN, 2014).

2.2.4.4. AUMENTO DE DOPAMINA INTRACELULAR

A presença de neuromelanina em células dopaminérgicas atraiu a atenção para aumento de DA intracelular como um dos processos responsáveis pelo alto nível basal de estresse oxidativo na substância nigra (JENNER, 2003) O aumento de DA intracelular é resultado da disfunção dos neurônios em estágios iniciais da DP. Esse processo tem como consequência o aumento de seu metabolismo que pode levar à produção de EROs. A síntese de DA envolve várias reações enzimáticas iniciando com a TH que catalisa a hidroxilação do aminoácido L-tirosina no anel fenol para produzir em L-3,4-di-hidroxfenilalanina (L-DOPA) (Figura 5). Em seguida, a enzima DOPA-descarboxilase converte L-DOPA em DA que é armazenada em vesículas por VMAT2 a fim de protegê-la contra a oxidação no citoplasma. Após a liberação de DA nas fendas pós-sinápticas, ela pode ser transportada de volta para as vesículas de armazenamento ou ser degradada por monoamina oxidase (MAO-B). O metabolismo pela MAO-B leva à produção de 3,4-dihidroxfenilacetaldeído (DOPAL) e H₂O₂, dois agentes oxidantes potentes (Figura 5) (HERRERA *et al.*, 2017; PUSPITA; CHUNG & SHIM, 2017).

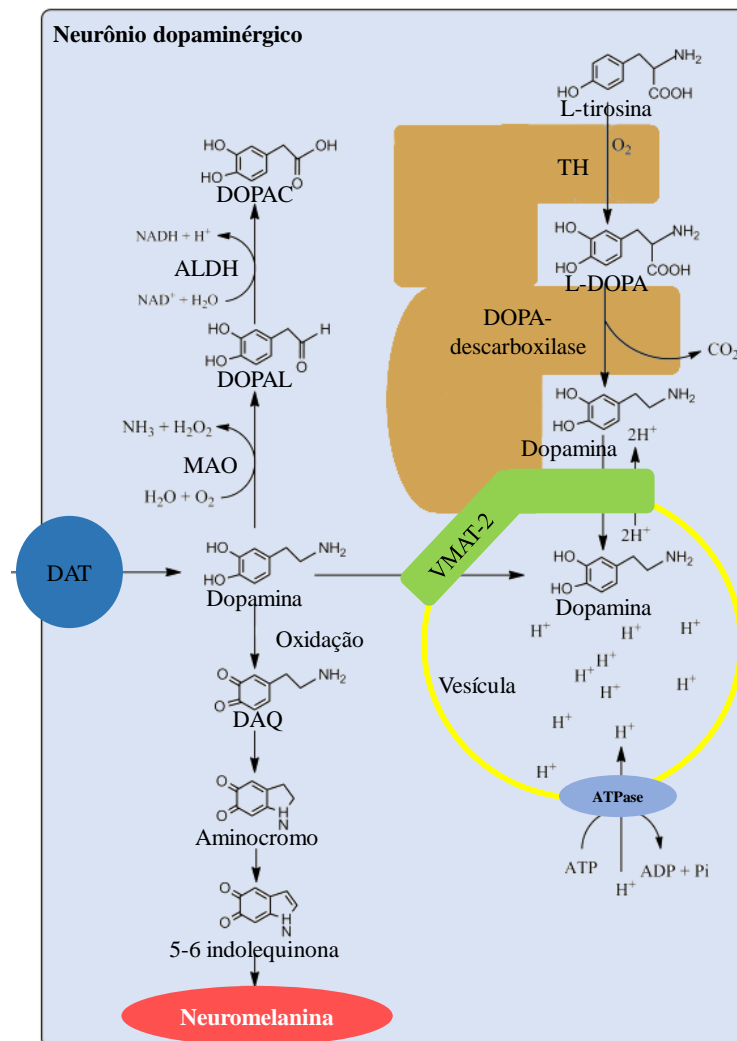
Neste contexto, o papel do DOPAL é de particular interesse. Este catabólito apresenta uma porção aldeído que o leva a reagir com os grupos amino das proteínas, e uma porção catecol, que pode ser oxidada a quinona e levar à polimerização. Em neurônios saudáveis, o DOPAL é efetivamente desintoxicado pela aldeído desidrogenase (ALDH), que converte o DOPAL em ácido 3,4-dihidroxfenilacético (DOPAC) (PLOTTEGHER *et al.*, 2017).

A injeção de DOPAL na região intranigral de cérebros de camundongos mostrou aumentar a formação de oligômeros de α -sinucleína e inibir a formação de fibrilas (FOLLMER *et al.*, 2015). Os oligômeros de α -sinucleína modificados por DOPAL criam uma estrutura semelhante a poros na membrana da vesícula sináptica, causando vazamento de DA para o citosol. A DA citosólica, por sua vez, pode ser oxidada a DA orto-quinona (DAQ), a qual reage com resíduos de cisteína de proteínas mitocondriais resultando em despolarização mitocondrial e posterior produção de EROs (PUSPITA; CHUNG & SHIM, 2017).

A DAQ é completamente instável em pH fisiológico e cicliza imediatamente em aminocromo, precursor da neuromelanina característica de neurônios nigrais. Em indivíduos saudáveis, a oxidação da DA em neuromelanina é uma via fisiológica devido à existência de

duas enzimas, a DT-diaforase e glutationa transferase M-2 (GSTM2), que são capazes de prevenir a neurotoxicidade do aminocromo. Porém, em indivíduos com DP, devido à disfunção celular, o aminocromo torna-se neurotóxico resultando em disfunção mitocondrial, estresse do RE, formação de oligômeros de α -sinucleína neurotóxicos, disfunção do proteassoma, autofagia e do lisossoma, neuroinflamação, ruptura da arquitetura do citoesqueleto e estresse oxidativo (SEGURA-AGUILAR, 2019).

Figura 5. Oxidação de dopamina à neuromelanina



DOPAC- 3,4-dihidroxi-fenilacético, ALDH- Aldeído desidrogenase, DOPAL- 3,4-dihidroxi-fenilacetaldeído, DAQ- Dopamina orto-quinona, TH- Tiosina Hidroxilase, VMAT-2- transportador vesicular de monoamina 2, ATPase- adenosinatrifosfases, DAT- Transportador de dopamina. Fonte: Adaptado de HERRERA *et al.* (2017).

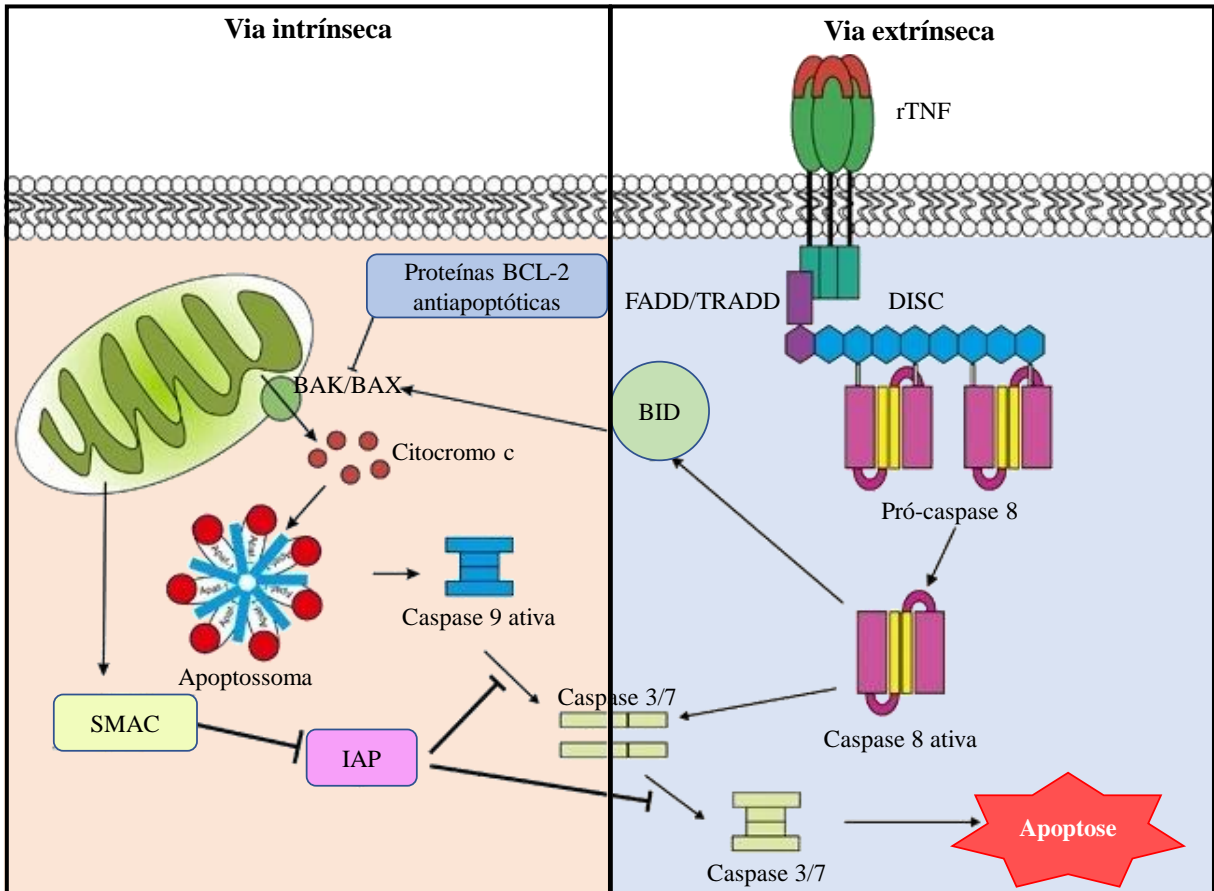
2.2.5. APOPTOSE

A apoptose pode ser definida como a forma mais comum e mais bem descrita de morte celular programada. Ela ocorre fisiologicamente durante o desenvolvimento e maturação, e é essencial para a formação do sistema nervoso e desenvolvimento normal de circuitos cerebrais, embora a desregulação desta via possa contribuir para a neurodegeneração. As características morfológicas típicas das células em apoptose incluem encolhimento da célula, formação de bolhas na membrana, compartimentação, condensação da cromatina, formação de corpos apoptóticos e fragmentação de DNA. Durante esse processo, a membrana celular mantém sua integridade (STOKER & GREENLAND, 2018; VENDEROVA & PARK, 2012).

A apoptose é apontada como o principal mecanismo de morte neuronal na DP conforme evidenciado pela identificação de fragmentação de DNA e alterações apoptóticas da cromatina em neurônios dopaminérgicos de pacientes com DP em estudos *post mortem* (TOMPKINS *et al.*, 1997). A apoptose pode ser iniciada por uma série de estímulos na DP, incluindo estresse oxidativo, agregação de proteínas, excitotoxicidade ou processos inflamatórios (PUSPITA; CHUNG & SHIM, 2017). Esses estímulos, por sua vez, podem conduzir à apoptose por duas vias bem caracterizadas: a via mediada pela mitocôndria (intrínseca) e a via dos receptores de morte celular (extrínseca) (Figura 6) (FOX & MACFARLANE, 2016).

No caso da via extrínseca, a apoptose é desencadeada pela ativação de receptores homotrímeros pertencentes à superfamília dos receptores de necrose tumoral (rTNF) especializados da superfície da célula que incluem o receptor 1 do fator de necrose tumoral (TNFR1), Fas, receptores DR3, DR6 e TRAIL. Esses receptores são compostos por um domínio extracelular rico em cisteína, que se associa ao ligante; um domínio transmembrana; e um "domínio de morte" intracelular. Quando ativados, eles mudam de conformação e recrutam proteínas adaptadoras intracelulares (FADD, no caso da ligação Fas, e TRADD no caso da ligação TNF) que, uma vez recrutadas se ligam à pró-caspase 8 (ou pró-caspase 10) formando o complexo de sinalização indutor de morte (DISC). Como resultado, a caspase 8 é ativada, o que desencadeia a apoptose (VENDEROVA & PARK, 2012).

Figura 6. Via intrínseca e extrínseca da apoptose



BAK, BAX, BID- proteínas pró-apoptóticas pertencentes à família Bcl-2; SMAC, citocromo c- proteínas mitocondriais pró-apoptóticas, IAP- Proteínas Inibidoras de Apoptose, rTNF- receptores de necrose tumoral, FADD- proteína associada a Fas com domínio de morte, TRADD- proteína associada a TNF com domínio de morte; DISC- Complexo de Sinalização Indutor de Morte. Fonte: Adaptado de FOX & MACFARLANE, (2016).

Embora haja alguma sugestão de que a via apoptótica extrínseca pode estar ativa na DP, seu papel permanece obscuro. Acredita-se que o mecanismo predominante de morte neuronal seja a via apoptótica intrínseca (STOKER & GREENLAND, 2018). A via intrínseca é ativada pela maioria dos estressores celulares conhecidos, como danos ao DNA, EROs ou supressão de fatores tróficos (VENDEROVA & PARK, 2012). Esses estímulos levam à perda do $\Delta\Psi_m$ como resultado da formação do mPTP e à liberação de proteínas pró-apoptóticas no citosol, como o citocromo c, fator indutor de apoptose (AIF), endonuclease G (endoG) e Smac/DIABLO. Uma vez no citosol, o citocromo c forma um complexo com o fator de ativação de protease associada à apoptose 1 (APAF-1) e a procaspase-9, denominado apoptossoma. Isso resulta na autoativação da caspase-9, que por sua vez ativa as caspases 3 e 7 executoras. O papel do endoG na morte celular ainda não está claro, enquanto o AIF pode se ligar diretamente ao DNA, causando condensação da cromatina e fragmentação do DNA devido sua atividade DNase. A

proteína Smac/DIABLO, por sua vez, promove a apoptose ao inibir a atividade de proteínas inibidoras de apoptose (IAP) (REDZA-DUTORDOIR & AVERILL-BATES, 2016). A via intrínseca é regulada pelas proteínas da família Bcl-2 que incluem proteínas pró-apoptóticas (Bcl-10, Bax, Bak, Bid, Bad, Bim, Bik e Blke) e anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-x, Bcl-XL, Bcl-XS, Bcl-w e BAG), as quais garantem a manutenção de um equilíbrio entre proliferação e morte celular programada (STOKER & GREENLAND, 2018).

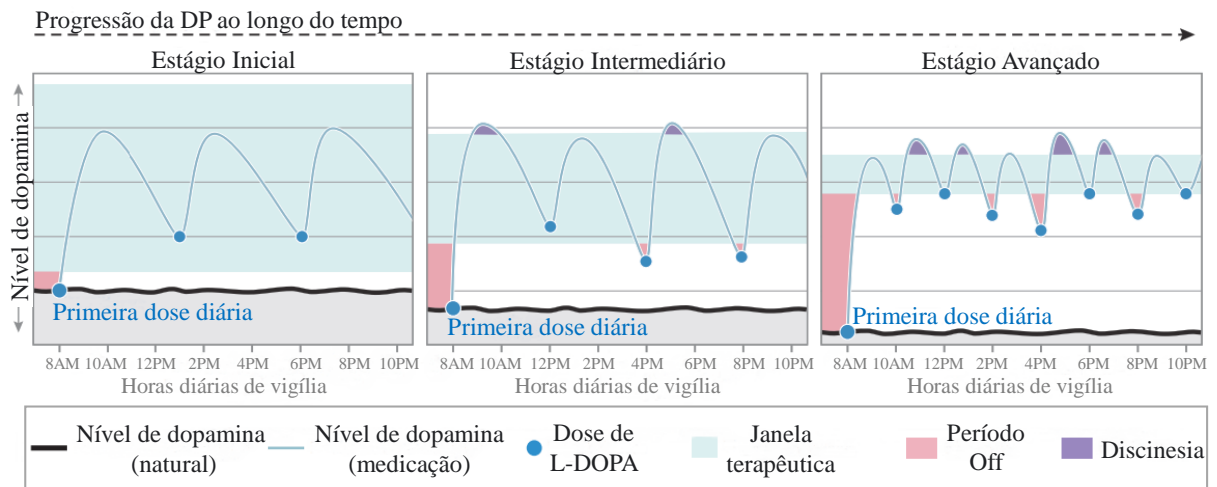
2.3. TRATAMENTO DA DOENÇA DE PARKINSON

O tratamento dos sintomas motores da DP consiste em farmacoterapia - L-DOPA, agonistas da DA (ADs), inibidores da MAO-B, inibidores da catecol o-metiltransferase (COMT), antagonistas dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA e anticolinérgicos, estimulação cerebral profunda (ECP) e terapia reabilitativa (OERTEL & SCHULZ, 2016).

O tratamento mais eficaz tem sido a associação de L-DOPA com inibidor de descarboxilase (DDC) e é indicado em todas as fases da doença (OERTEL & SCHULZ, 2016). A L-DOPA é um precursor de DA e, ao contrário da mesma, pode atravessar a BHE. Após o transporte ativo de L-DOPA para o cérebro, o DDC catalisa a formação de DA que é armazenada em vesículas até a liberação na fenda sináptica. Os inibidores DDC periféricos reduzem a conversão periférica de L-DOPA em DA, aumentando a meia-vida e a disponibilidade de DA no cérebro e reduzindo os efeitos colaterais, como náuseas e vômitos relacionados à DA na periferia (SCHNEIDER *et al.*, 2018).

Apesar dos efeitos benéficos adquiridos com a utilização de L-DOPA, os diversos efeitos colaterais provocados por essa droga têm contribuído pela descontinuidade do tratamento pelo paciente (OERTEL & SCHULZ, 2016). A L-DOPA mesmo em associação com inibidores de DDC inevitavelmente leva a complicações motoras tais como movimentos involuntários (discinesia) e flutuações motoras (fenômeno “wearing-off” [redução do efeito da L-DOPA]), sintomas que se relacionam com a meia-vida plasmática curta da L-DOPA (Figura 7) (ARMSTRONG & OKUN, 2020).

Figura 7. A interação entre nível de dopamina, wearing-off e discinesias ao longo da progressão da DP



A L-DOPA é normalmente administrada 3 vezes ao dia no início do tratamento fornecendo concentrações adequadas de DA durante o dia. À medida que a DP progride, doses mais altas e mais frequentes de L-DOPA são necessárias devido à diminuição das respostas de curta e longa duração à medicação dopaminérgica e uma incapacidade de armazenar o excesso de DA. As discinesias também podem se desenvolver, ocorrendo tipicamente no momento da máxima concentração de L-DOPA no cérebro. A janela terapêutica, tempo em que a concentração do medicamento oferece o efeito desejado sem discinesias (Período 'On') se estreita ao longo da progressão da doença. Fonte: Adaptado de ARMSTRONG & OKUN (2020).

Diante desses problemas envolvendo a terapia convencional da DP, novas formulações de liberação lenta de L-DOPA têm sido registradas. A administração contínua intra-duodenal de L-DOPA é altamente eficaz, mas é invasiva e não pode ser empregada em todos os pacientes (JENNER *et al.*, 2021).

Os ADs, drogas que ativam diretamente os receptores de DA, foram uma das alternativas introduzidas com o objetivo principal de superar ou controlar as limitações da terapia com L-DOPA (MATTOS & MATTOS, 1999). Há duas classes de ADs, os ergolínicos e os não ergolínicos. Os ergolínicos são representados pela bromocriptina, pergolida, lisurida e cabergolina. Os não ergolínicos, por sua vez, são representados pela apomorfina, o pramipexol, ropinirol e o piribedil (FERRAZ, 2004). Os ADs retardam, pelo menos por um ano, o uso da L-DOPA, e, por consequência, a produção de radicais livres e reduzem a incidência de complicações a longo prazo associados à L-DOPA, como as flutuações motoras e as discinesias. Entretanto, os ADs são menos potentes que a L-DOPA e mais difíceis de serem tolerados devido aos distúrbios psiquiátricos (alucinações, delírios e confusão mental) (MATTOS & MATTOS, 1999). Além disso, o tratamento com ADs crônico (ropinirol e pramipexol) parece estar

associado a um maior risco de desenvolver transtornos do controle de impulsos (GARCIA-RUIZ *et al.*, 2014).

Os inibidores da MAO-B representados pela selegilina e rasagilina podem ser utilizados em monoterapia no início da doença ou associados à L-DOPA na DP avançada. Eles são capazes de compensar a deficiência de DA, reduzindo o estresse oxidativo induzido pelo metabolismo da DA melhorando a função motora. No entanto, o efeito sintomático é menor quando comparado com a L-DOPA e estão associados com sintomas psiquiátricos, cardiovasculares, hipotensão ortostática, náuseas e tonturas. Além disso, como requerem uma quantidade adequada de DA endógena, sua eficácia diminui com o avanço da doença (DEZSI & VECSEI, 2017).

Os inibidores da COMT, uma enzima monomérica envolvida na degradação da DA, representados pela entacapona e tolcapona, assim como os inibidores da MAO-B também compensam a deficiência de DA na DP e foram desenvolvidos especificamente para o tratamento das flutuações motoras em pacientes com a doença avançada em uso de L-DOPA. No entanto, nenhuma dessas drogas se revelou ideal - o tolcapona está associado à toxicidade hepática e o entacapona tem uma meia-vida plasmática curta, exigindo dosagem a cada administração de L-DOPA. A opicapona, um COMT de terceira geração foi desenvolvida para contornar essas limitações, mas apesar de suas vantagens óbvias sobre os inibidores da COMT anteriores, ela também foi amplamente reservada para uso em pacientes com flutuações motoras em estágio avançado, onde outras estratégias de tratamento falharam (JENNER *et al.*, 2021).

Estudos recentes revelaram que as vias não dopaminérgicas, incluindo receptores de adenosina (ARs), vias glutamatérgicas, colinérgicas, adrenérgicas, serotoninérgicas, histamínicas e quelantes de ferro, podem também ser alvos terapêuticos potenciais para sintomas motores da DP, incluindo flutuações motoras, discinesia induzida por L-DOPA e distúrbios da marcha (DU & CHEN, 2017). Entretanto, entre os medicamentos comercializados que visam as vias não dopaminérgicas, o antagonista dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA -amantadina - é o único medicamento que possui dados suficientes para apoiar seu efeito antidiscinético (KIM *et al.*, 2018). Entretanto, ele está relacionado com efeitos colaterais, como confusão, constipação e alucinações visuais (DU & CHEN, 2017). Para pacientes mais jovens, os anticolinérgicos (trixifenidil, benztropina e difenidramina) são também opções para

tratamento do tremor, mas cuidado deve ser tomado devido seus efeitos adversos neuropsiquiátricos e o risco a longo prazo de comprometimento da memória (FOX *et al.*, 2018).

A ECP, por sua vez, é usada para melhorar a qualidade de vida de pacientes refratários ao tratamento farmacológico. Estudos mostram que a ECP melhora alguns aspectos motores da DP (tremor, rigidez e bradicinesia) por até 10 anos. No entanto, ela não impede o desenvolvimento de sintomas axiais, tais como alterações na marcha, instabilidade postural e os distúrbios da fala, que se tornam os principais determinantes da qualidade de vida a longo prazo (LIMOUSIN & FOLTYNIE, 2019). No que diz respeito ao tratamento reabilitativo, embora possa melhorar os sintomas motores, ele apenas complementa o tratamento farmacológico.

Além dos efeitos adversos, o tratamento hoje disponível oferece apenas alívio sintomático para os pacientes. O desenvolvimento de um tratamento neuroprotetor capaz de impedir ou retardar a degeneração de neurônios dopaminérgicos é um dos principais desafios enfrentados atualmente no tratamento da DP e o objetivo principal de inúmeros estudos em progresso.

2.4. MODELOS *IN VITRO* DE NEUROPROTEÇÃO

Neuroproteção é definida como a preservação relativa da estrutura e / ou função neuronal e constitui-se um campo de pesquisa amplo na atualidade para identificação de novas terapias para doenças neurodegenerativas. A hipótese é que a redução precoce dos processos degenerativos (como inflamação, estresse oxidativo, disfunção imunológica, agregação de proteínas e apoptose) atrasa a disfunção ou morte neuronal, e portanto, reduz os sintomas das doenças neurodegenerativas (FAROOQUI & FAROOQUI, 2017).

As linhagens celulares do tipo neuronal transformadas tais como células de neuroblastoma (SH-SY5Y), células de feocromocitoma (PC12), células progenitoras diferenciadas (LUHMES, MN9D, CSM14.1) são as principais células utilizadas em ensaios de neuroproteção *in vitro* (FALKENBURGER & SCHULZ, 2006; FALKENBURGER, BJÖRN; SARIDAKI & DINTER, 2016). Uma alternativa para o uso de linhagens celulares imortalizadas constitui o uso de culturas primárias de neurônios que, embora possuam as interações celulares

mais próximas com as que ocorrem *in vivo*, possuem a desvantagem de que uma vez diferenciadas terminalmente em neurônios maduros, as células não podem mais ser propagadas (KOVALEVICH & LANGFORD, 2013). Além disso, as células TH positivas representam apenas 5 a 10% da população de células. As dificuldades éticas na obtenção de neurônios primários humanos suficientes e adequados e as dificuldades nos processos de cultivo e manuseio também limitam a aplicação dessa fonte de células (XIE; HU & LI, 2010).

Tabela 1. Sistemas de cultura de neurônios dopaminérgicos

Nome	Origem	Diferenciação neuronal	Fenótipo dopaminérgico
SH-SY5Y	Neuroblastoma humano	Ácido retinóico, ésteres de forbol e neurotrofinas	DAT, D2R, DA, TH, vesículas, liberação de DA
PC12	Feocromocitoma de rato	Fator de crescimento neural (NGF) e dexametasona	DAT, D2R, DA, TH, vesículas, liberação de DA
MN9D	Células mesencefálicas de rato	GDNF, ácido retinóico, superexpressão de Nurr1	DA, TH, D2R. Não possui DAT, mas possui alta sensibilidade a baixas doses de MPP+
CSM14.1	Células embrionárias mesencefálicas de rato	39°C (imortalização sensível à temperatura)	TH
MESC2.10/LUHMES	Células mesencefálicas humanas (8 semanas de idade)	Tetraciclina, GDNF, 3',5'-monofosfato de N6,2' -O-dibutiril adenosina cíclica (dbcAMP)	TH, DAT, liberação de DA, eletricamente ativas

Fonte: Adaptado de FALKENBURGER & SCHULZ (2006)

Apesar da origem tumoral, células SH-SY5Y constituem a linhagem celular amplamente utilizada como modelo de neurônios desde o início dos anos 1980 e possuem muitas propriedades bioquímicas e funcionais dos neurônios. Esse tipo celular que inclui células aderentes e flutuantes é uma subclasse obtida após três clonagens subsequentes (SK-N-SH-> SH-SY-> SH-SY5-> SH-SY5Y) da linhagem celular de neuroblastoma (SK-N-SH) que foi estabelecida em 1970 a partir de um tumor ósseo metastático (KOVALEVICH & LANGFORD, 2013). Neuroblastoma constitui um tumor embrionário do sistema nervoso simpático periférico e o tumor sólido extracraniano mais comum da infância, sendo responsável por até 15% de todos os cânceres pediátricos (SWIFT *et al.*, 2018).

As células SH-SY5Y representam excelentes modelos para estudos com intervenções farmacológicas. Essas células expressam vários marcadores neuronais dopaminérgicos, tais como TH e dopamina- β -hidroxilase, transportador de DA (DAT), bem como os subtipos de

receptores de DA 2 e 3 (D2R e D3R) (KOVALEVICH & LANGFORD, 2013). Além disso, a maioria dos genes pertencentes às principais vias e módulos da DP estão intactos no genoma de células SH-SY5Y (Tabela 2). (KRISHNA *et al.*, 2014).

Tabela 2. Análise de rede para módulos da DP

Nome do módulo	Nós			Razão de centralidade de intermediação (BC-ratio)	Valor P BC
	Total	Danificado	Intacto		
Glicólise	23	6	17	0.310	0.310
Mitocôndria	259	32	277	0.155	0.297
Sinalização de cálcio	125	17	108	0.149	0.296
Apoptose	122	15	107	0.146	0.279
Dopamina	54	8	46	0.115	0.448
Sistema ubiquitina-proteassoma	55	7	48	0.044	0.340
Metabolismo de EROs	58	3	55	0.000	0.375

Nó- É uma unidade básica de estrutura de dados, geralmente organizados em estrutura de árvore. BC-ratio- Centralidade de intermediação, medida que permite avaliar quantitativamente o impacto de genes mutados de uma linhagem celular para um modelo. BC-ratio é normalizada para ficar entre 0 e 1. Quanto maior a BC-ratio, maior o impacto das mutações e menor a integridade genética (ou adequação) para o contexto. Valor P BC- Indica a probabilidade de que BC-ratio calculado resultou de uma distribuição aleatória de genes mutantes na rede. Fonte: Adaptado de KRISHNA *et al.* (2014)

Essa linhagem celular pode ser diferenciada em um fenótipo neuronal funcionalmente maduro na presença de vários agentes, tais como ácido retinóico (AR) ésteres de forbol e neurotrofinas (XIE; HU & LI, 2010). O método mais comum empregado é a diferenciação com AR, a forma oxidada da vitamina A que exerce suas ações moleculares principalmente por meio dos receptores nucleares, o receptor de ácido retinóico (RAR) e o receptor de retinóide X (RXR), resultando na ativação transcricional. A ligação covalente do AR às macromoléculas celulares também tem sido relatada (MARILL *et al.*, 2005). O AR induz diferenciação por meio da regulação da transcrição de genes do receptor de neurotrofina, via de sinalização da Wnt e vias envolvendo a proteína quinase A tipo II (PKA) (XIE; HU & LI, 2010). Estudos mostram que após a diferenciação, as células param de proliferar, mostram um crescimento extenso de neuritos, expressam uma variedade de marcadores neuronais específicos, incluindo proteína 43 associada ao crescimento (GAP43), receptores para FNs, neuropeptídeos, grânulos neurosecretórios, enolase neurônio-específica (NSE), núcleos neuronais (NeuN), proteínas de vesícula, como sinaptofisina, e proteínas do citoesqueleto neuronal-específicas, incluindo proteína associada a microtúbulo (MAP), Tau e proteínas de neurofilamento (PÅHLMAN *et*

al., 1984; XIE; HU & LI, 2010). Além disso, a diferenciação potencializa a expressão de marcadores dopaminérgicos (XIE; HU & LI, 2010).

O uso de linhagens celulares em pesquisas de doenças neurodegenerativas, como a DP, pode ser realizado por meio de abordagens moleculares, bioquímicas, farmacológicas, proteômicas ou transcriptômicas. Embora as linhagens celulares ofereçam sistemas simplificados, que não podem reproduzir totalmente uma rede de neurônios dopaminérgicos ou recapitular todo o fluxo patogênico da DP, elas são particularmente úteis para explorar os aspectos fisiopatológicos isolados, os genes / proteínas envolvidas, os mecanismos de ação de neurotoxinas específicas, além de fornecer informações valiosas para validação em modelos animais. As linhagens celulares também são úteis para triagem preliminar de compostos com potencial efeitos neuroprotetores e, no que diz respeito a modelos animais, têm a vantagem de possuírem características genéticas humanas (ALBERIO; LOPIANO & FASANO, 2012).

As linhagens celulares têm sido utilizadas em estudos de DP principalmente para triagem de drogas e avaliar respostas protetoras diante de insultos tóxicos. As principais moléculas tóxicas utilizadas são a 6-OHDA, MPTP, herbicida Paraquat (N, N' -dimetil-4-4'-bipiridínio) e inseticida Rotenona (TIEU, 2011). O insulto tóxico com 1-metil-4-fenilpiridínio (MPP⁺) é o mais amplamente utilizado em estudos *in vivo* e *in vitro* de aspectos fisiopatológicos da DP para induzir estresse oxidativo. Este cátion tóxico é derivado do metabolismo do MPTP pela enzima MAO-B. Ele tornou-se conhecido em 1982 após vários indivíduos desenvolverem parkinsonismo que se seguiu à administração intravenosa de MPTP, também conhecido como heroína sintética (WILLIAM LANGSTON *et al.*, 1983). Estudos posteriores mostraram que o MPP⁺ inibe a atividade do CI (NADH-ubiquinona oxidoreductase) da CTE levando à depleção de ATP mitocondrial e morte celular (MARKEY *et al.*, 1984; MIZUNO; SONE & SAITOH, 1987).

O MPP⁺ possui a vantagem de causar degeneração específica dos neurônios dopaminérgicos, uma vez que é ativamente captado unicamente por DAT, ao contrário das demais neurotoxinas, tais como 6-OHDA que também tem como alvo os transportadores noradrenérgicos e a rotenona que entra nas células por difusão (ALBERIO; LOPIANO & FASANO, 2012). Embora estudos mostrem que o paraquat também seja captado unicamente por DAT, as evidências recentes são contraditórias mostrando perda consistente de neurônios

nigrais (não mais que 25%), mas não a perda de DA estriatal, que é considerada uma marca registrada da doença (MILLER, 2007). Além disso, o MPP+ é a única neurotoxina com evidências que induz parkinsonismo em humanos (WILLIAM LANGSTON *et al.*, 1983). A desvantagem está no fato que o MPP+ não reproduz a formação de agregados de α -sinucleína, característicos da DP, assim como ocorre com a rotenona e paraquat (ALBERIO; LOPIANO & FASANO, 2012).

Atualmente, não existem terapias neuroprotetoras comprovadas para a DP. Os recentes alvos para neuroproteção envolveram os inibidores da MAO-B (selegilina e rasagilina), bloqueadores do canal de cálcio (isradipina), ADs (pramipexol, bromocriptina, apomorfina, ropinirol), antagonistas do receptor NMDA (riluzol, amantadina, memantina), FNs, quelantes de ferro (deferroxamina, ácido fólico), creatinina e a coenzima Q10. Embora estudos pré-clínicos demonstrem atividade neuroprotetora desses compostos, alguns ainda não possuem dados clínicos suficientes que comprovem a atividade, enquanto outros ou falham em reproduzir esses resultados nos estudos clínicos, ou são mal tolerados pelos pacientes por causa de seus efeitos colaterais (ATHAUDA & FOLTYNIE, 2015; SALAMON *et al.*, 2020).

Nos últimos anos, a atenção também foi dispensada aos componentes do SRA como potenciais alvos neuroprotetores, especialmente aos bloqueadores da Ang II. Esse peptídeo demonstrou não somente potencial de induzir estresse oxidativo e promover a neuroinflamação, como também potencial de influenciar diversos processos patológicos que resultam em danos aos neurônios (ABIODUN & OLA, 2020; ZAWADA *et al.*, 2015). No entanto, os efeitos dos componentes do SRA cerebral na participação da fisiopatologia de doenças neurodegenerativas ainda são pouco compreendidos.

2.5. SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA

O SRA é um sistema amplamente conhecido por seus papéis fisiológicos na homeostase eletrolítica, regulação do volume de fluido corporal e controle cardiovascular na circulação periférica (ABIODUN & OLA, 2020). Ele é composto classicamente pela renina, angiotensinogênio, enzima conversora da angiotensina (ECA) e os receptores para a Ang II. A clivagem da pró-renina em renina é realizada em resposta à ativação de células

justaglomerulares presentes nas arteríolas aferentes do rim, por diminuição da pressão sanguínea, ativação do sistema nervoso simpático ou ativação pelas células da mácula densa. A renina então atua clivando o angiotensinogênio liberado no plasma pelo fígado em Angiotensina I (Ang I). A Ang I é fisiologicamente inativa, mas atua como um precursor da Ang II. A conversão da Ang I em Ang II é catalisada pela ECA, encontrada principalmente no endotélio vascular dos pulmões e rins (FOUNTAIN & LAPPIN, 2018).

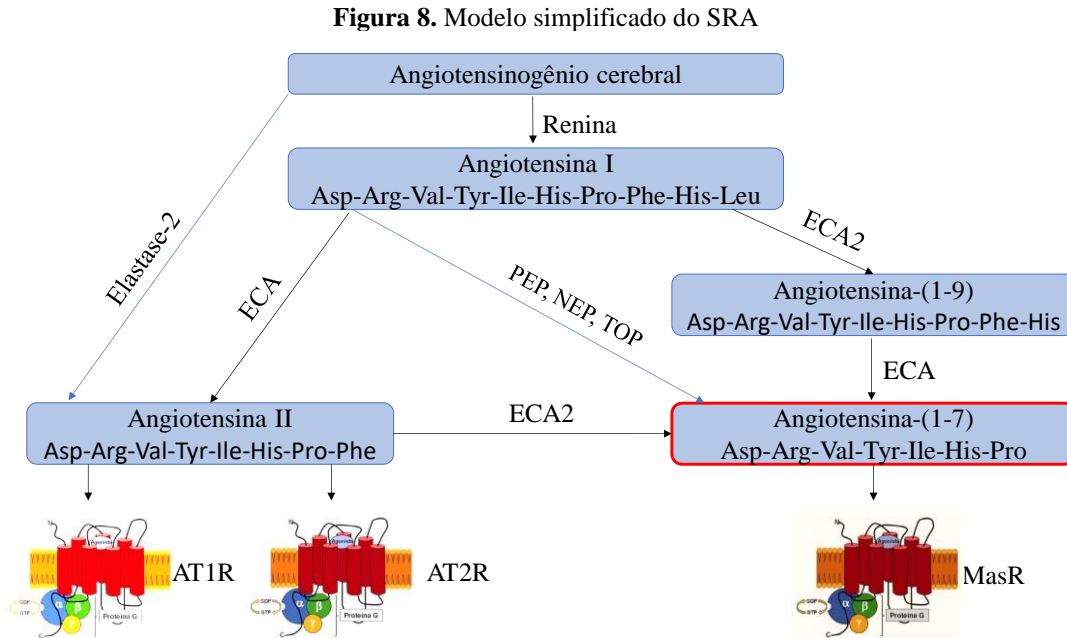
A Ang II executa seus efeitos, ligando-se aos receptores de Ang II tipo I (AT1) e tipo II (AT2). A ligação ao AT1R resulta em inflamação, vasoconstrição, fibrose, aumento da absorção renal de sódio, liberação de aldosterona e vasopressina. Enquanto que a ligação da Ang II ao AT2R resulta em vasodilatação, antiproliferação e apoptose (ARENDSSE *et al.*, 2019).

A Ang II pode ser clivada em Angiotensina III (Ang III) pela glutamil-aminopeptidase (GluAP) ou em Ang- (1-7) pela enzima conversora de angiotensina do tipo 2 (ECA-2) ou pela prolil endopeptidase (PEP). A Ang- (1-7) pode também resultar da clivagem de Angiotensina- (1-9) pela ECA-1 e endopeptidase neutra (NEP) e diretamente da Ang I, através da interação com a PEP, NEP ou thimet-oligopeptidase (TOP). A alanil-aminopeptidase (AlaAP) cliva a Ang III em Angiotensina IV (Ang IV) que, por sua vez, é convertida em Angiotensina- (3-7) pela enzima carboxipeptidase (PASSOS-SILVA; VERANO-BRAGA & SANTOS, 2013; WRIGHT & HARDING, 2013). Uma visão simplificada das vias enzimáticas envolvidas na produção dos principais peptídeos do SRA é mostrada na Figura 8.

A Ang III liga-se a receptores AT1 com uma afinidade menor do que Ang II, e a receptores AT2 com uma afinidade maior do que Ang II. A Ang IV e Angiotensina- (3-4) ligam-se a receptores AT4 e, quando em altas concentrações, também podem ligar-se a receptores AT1. A Ang- (1-7), por sua vez, liga-se a MasR e com menor afinidade aos receptores AT2. Os receptores AT1, de forma geral, são conhecidos pela atividade vasoconstritora, enquanto que os receptores AT2, AT4 e MasR são conhecidos por sua atividade vasodilatadora (JACKSON *et al.*, 2018).

Os antagonistas específicos de receptores AT1 (losartana), de receptores AT2 (PD123177 e PD123319) e antagonistas peptídicos potentes do MasR gerados pela substituição da C-prolina por uma D-Alanina, para formar D-Alanina-Angiotensina- (1-7), também chamado de A-779, ou com uma D-prolina, para obter D-Prolina 7-Angiotensina- (1-7) e têm

seu úteis para desmascarar efeitos específicos das vias Ang II / AT1, Ang II / AT2 e Angiotensina- (1-7) / MasR, respectivamente (XU; SRIRAMULA & LAZARTIGUES, 2011).



Fonte: Elaborado pelo autor

Além do SRA sistêmico, SRA independentes foram relatados em vários tecidos, como coração, rim, pulmão, fígado, retina e cérebro (ABIODUN & OLA, 2020; STORNETTA *et al.*, 1988). No cérebro, existem vias angiotensinérgicas centrais e periféricas. A principal via periférica é a via do prosencéfalo constituída por capilares fenestrados dos chamados órgãos circumventriculares que circundam o terceiro e o quarto ventrículos. As outras estruturas cerebrais são dependentes da via angiotensinérgica central. A via que conecta o hipotálamo e a medula é o principal contribuinte da angiotensina sintetizada localmente (JACKSON *et al.*, 2018).

A maior parte do angiotensinogênio central é produzido nos astrócitos e secretado constitutivamente para conversão em vários peptídeos neuroativos. Os principais peptídeos neuroativos de angiotensina são a Ang II, Ang IV, Ang- (1-7) e Alamandina. A Alamandina é um análogo da Ang- (1-7) que pode ser formado pela descarboxilação da Ang- (1-7) ou pela descarboxilação de Ang II em um precursor de Angiotensina A, um análogo de Ang II (JACKSON *et al.*, 2018).

Os mecanismos pelos quais o sistema SRA participa no processo neuropatológico de doenças neurodegenerativas não ainda não são bem compreendidos, mas acredita-se que haja participação de neuroinflamação, estresse oxidativo e apoptose (ABIODUN & OLA, 2020). A estimulação de Ang II mostrou diminuir a respiração mitocondrial, aumentar a expressão de duas subunidades NADPH oxidase (Nox2 e Nox4), aumentar o potencial oxidativo, regular positivamente vários genes pró-inflamatórios (IL-1 β , IL-6 e TNF α) e aumentar a ligação do fator nuclear cerebral- κ B (NF- κ B) ao DNA em células neuronais (PAREKH; ROBIDOUX & SRIRAMULA, 2020). GAO *et al.* (2017) revelaram perda de neurônios dopaminérgicos induzida por Ang II e que essa perda é parcialmente atribuída à apoptose celular, uma vez que a atividade da caspase-3, um executor chave da apoptose é notavelmente aumentada após a infusão de Ang II. Estudos também indicam que a perda de células dopaminérgicas induzida pela neurotoxina MPTP / MPP⁺ é amplificada por Ang II e inibida *in vivo* e *in vitro* por antagonistas do receptor AT1 e agonistas do receptor AT2, tornando-os possíveis estratégias terapêuticas para doenças neurodegenerativas (JOGLAR *et al.*, 2009)

Além dos antagonistas de receptores AT1 e agonistas de AT2, o eixo Ang- (1-7) / MasR, por contra regular o eixo Ang II / AT1R em muitas doenças têm sido considerado um alvo viável para neuroproteção.

2.6. ANGIOTENSINA- (1-7)

A Ang- (1-7) foi primeiramente identificada em homogenatos cerebrais de cães a partir da clivagem da Ang I pela ECA (SANTOS *et al.*, 1988) e em cérebro, glândulas adrenais e plasma de ratos normais (CHAPPELL *et al.*, 1989). A Ang- (1-7) foi considerada um peptídeo inativo do SRA e suas funções permaneceram mal compreendidas até estudos posteriores comprovarem que o peptídeo é capaz de favorecer a liberação de vasopressina no hipotálamo e reduzir a pressão arterial quando injetada na medula dorsal e no núcleo do trato solitário de ratos anestesiados (CAMPAGNOLE-SANTOS *et al.*, 1989). Com a descoberta de que a Ang- (1-7) é um peptídeo vasoativo tão potente quanto Ang II, diversos estudos exploraram suas outras ações biológicas.

A Ang- (1-7) está sendo atualmente considerada um alvo potencial para o tratamento da síndrome metabólica, um distúrbio caracterizado pela associação de fatores de risco para o desenvolvimento de doenças cardíacas, derrames e diabetes tais como obesidade, resistência à insulina, hipertensão, diabetes, hiperinsulinemia e dislipidemia, (PASSOS-SILVA; VERANO-BRAGA & SANTOS, 2013). Estudos realizados por COELHO *et al.* (2010) mostraram pela primeira vez que níveis de Ang- (1-7), bem como a expressão de ECA-2, aumentam no tecido adiposo de animais alimentados com sacarose, um modelo de síndrome metabólica, sugerindo uma associação entre SRA tecidual e lipogênese. Outro estudo mostrou que a Ang- (1-7) melhora a captação de glicose e protege os adipócitos contra o estresse oxidativo que pode induzir resistência à insulina (LIU *et al.*, 2012). Além disso, a Ang- (1-7) reduz significativamente cardiomiopatia diabética em ratos devido suas propriedades vasodilatadoras e redução significativa de dislipidemia, a principal causa de disfunções cardíacas no paciente com diabetes (SINGH; SINGH & SHARMA, 2011).

Estudos *in vivo* e *in vitro* também mostram a propriedade antiproliferativa da Ang- (1-7), o que lhe confere uma importante alternativa nos estudos para tratamento do câncer. GALLAGHER & TALLANT (2004) mostrou que a Ang- (1-7) diminui a síntese de DNA e proliferação celular de células de câncer de pulmão humano em cultura (SK-LU-1, A549 e SKMES-1) na concentração de 100 nM, efeitos que são inibidos por A779. Esses resultados foram reproduzidos pelo mesmo grupo de pesquisadores em camundongos atímicos através de xenoenxertos de adenocarcinoma pulmonar humano A549 (MENON *et al.*, 2007).

A Ang- (1-7) também mostrou diminuir a proliferação vascular *in vitro* em células de músculo liso vascular em cultura e *in vivo* após lesão vascular e a hipertrofia e fibrose cardíaca induzidas por Ang II indicando que o heptapeptídeo possui propriedade antiangiogênica, antifibrótica e regula o crescimento celular cardiovascular (GUO *et al.*, 2017; TALLANT; DIZ & FERRARIO, 1999).

Especificamente em mulheres, a Ang- (1-7), MasR e ECA-2 são expressos nos ovários, endométrio e placenta indicando que podem estar envolvidos na maturação folicular, ovulação, ciclo menstrual e gravidez (PRINGLE *et al.*, 2011; REIS *et al.*, 2011; VAZ-SILVA *et al.*, 2009). O papel fisiológico desta via na reprodução está sob investigação, mas as evidências em modelos animais sugerem que a sinalização de Ang- (1-7) através do MasR é altamente regulada por hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH). Este hormônio também induz a

expressão de ECA-2, levando a níveis aumentados de Ang- (1-7) e regula positivamente a expressão de MasR (PEREIRA *et al.*, 2009). Em homens férteis, a Ang- (1-7) e MasR são altamente expressos no compartimento intersticial, principalmente nas células de Leydig, e com menos intensidade nos túbulos seminíferos, enquanto se observa uma redução da expressão em amostras de homens inférteis, indicando que a Ang- (1-7) modula a espermatogênese (REIS *et al.*, 2010).

No contexto inflamatório, a Ang- (1-7) parece antagonizar o efeito pró inflamatório da Ang II via AT1R. Estudos realizados por SANTUCHI *et al.* (2019) mostram que o heptapeptídeo reduz a expressão das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β e da quimiocina CCL2 em macrófagos estimulados por LPS e IFN- γ . A administração terapêutica da Ang- (1-7) em modelo murino de pleurisia induzida por LPS, por sua vez, diminuiu o número de neutrófilos e macrófagos M1, reconhecidos como pró-inflamatórios.

Nos últimos anos, estudos têm se dedicado em desvendar os efeitos centrais da Ang-(1-7). Este heptapeptídeo é um dos principais peptídeos do SRA presentes do SNC e é expressa em diferentes regiões dos cérebro, incluindo hipotálamo, hipocampo e amígdala (PASSOS-SILVA; VERANO-BRAGA & SANTOS, 2013).

A Ang- (1-7) demonstrou ter um efeito neuroprotetor em modelo animal de isquemia cerebral por reverter o estresse oxidativo e inflamação por meio da inibição do fator NF- κ B (JIANG *et al.*, 2012). A atividade neuroprotetora também pode estar relacionada ao seu efeito vasodilatador para aumentar o fluxo sanguíneo para certos tecidos, incluindo o fluxo sanguíneo cerebral e ao seu efeito angiogênico dentro da região peri-infarto do córtex cerebral (BENNION *et al.*, 2015).

Além de seu papel na isquemia cerebral estudos mostram que ela estimula a plasticidade sináptica no hipocampo de ratos e na amígdala lateral, sugerindo participação nos processos de aprendizagem e memória (ALBRECHT, 2007; HELLNER *et al.*, 2005). Estudo realizado por CAO *et al.*, (2019) mostrou que a infusão de Ang- (1-7) melhorou os sintomas cognitivos induzidos por Ang II em modelo animal de Doença de Alzheimer. Além dos efeitos sintomáticos sobre a demência, estudos também mostram redução dos níveis de Ang-(1-7) com a progressão da doença de Alzheimer e uma relação inversa entre os níveis deste peptídeo e hiperfosforilação de Tau, a marca patológica da doença (JIANG *et al.*, 2016).

Recentemente, COSTA-BESADA *et al.* (2018) descobriram que o eixo Ang- (1–7) / MasR está presente em neurônios dopaminérgicos e antagoniza o eixo Ang II / AT1R, que demonstrou agravar a neurodegeneração em modelos de DP. Enquanto isso, GAO *et al.* (2021) demonstrou a diminuição da via Ang- (1-7) / MasR na substância nigra bem como a diminuição de agregados de α -sinucleína após a infusão Ang- (1–7) em modelos animais de DP. Todos esses achados apoiam a hipótese de que o eixo Ang- (1–7) / MasR tem um efeito neuroprotetor durante a progressão da DP.

3. JUSTIFICATIVA

Atualmente, o principal tratamento da DP é a associação de L-DOPA com inibidor de DDC e é indicado em todas as fases da doença (OERTEL & SCHULZ, 2016). Apesar dos efeitos benéficos adquiridos com a utilização dessa terapia, a L-DOPA é associada a complicações motoras tais como discinesia e flutuações motoras (SCHNEIDER *et al.*, 2018). Além disso, a terapia convencional é sintomática e não é capaz de impedir ou retardar a degeneração de neurônios dopaminérgicos.

Assim, novas formas de tratamento devem ser consideradas a fim de impedir a progressão da doença, com o intuito principal de prolongar a expectativa de vida e melhorar a qualidade de vida dos pacientes com a doença. Nesse âmbito, compostos neuroprotetores de origem sintética, natural e peptídeos têm sido alvo de pesquisas, especialmente aqueles com efeito antioxidante, capazes de retomar as vias mitofágicas normais que regulam o equilíbrio redox e a homeostase (GAKI & PAPA VASSILIOU, 2014).

No processo inicial de descoberta de fármacos, vários compostos/ substâncias naturais, sintéticas e peptídeos são avaliadas em modelos preditivos *in vitro*. No presente projeto, o modelo preditivo de neurotoxicidade usando células neuronais humanas SH-SY5Y foi proposto e padronizado permitindo a avaliação da Ang- (1-7) com a finalidade de avaliar seu efeito neuroprotetor *in vitro*. A escolha da Ang- (1-7), principal objeto de estudo do presente projeto, foi feita considerando as atividades antioxidantes e anti-inflamatórias, compreendendo uma nova abordagem para neuroproteção. Assim, o objetivo principal do presente estudo foi avaliar o potencial neuroprotetor *in vitro* da Ang-(1-7) na toxicidade induzida por MPP+ utilizando como modelo células neuronais humanas SH-SY5Y. Os achados deste estudo contribuirão para novos estudos da Ang- (1-7) em modelos de doenças neurodegenerativas como a DP.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial neuroprotetor *in vitro* da Ang- (1-7), selecionada por triagem biológica, sobre a toxicidade induzida por MPP⁺ utilizando como modelo células neuronais humanas SH-SY5Y diferenciadas.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer um ensaio preditivo para avaliação de neuroproteção utilizando células neuronais humanas SH-SY5Y diferenciadas e avaliação do dano induzido por MPP⁺;
- Avaliar a atividade antiproliferativa da Ang- (1-7) em células SH-SY5Y diferenciadas e em PBMCs humanas;
- Avaliar o efeito do pré-tratamento com Ang- (1-7) isolada e associada com seu antagonista A779 na viabilidade de células SH-SY5Y diferenciadas submetidas ao dano por MPP⁺;
- Avaliar o efeito do pré-tratamento com Ang- (1-7) isolada e associada com A779 na integridade de membrana de células SH-SY5Y diferenciadas submetidas ao dano por MPP⁺;
- Avaliar o efeito do pré-tratamento com Ang- (1-7) isolada e associada com A779 na progressão do ciclo celular de células SH-SY5Y diferenciadas submetidas ao dano com MPP⁺ e seu potencial em induzir morte por apoptose;
- Avaliar o efeito do pré-tratamento com Ang- (1-7) isolada e associada com A779 sob o estresse oxidativo em células SH-SY5Y diferenciadas submetidas ao dano por MPP⁺;
- Avaliar o efeito do pré-tratamento com Ang-(1-7) isolada e associada com A779 no tamanho de neuritos de células SH-SY5Y diferenciadas submetidas ao dano com MPP⁺.

5. MATERIAL E MÉTODOS

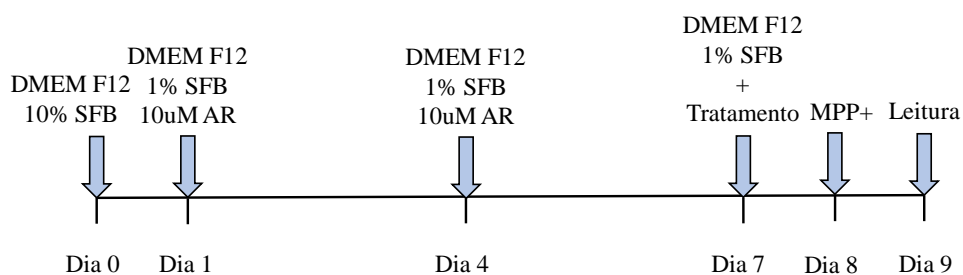
5.1. CULTIVO DE CÉLULAS SH-SY5Y

Células da linhagem celular SH-SY5Y foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Marcel Leist (Universidade de Konstanz, Alemanha). As células foram mantidas em meio DMEM F12 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 1% de L-glutamina e 1% de penicilina-estreptomicina em atmosfera umidificada de 5% de CO₂ a 37° C (Thermo Scientific, Series II Water Jacket).

5.2. DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS SH-SY5Y

As células SH-SY5Y aderidas foram mantidas e células em suspensão foram descartadas. Para a diferenciação neuronal foi utilizado o AR. As células foram plaqueadas em placas de 96 poços, 10.000 células por poço, utilizando-se meio Advanced DMEM F12 10% de SFB, 1% de L-glutamina e 1% de penicilina-estreptomicina. O protocolo de diferenciação é apresentado na Figura 9.

Figura 9. Protocolo de diferenciação induzida por AR



No dia 0, as células SH-SY5Y foram plaqueadas e cultivadas em meio celular contendo 10% de SFB. Após 24 h (dia 1), o meio foi removido e meio contendo 1% de SFB e 10 μ M de AR (meio de diferenciação) foi adicionado. Três dias depois (dia 4), o meio de diferenciação foi substituído por meio de diferenciação novo. No dia 7, as células SH-SY5Y foram utilizadas em experimentos. Fonte: LOPES *et al.* (2017).

As células diferenciadas e não diferenciadas foram observadas ao microscópio de luz (Zeiss Axiovert 40) e imagens obtidas pelo software ZEISS ZEN lite (Ampliação de 40×).

5.3. INDUÇÃO DE NEUROTOXICIDADE POR MPP+

Para indução da neurotoxicidade, células foram tratadas com MPP+ no 8º dia após o plaqueamento. Como as células SH-SY5Y não possuem o mecanismo para transformar MPTP em MPP+, o próprio metabólito é administrado. Uma vez dentro da célula, o MPP+ bloqueia o CI da CTE, prejudicando a respiração mitocondrial e aumentando EROs. Ele também redistribui DA no citosol, onde é oxidado e gera mais EROs (XICOY; WIERINGA & MARTENS, 2017).

Realizou-se a curva dose-resposta do MPP+ nas concentrações de 2 mM, 1,5 mM, 1 mM, 0,5 mM e 0,25 mM e foi selecionada a concentração capaz de diminuir significativamente a viabilidade celular. O MPP+ foi aplicado na concentração determinada e as células foram incubadas por mais 24 horas. Para determinar alterações na viabilidade celular, realizou-se o ensaio de brometo de 3,4,5-dimetil-2-tiazolil-2,5- difenil-2H-tetrazolium (MTT). A tecnologia de ensaio MTT tetrazólio é uma técnica amplamente utilizada e baseia-se no princípio de que células viáveis com metabolismo ativo convertem o MTT em um produto –o formazan- de cor púrpura, o qual se acumula como um precipitado insolúvel dentro das células, além de ser depositado próximo à superfície celular e no meio de cultura (RISS *et al.*, 2004).

O substrato MTT foi adicionado às células em cultura 24 horas após o dano com MPP+ em uma concentração final de 0,5 mg/ml e incubadas durante 4 horas. O sobrenadante foi aspirado e 200 µl de isopropanol acidificado foi adicionado a cada poço para dissolver o precipitado. A quantidade de formazan (presumivelmente diretamente proporcional ao número de células viáveis) foi medida registrando as mudanças de absorbância a 595 nm pelo leitor de microplacas multimodal Varioskan™ LUX (Thermo Scientific). Os dados foram expressos como a média ± SEM de três experimentos independentes em triplicata.

Para determinar alterações na integridade de membrana foi utilizada a análise de liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH). Quando a integridade da membrana está

comprometida, LDH é excretada para fora da célula e pode ser quantificada por uma reação enzimática. Neste estudo, a quantificação foi realizada conforme descrito por KUBOWITZ & OTT (1943) com algumas modificações. A produção de lactato foi determinada utilizando a formação de NAD⁺ e lactato, a partir do piruvato na presença de excesso de NADH. A reação é catalisada pela LDH, sendo a concentração de lactato calculada a partir do coeficiente de extinção de NADH a 340 nm (VALVONA *et al.*, 2016). Foi preparado 25 ml de solução tampão contendo 40,24 mM de K₂HPO₄ e 9,7 mM KH₂PO₄ (pH 7,5) com 1,7 mg de piruvato de sódio e 4,24 mg de NADH. O piruvato de sódio e NADH foram adicionados imediatamente antes da leitura e protegidos da luz. A reação da LDH foi acompanhada por 20 minutos por meio de leitura das absorbâncias a 340 nm em espectrofotômetro Varioskan™ LUX (Thermo Scientific). Como controle positivo, foi utilizado Triton X-100 (10%). Para o cálculo de porcentagem de lise, foi considerado a % de lise das células tratadas em relação ao controle. Os dados foram expressos como a média ± SEM de dois experimentos independentes em triplicata.

5.4. REALIZAÇÃO DA CURVA DOSE-RESPOSTA DA ANGIOTENSINA- (1-7)

No 7º dia após o plaqueamento, as células SH-SY5Y diferenciadas foram submetidas ao tratamento. O meio de diferenciação foi removido e acrescentado meio sem adição de AR. Realizou-se uma curva dose-resposta da Ang- (1-7) nas concentrações de 10⁵, 10⁴, 10³, 10², 10¹, 10⁰ e 10⁻¹ nm. A Ang- (1-7) foi dissolvida diretamente em PBS.

Para investigar participação do MasR nos mecanismos neuroprotetores, células foram tratadas também o A779 associado à Ang- (1-7). Após 24 horas do tratamento, o MPP⁺ foi aplicado na concentração determinada e as células foram incubadas por mais 24 horas. Para determinar alterações na viabilidade celular, realizou-se o ensaio de MTT. Os dados foram expressos como a média ± SEM de três experimentos independentes em triplicata.

5.5. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DA ANGIOTENSINA-(1-7) EM CÉLULAS SH-SY5Y DIFERENCIADAS E EM PBMC

5.5.1. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA EM LINHAGENS DE CÉLULAS SH-SY5Y

As células SH-SY5Y foram plaqueadas na densidade de 10.000 células/poço em placas de 96 poços e diferenciadas por 7 dias. No 7º dia de diferenciação, as células foram submetidas ao tratamento. O meio de diferenciação foi removido e acrescentado meio sem adição de AR. As células foram tratadas com Ang- (1-7) nas concentrações de 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 , 10^0 e 10^{-1} nM. As células foram mantidas em estufa de 5% de CO₂, 95% de ar atmosférico a 37°C por 24h e após esse período, a viabilidade celular foi medida pelo ensaio de MTT. Para determinar o potencial da Ang- (1-7) em causar alterações na integridade da membrana foi utilizada a análise de LDH. Os dados para MTT foram expressos como a média \pm SEM de três experimentos independentes em triplicata. Os dados para LDH, por sua vez, foram expressos como a média \pm SEM de dois experimentos independentes em triplicata.

A Ang- (1-7) também foi avaliada quanto ao potencial de causar alterações na progressão do ciclo celular de células SH-SY5Y diferenciadas e potencial de induzir apoptose. Para isso, células SH-SY5Y foram plaqueadas em placas de 24 poços, 52.000 células por poço, diferenciadas por 7 dias e tratadas com as concentrações de 1 nM e 10 nM de Ang- (1-7), que foram as concentrações escolhidas para prosseguir com os estudos de mecanismos. Para estes experimentos, foi avaliada a fluorescência emitida pelo iodeto de propídeo (IP) e quantificação do conteúdo de DNA subdiploide (DNA fragmentado) em citometria de fluxo de acordo com o método descrito por RICCARDI & NICOLETTI (2006). Após o período de tratamento, induziu-se dano com MPP+ e as células foram incubadas por mais 24 horas. Posteriormente, as células foram transferidas para tubos de 1 ml e centrifugadas a 2.000 rpm durante 10 minutos em microcentrífuga (Denver Instrument Company, USA). O sobrenadante foi desprezado e nos tubos contendo o precipitado de células foram adicionados 300 μ L de uma solução fluorocrômica hipotônica (HFS), contendo 50 μ g/ml de IP (Sigma, Saint Louis, Missouri USA), 0,1% de Triton X-100 (Sigma, Saint Louis, Missouri USA) e citrato de sódio a 0,1% (Sigma, Saint Louis, Missouri USA).

As placas foram incubadas por 1 hora em geladeira (2°C a 8°C). Após este período, as células foram analisadas em citômetro de fluxo FACSCan (Becton Dickinson, USA), com registro de 10.000 eventos para cada amostra. As aquisições foram realizadas conforme KANG

et al. (2010). A tensão FL2 foi ajustada de modo que as fases G0/G1 e G2/M formem picos de valores, respectivamente, de 200 e 400 em FL2-A. Os valores de FSC-H, SSC-H, FL2-A e FL2-W foram adquiridos para análises de histogramas e estatísticas no programa FlowJo 7.6.4® (Tree Star, Inc®). Os dados foram expressos como a média \pm SEM de três experimentos independentes em duplicata.

5.5.2. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DA ANGIOTENSINA-(1-7) EM PBMCs HUMANAS

5.5.2.1. PBMCs HUMANAS

As PBMC foram obtidas de amostras de sangue de doadores saudáveis conforme aprovação do comitê de ética em pesquisa, número CAAE 30860113.1001.5149, parecer 1.564.247, UFMG. As células foram isoladas conforme descrito por DAGUR & MCCOY (2015) com modificações. O sangue venoso foi coletado em tubos BD Vacutainer® Plus com Heparina e adicionado em tubos falcon contendo Histopaque® 1077 (Sigma Aldrich, USA) na proporção de 2:1. Após centrifugação a 500 g, 40 min a 20 °C, os leucócitos e monócitos foram coletados com pipetas de Pasteur e transferidos para tubos falcon contendo 10 ml de meio RPMI. Estes foram centrifugados a 300 g, 10 min a 4 °C por 3 vezes e as células foram ressuspendidas em meio RPMI para contagem em câmara de Neubauer. Para cultivo foi utilizado meio RPMI-1640 suplementado com 10% de SFB (GIBCO BRL, Grand Island, NY), enriquecidos com 2mM de L-Glutamina (GIBCO UK, Grand Island, NY), 1% de solução antibiótica (100 UI.mL⁻¹ de penicilina e 100 µg.mL⁻¹ de estreptomicina (GIBCO BRL, Grand Island, NY).

5.5.2.2. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA

A avaliação da atividade antiproliferativa da Ang- (1-7) foi realizada pelo ensaio de resazurina. Este composto de cor azul e não fluorescente, quando adicionado a cultura de células metabolicamente ativas é convertido a resorufina de cor rosa e fluorescente que se correlaciona com a quantidade de células viáveis (RISS *et al.*, 2004). As

células mononucleares foram separadas conforme descrito no item 5.5.2.1 e semeadas na densidade de 200.000 células por poço em placas de 96 poços e incubadas overnight em estufa de 5% de CO₂ à 37°C. Posteriormente as células foram tratadas com Ang- (1-7) nas concentrações de 10 a 0,00001 µM e incubadas por 120 horas (5 dias).

Ao final foi adicionado 20 µL de resazurina preparada em PBS na concentração final de 10 µg. mL⁻¹ a cada poço. Após 3 horas, a leitura fluorimétrica foi realizada a 530/ 590 nm de excitação e emissão em leitor Varioskan Flash (Thermo Scientific). Todas as concentrações foram testadas em triplicata com sangue de 6 indivíduos. A curva de dose-resposta foi obtida utilizando software GraphPad Prism® Version 7.0.

5.6. AVALIAÇÃO DO PRÉ-TRATAMENTO COM ANGIOTENSINA- (1-7) ISOLADA E ASSOCIADA COM A779 NA VIABILIDADE CELULAR

As células SH-SY5Y foram plaqueadas em placa de 96 poços, 10.000 células/ poço e foram diferenciadas por 7 dias. No 7º dia, as células foram pré-tratadas com Ang- (1-7) nas concentrações selecionadas isoladas ou associadas ao A779, no 8º dia induziu-se dano com MPP⁺ e após 24 horas, realizou-se a avaliação da viabilidade pelo ensaio de MTT. Os dados foram expressos como a média ± SEM de três experimentos independentes em triplicata.

5.7. AVALIAÇÃO DO PRÉ-TRATAMENTO COM ANGIOTENSINA- (1-7) ISOLADA E ASSOCIADA COM A779 NA INTEGRIDADE DA MEMBRANA

A integridade de membrana foi avaliada pela liberação de LDH. Para esse ensaio, as células SH-SY5Y foram plaqueadas em placa de 96 poços, 10.000 células/ poço, foram diferenciadas e foi avaliado o efeito da Ang- (1-7) isolada e associada ao A779 na liberação da enzima LDH 24 horas após o dano com MPP⁺. Os dados foram expressos como a média ± SEM de três experimentos independentes em triplicata.

5.8. AVALIAÇÃO DO PRÉ-TRATAMENTO COM ANGIOTENSINA- (1-7) ISOLADA E ASSOCIADA COM A779 NA PROGRESSÃO DO CICLO CELULAR E AVALIAÇÃO DO CONTEÚDO DE DNA SUBDIPLÓIDE EM CÉLULAS SH-SY5Y DIFERENCIADAS SUBMETIDAS AO DANO COM MPP+

As células SH-SY5Y foram cultivadas em placas de 24 poços, na densidade de 52.000 células/ poço. Após a diferenciação, células SH-SY5Y foram incubadas com Ang- (1-7) isolada e associada ao A779 por 24h. Após o período de tratamento, induziu-se dano com MPP+ e as células foram incubadas por mais 24h e avaliadas pela fluorescência emitida pelo IP e quantificação do conteúdo de DNA subdiplóide em citometria de fluxo. Os dados foram expressos como a média \pm SEM de três experimentos independentes em duplicata.

5.9. AVALIAÇÃO DO PRÉ-TRATAMENTO COM ANGIOTENSINA- (1-7) ISOLADA E ASSOCIADA COM A779 SOB O ESTRESSE OXIDATIVO

A produção de EROs foi analisada por espectrofotometria usando diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCF- DA), conforme descrito por ZHANG *et al.* (2010), com modificações. O DCF- DA é um composto apolar que prontamente entra nas células, onde é clivado para formar 2', 7'-diclorofluoresceína (DCFH) por esterases endógenas. A oxidação de dois elétrons do DCFH resulta na formação de um produto fluorescente, a diclorofluoresceína (DCF), que pode ser monitorada por várias técnicas baseadas em fluorescência, tais como espectrofotometria, microscopia confocal e citometria de fluxo (KALYANARAMANA *et al.*, 2012).

As células SH-SY5Y foram plaqueadas na densidade de 10.000 células por poço em placas de 96 poços e submetidas ao processo de diferenciação por 7 dias. Após esse período as células foram tratadas com Ang- (1-7) isolada ou associada com A779, e incubadas por 24 horas. Após esse período, o meio de cultura foi removido, as células foram lavadas 3X com PBS e foram incubadas com DCF-DA à 10 μ M por 30 min. Posteriormente, removeu-se o meio contendo DCF-DA, as células foram lavadas com PBS 3X, acrescentou-se meio DMEM F12 1% SFB e induziu-se dano com MPP+. A produção de EROs foi acompanhada por 15 minutos após o dano com MPP+ por meio de leitura da fluorescência em espectrofotômetro VarioskanTM LUX (Thermo Scientific) nos comprimentos de onda de excitação e emissão de

485 e 530 nm, respectivamente. Os dados foram expressos como a média \pm SEM de três experimentos independentes em triplicata.

5.10. AVALIAÇÃO DO EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM ANGIOTENSINA-(1-7) ISOLADA E ASSOCIADA COM A779 NO TAMANHO DE NEURITOS DE CÉLULAS SH-SY5Y DIFERENCIADAS SUBMETIDAS AO DANO COM MPP+

As células SH-SY5Y foram cultivadas em placas de 24 poços, na densidade de 52.000 células/ poço. Após a diferenciação, células SH-SY5Y foram incubadas com Angiotensina- (1-7) isolada ou associada com A779 por 24h. Após o período de tratamento, induziu-se dano com MPP+ e as células foram incubadas por mais 24h. Posteriormente, as células foram observadas por microscopia de luz (Zeiss Axiovert 40) e as imagens foram capturadas (Aumento de 40x) e os prolongamentos celulares mensurados pelo software ZEISS ZEN lite. Foram considerados neuritos, qualquer prolongamento mais longo que o corpo celular. Foram realizados 3 experimentos independentes e mensurados 10 neuritos em cada grupo por experimento, totalizando 30 neuritos por grupo conforme realizado por JANTAS et al. (2020).

5.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média \pm SEM. Para a comparação dos dados intragrupos foi usado o teste one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Dunnett. O nível de significância considerado significativo foi um valor de $p < 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1. DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS SH-SY5Y

A diferenciação de células SH-SY5Y foi realizada com AR à 10 μM e seguiu o protocolo apresentado na Figura 9. Observou-se que células diferenciadas por 7 dias apresentaram morfologia estrelar e crescimento extenso de neuritos (Figura 10).

Figura 10. Parâmetro morfológico de células SH-SY5Y diferenciadas com AR

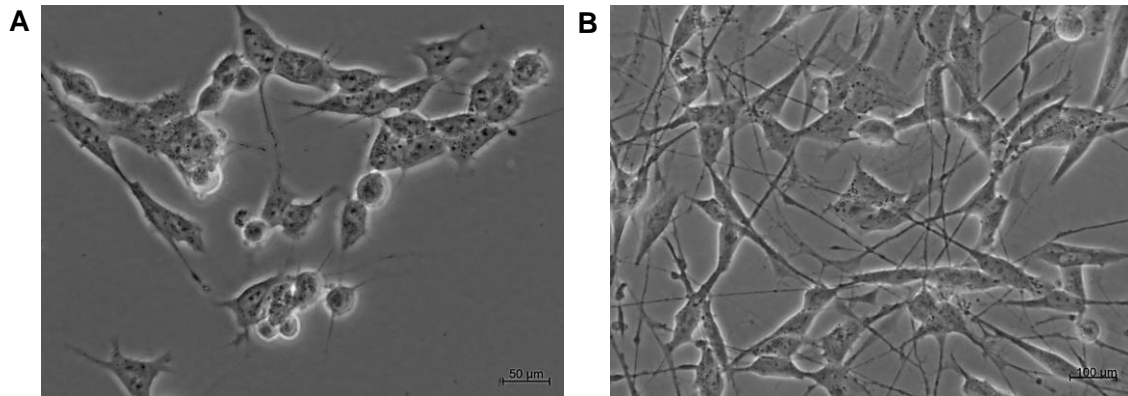


Imagem de contraste de fase de células SH-SY5Y proliferativas em meio de cultura com 10% de SFB (A). Imagem de contraste de fase de células SH-SY5Y diferenciadas com AR 10 μM por 7 dias em meio de cultura com 1% de SFB (B) (Ampliação de 40 \times).

6.2. NEUROTOXICIDADE POR MPP+

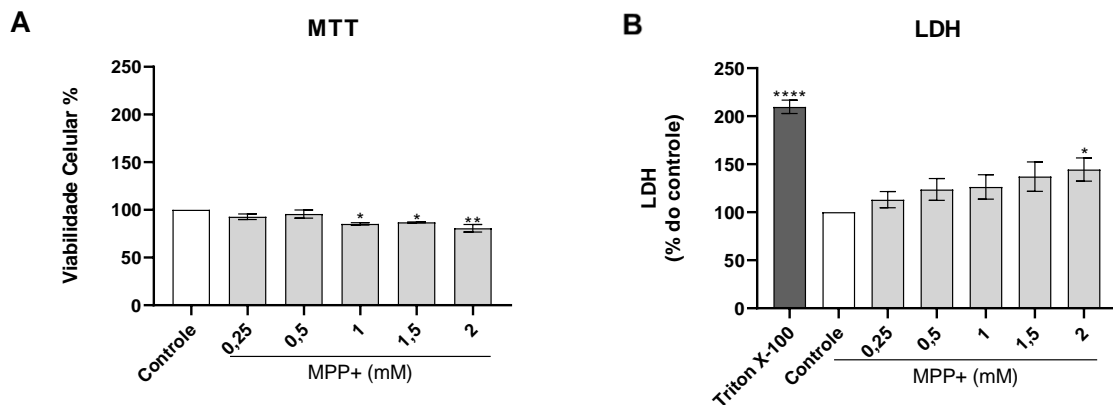
O MPP+ reduziu a viabilidade celular de forma dose-dependente, sendo estatisticamente significativas para as concentrações de 1 mM (85,3%), 1,5 mM (86,9%) e 2 mM (80,7%). A viabilidade para o dano com MPP+ foi analisada pelo ensaio de MTT (Figura 11A).

A liberação de LDH, por sua vez, constitui uma medida inespecífica de dano à membrana. O MPP+ aumentou a liberação de LDH de forma dose-dependente, sendo estatisticamente significativa na concentração de 2 mM (144,4%). Como controle positivo, utilizou-se o Triton X-100 à 10% com liberação de LDH de 209,7% em relação ao controle negativo (células tratadas com PBS) (Figura 11B). A liberação significativa

de LDH em concentrações maiores pode ser um indicativo da ocorrência de necrose associada com apoptose com a persistência do estímulo, mas outros ensaios como a coloração com Anexina V e ensaios morfológicos são necessários para diferenciá-la da apoptose tardia.

A concentração de 2 mM foi selecionada para prosseguir com os estudos por sua atividade significativa tanto no ensaio de MTT quanto de LDH.

Figura 11. Curva dose-resposta para o MPP+ em células SH-SY5Y diferenciadas

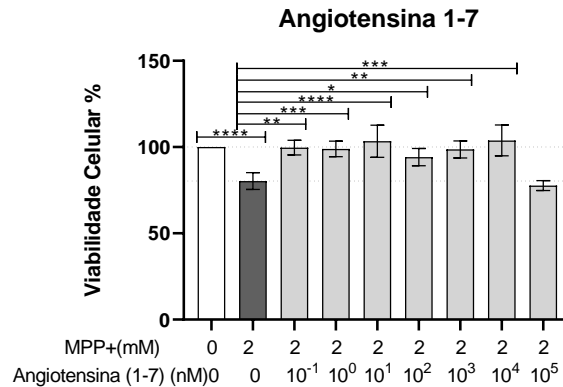


Redução de MTT em células SH-SY5Y após 24 h de exposição a concentrações variáveis de MPP+. A viabilidade celular foi expressa como a proporção dos valores de absorbância (595nm) dos grupos tratados normalizada para o grupo controle. Os dados são expressos como a média \pm SEM de três experimentos independentes em triplicata (**A**). Liberação de lactato desidrogenase em células SH-SY5Y após 24 h de exposição a concentrações variáveis de MPP+. A % de liberação de LDH foi determinada dividindo a absorbância (340nm) dos sobrenadantes pela soma da absorbância do sobrenadante mais o lisado de células seguida pela normalização para o grupo controle. Os dados são expressos como a média \pm SEM de dois experimentos independentes em triplicata (**B**). As significâncias indicadas são mostradas em comparação com o controle. A análise estatística foi realizada pelo software GraphPad Prism versão 8.0 usando one-way ANOVA seguida pelo pós-teste de Dunnett * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

6.3. CURVA DOSE-RESPOSTA DA ANGIOTENSINA- (1-7)

Os resultados mostraram que a Ang- (1-7) (0,1 nM – 10 μ M) protegeu significativamente contra o dano por MPP+ (Figura 12). As concentrações de 1 nM e 10 nM de Ang- (1-7) foram escolhidas para proceder com os estudos de mecanismos pela maior significância estatística.

Figura 12. Efeito da Angiotensina- (1-7) sobre a viabilidade de células SH-SY5Y diferenciadas submetidas ao dano com MPP+



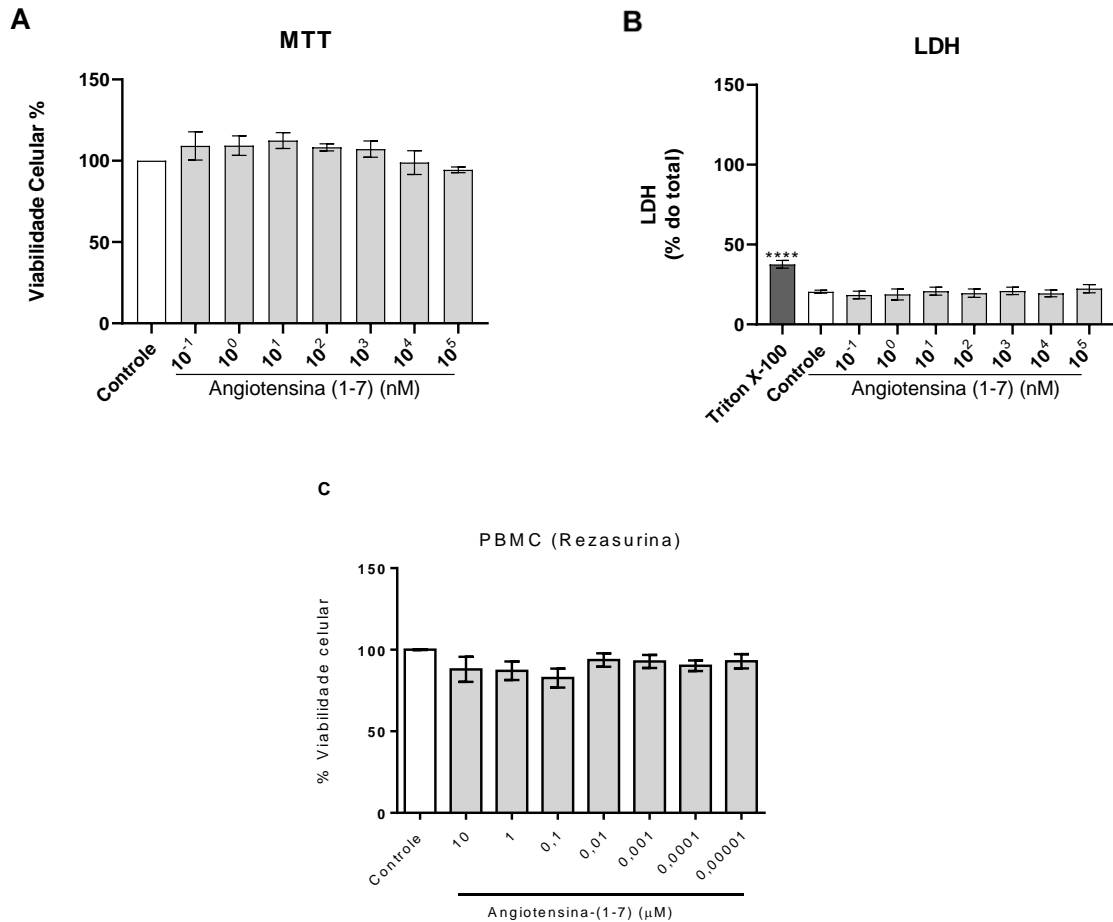
As células foram pré tratadas com as concentrações indicadas de Angiotensina- (1-7) por 24 horas e depois expostas a MPP+ por 24 horas. Os resultados representam a viabilidade celular avaliada pelo ensaio MTT. Os dados são expressos como a média \pm SEM de três experimentos independentes em triplicata. As significâncias indicadas são mostradas em comparação ao MPP+. A análise estatística foi realizada pelo software GraphPad Prism versão 8.0 usando one-way ANOVA seguida pelo pós-teste de Dunnett * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

6.4. ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DA ANGIOTENSINA- (1-7) EM CÉLULAS SH-SY5Y DIFERENCIADAS E EM PBMCs HUMANAS

Os resultados mostraram que a Ang- (1-7) não apresentou atividade antiproliferativa contra células SH-SY5Y diferenciadas tanto no ensaio de MTT (Figura 13A) quanto no ensaio de LDH (Figura 13B) em nenhuma das concentrações testadas, nem tão pouco para as PBMCs humanas (Figura 13C). As concentrações entre 10⁻¹ nM e 10⁴ nM apresentaram tendência em aumentar a viabilidade celular no ensaio de MTT, mas sem diferença estatística.

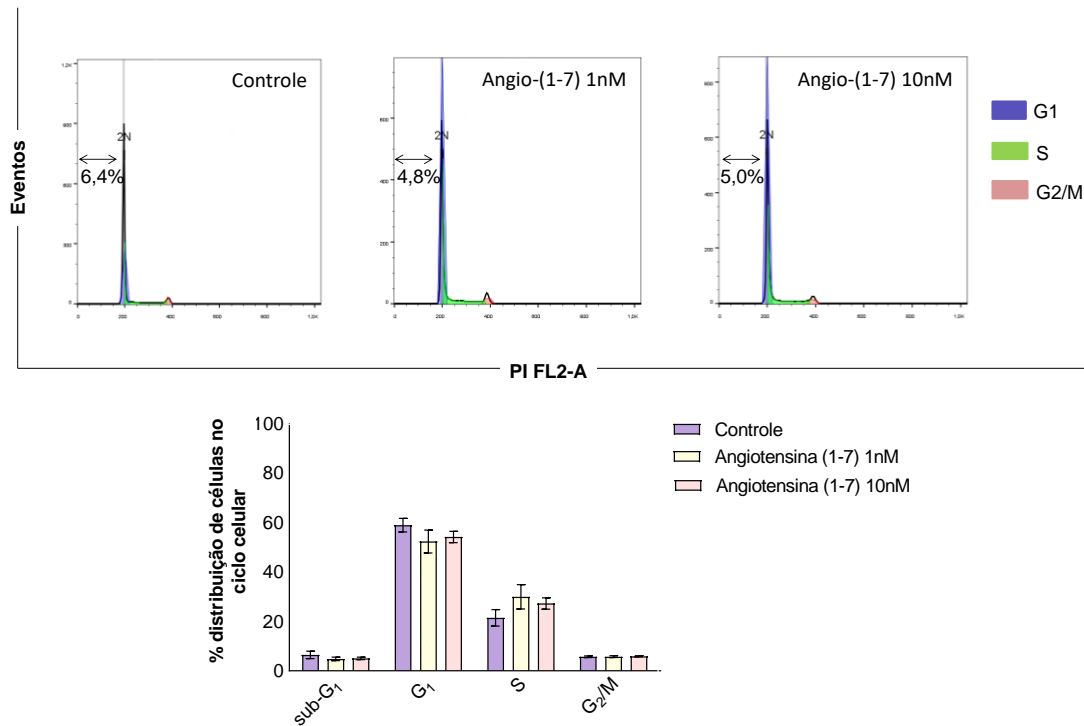
Considerando o efeito protetor da Ang- (1-7) nas concentrações de 1 nM e 10 nM contra o dano por MPP+, e que um dos mecanismos envolvidos na morte de neurônios é a apoptose, avaliou-se o conteúdo de DNA subdiploide como um indicativo de morte por apoptose (RICCARDI & NICOLETTI, 2006). Esta análise pode ser feita por avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo. Os resultados mostram que a Ang- (1-7) nas concentrações de 1 nM e 10 nM não causou alterações em nenhuma fase do ciclo celular e nem induziu fragmentação de DNA em células SH-SY5Y diferenciadas (Figura 14) após 24 horas de incubação, demonstrando que a Ang- (1-7) não apresenta citotoxicidade nestas condições.

Figura 13. Efeito antiproliferativo da Angiotensina- (1-7) em células SH-SY5Y diferenciadas e em PBMCs humanas



Ensaio MTT em células SH-SY5Y após 24 h de exposição com as concentrações indicadas de Angiotensina- (1-7). A viabilidade celular foi expressa como a proporção dos valores de absorvância dos grupos tratados normalizados para o grupo controle. Os dados são expressos como a média \pm SEM de três experimentos independentes em triplicata (A). Liberação de LDH em células SH-SY5Y após 24 h de exposição às concentrações indicadas de Angiotensina- (1-7). A % de liberação de LDH foi determinada dividindo a absorvância dos sobrenadantes pela soma da absorvância do sobrenadante mais do lisado de células x 100. Os dados são expressos como a média \pm SEM de dois experimentos independentes em triplicata. As significâncias indicadas são mostradas em comparação com o controle (B). PBMCs humanas foram incubadas com diferentes concentrações da Angiotensina- (1-7) por 120 horas e a viabilidade celular avaliada por resazurina (n=6) (C). A análise estatística foi realizada pelo software GraphPad Prism versão 8.0 usando one-way ANOVA seguida pelo pós-teste de Dunnett **** p <0,0001.

Figura 14. Efeito da Angiotensina- (1-7) na distribuição do ciclo celular de células SH-SY5Y diferenciadas



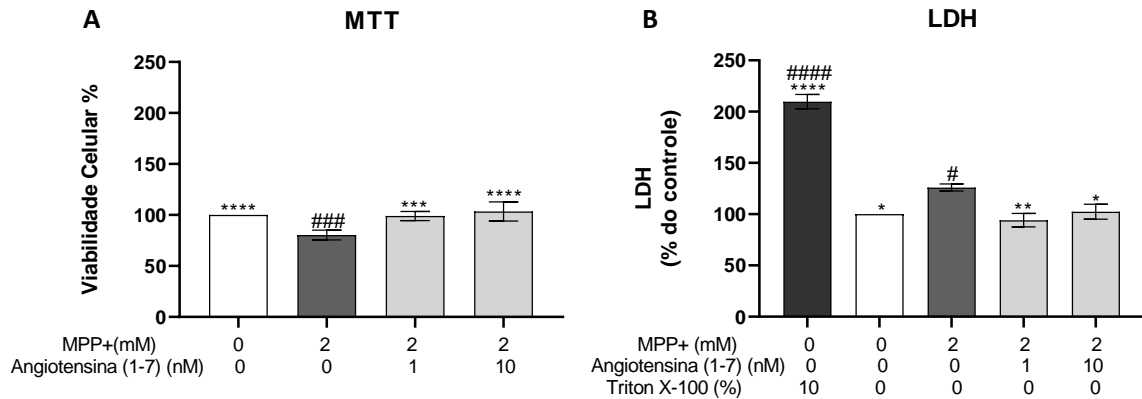
Histogramas representativos da distribuição das células nas diferentes fases do ciclo celular. Os dados foram analisados no programa FlowJo v.10 (A) Quantificação da percentagem de distribuição das células nas fases do ciclo celular (B). Os dados são expressos como a média \pm SEM de três experimentos independentes em duplicata.

6.5. EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM ANGIOTENSINA- (1-7) ISOLADA E ASSOCIADA COM A779 NA VIABILIDADE E INTEGRIDADE DE MEMBRANA DE CÉLULAS SH-SY5Y DIFERENCIADAS SUBMETIDAS AO DANO COM MPP+

A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de MTT (Figura 15A). O MPP+ reduziu a viabilidade celular para 80,6% em relação ao controle, enquanto que o pré tratamento com Ang- (1-7) nas concentrações de 1 nM e 10 nM protegeu contra o dano por MPP+, restabelecendo significativamente a viabilidade celular para 98% e 101,7%, respectivamente. A integridade de membrana foi avaliada pelo ensaio de LDH (Figura 15B). As células submetidas ao dano por MPP+ liberaram 126% de LDH em comparação ao grupo controle (100%), enquanto que o pré tratamento com Ang- (1-7) nas concentrações de 1 nM e 10 nM diminuiu significativamente a liberação de LDH para 94,1% e 102,4%, respectivamente. Utilizou-se Triton 100-X à 10% como controle positivo, apresentando liberação de LDH de 209,7% em relação ao controle.

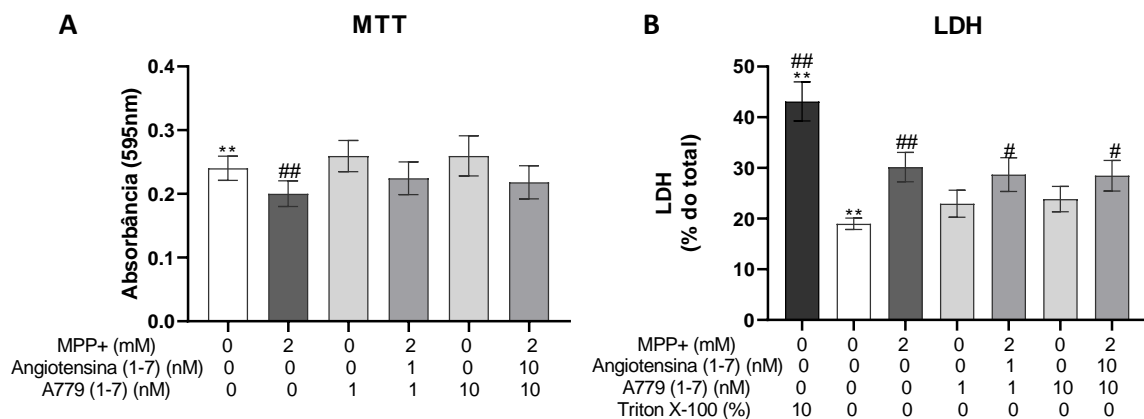
Quando a Ang- (1-7) nas concentrações de 1 nM e 10 nM foi associada com A779, antagonista do MasR, não houve atividade neuroprotetora, observada pelos ensaios de MTT (Figura 16A) e LDH (Figura 16B), indicando participação deste receptor no mecanismo neuroprotetor da Ang- (1-7).

Figura 15. Efeito da Angiotensina- (1-7) contra o dano celular por MPP+ em células SH-SY5Y diferenciadas



As células foram pré-tratadas com as concentrações indicadas de Angiotensina- (1-7) por 24 h e, em seguida, expostas ao MPP+ por 24 h. O ensaio MTT (A) e o ensaio de liberação de lactato desidrogenase (LDH) (B) foram realizados para investigar dano celular. Os dados são expressos como a média \pm SEM de três experimentos independentes em triplicata. As significâncias indicadas são mostradas em comparação ao MPP+ (*) e o controle (#). A análise estatística foi realizada pelo software GraphPad Prism versão 8.0 usando one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Dunnett * # $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** ### $p < 0,001$, #### $p < 0,0001$.

Figura 16. Efeito da Angiotensina- (1-7) isolada e associada a A779 contra o dano celular por MPP+ em células SH-SY5Y diferenciadas

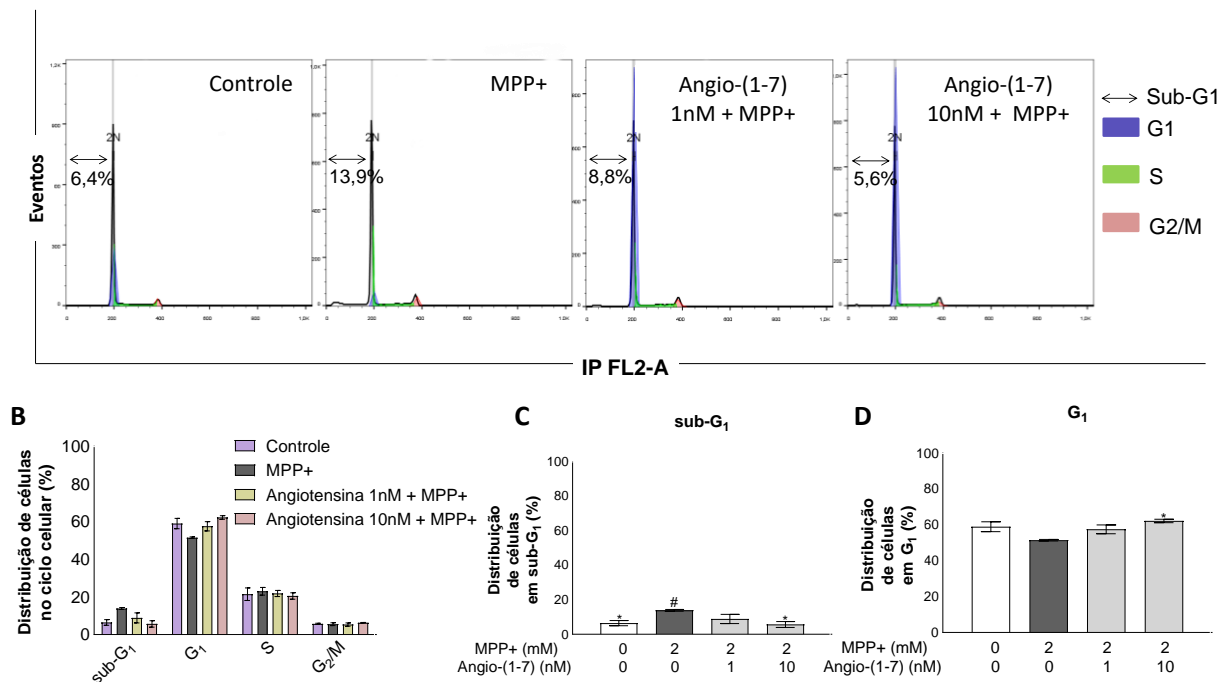


As células foram pré-tratadas com as concentrações indicadas de Angiotensina- (1-7) e A779 por 24 h e, em seguida, expostas a MPP+ por 24h. O ensaio de MTT (A) e o ensaio de LDH (B) foram realizados para investigar dano celular. Os dados são expressos como a média \pm SEM de três experimentos independentes em triplicata. As significâncias indicadas são mostradas em comparação com MPP+ (*) e o controle (#). A análise estatística foi realizada pelo software GraphPad Prism versão 8.0 usando one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Dunnett * # $p < 0,05$, ** ## $p < 0,01$.

6.6. EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM ANGIOTENSINA- (1-7) ISOLADA E ASSOCIADA COM A779 NA PROGRESSÃO DO CICLO CELULAR E AVALIAÇÃO DO CONTEÚDO DE DNA SUBDIPLOIDE EM CÉLULAS SH-SY5Y DIFERENCIADAS SUBMETIDAS AO DANO COM MPP+

A fragmentação de DNA constitui uma das características da célula em apoptose. Os resultados mostraram que o MPP+ significativamente induziu 13,9% de fragmentação de DNA, contra 6,4% do controle de células (Figura 17C). O pré-tratamento com Ang- (1-7) na concentração de 10 nM reduziu significativamente a fragmentação de DNA por MPP+ para 5,6%.

Figura 17. Efeito da Angiotensina- (1-7) na progressão do ciclo celular de células SH-SY5Y diferenciadas e submetidas ao dano por MPP+



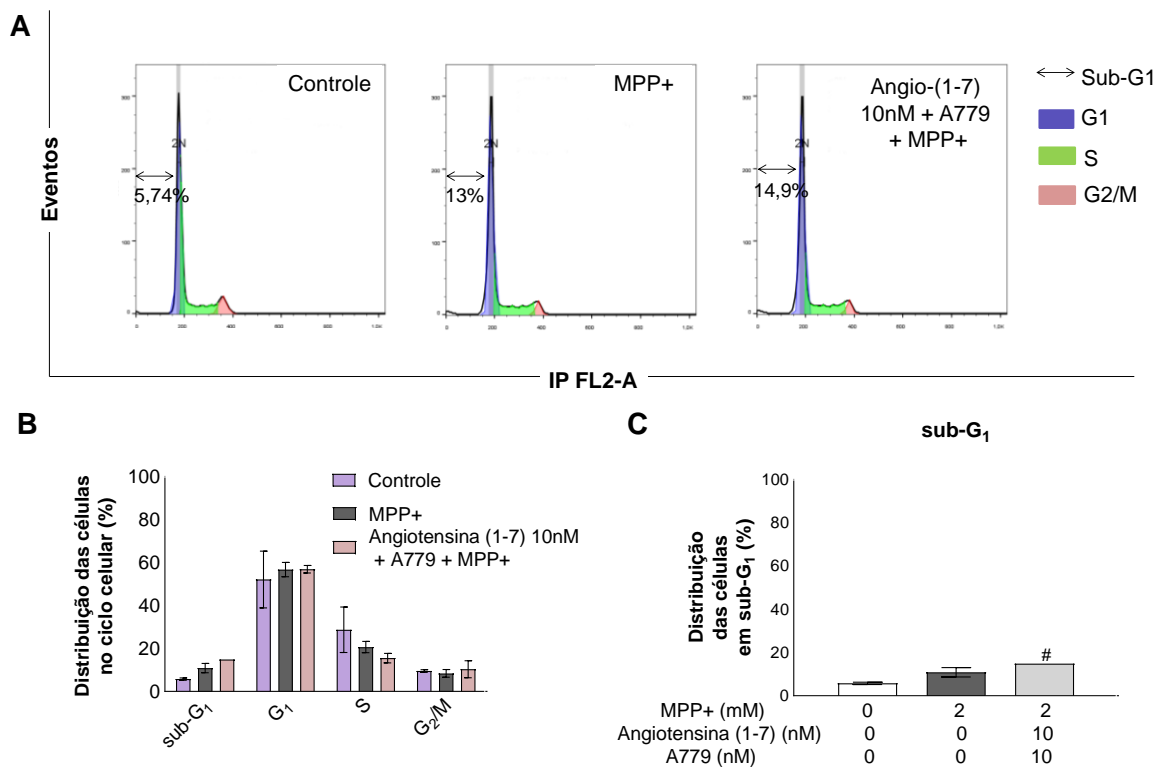
As células foram pré-tratadas com as concentrações indicadas de Angiotensina- (1-7) por 24h e, em seguida, expostas a MPP+ por 24h. Histogramas representativos da distribuição das células nas diferentes fases do ciclo celular (A). Os dados foram analisados no programa FlowJo v.10. Quantificação da percentagem de distribuição de células nas fases do ciclo celular (B). Análise comparativa do efeito da Angiotensina-(1-7) em relação ao Controle (#) e MPP+ (*) nas fases sub-G₁ (C) e G₁ (D). Os dados são expressos como a média ± SEM de três experimentos independentes em duplicata. A análise estatística foi realizada pelo software GraphPad Prism versão 8.0 usando one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Dunnett * # p <0,05.

A fase G₁ do ciclo celular corresponde ao intervalo entre a mitose e a iniciação da replicação do DNA. Durante a fase G₁, a célula é metabolicamente ativa e cresce

continuamente, mas não replica seu DNA. Para muitas células, esta fase é o maior período de crescimento celular durante a sua vida útil (JOSEPH *et al.*, 2020). O pré-tratamento com 10 nM de Ang- (1-7) aumentou a porcentagem de células em G1 para 62,2%, significativamente maior que células submetidas apenas ao dano com MPP+ (Figura 17D).

A associação de A779 com Ang- (1-7), por sua vez, aumentou significativamente a porcentagem de células em sub-G₁ em relação ao controle. O MPP+, por sua vez, não repetiu os resultados anteriores, possivelmente por apoptose, ao contrário dos ensaios de viabilidade (MTT e LDH), necessitarem de concentrações mais altas de MPP+, o que não tínhamos disponível em grande quantidade no laboratório (Figura 18).

Figura 18. Efeito da Angiotensina- (1-7) associada com A779 na progressão do ciclo celular de células SH-SY5Y diferenciadas submetidas ao dano por MPP+

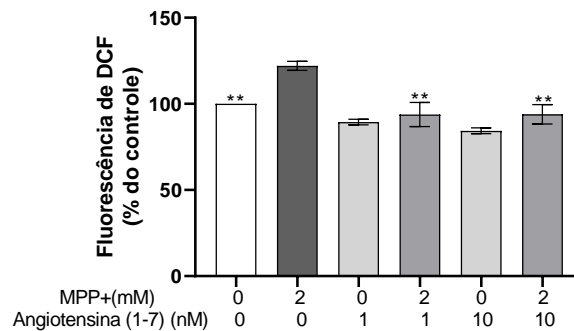


As células foram pré-tratadas com as concentrações indicadas de Angiotensina- (1-7) e A779 por 24 h e, em seguida, expostas a MPP+ por 24h. Histogramas representativos da distribuição das células nas diferentes fases do ciclo celular. Os dados foram analisados no programa FlowJo v.10 (A). Quantificação da porcentagem de células nas fases do ciclo celular (B). Análise comparativa do efeito da Angiotensina- (1-7) associada com A779 em relação ao controle (#) na fase sub-G₁ (C). Os dados são expressos como a média \pm SEM de dois experimentos independentes em triplicata. A análise estatística foi realizada pelo software GraphPad Prism versão 8.0 usando one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Dunnett # $p < 0,05$.

6.7. EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM ANGIOTENSINA- (1-7) ISOLADA E ASSOCIADA COM A779 SOB O ESTRESSE OXIDATIVO

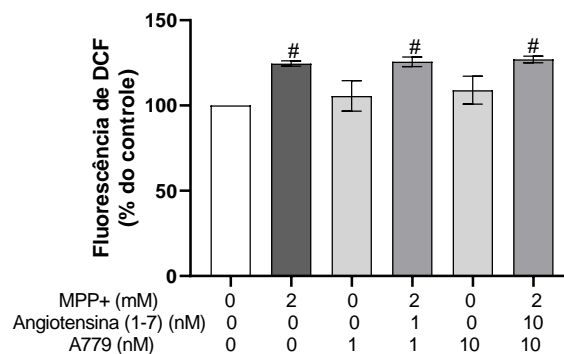
Os níveis de EROs foram avaliados pela sonda DCF-DA. Os resultados mostram que o MPP+ aumentou a produção de EROs para 122% comparado com o controle (100%) e o pré tratamento com Ang- (1-7) nas concentrações de 1 nM e 10 nM diminuiu a produção de EROs por MPP+ para 93,8% e 94%, respectivamente (Figura 19). A associação de A779 com Ang- (1-7), por sua vez, não apresentou efeito antioxidante (Figura 20).

Figura 19. Efeito da Angiotensina- (1-7) na produção de EROs induzida por MPP+ em células SH-SY5Y diferenciadas



As células foram pré-tratadas com as concentrações indicadas de Angiotensina- (1-7) por 24h e, em seguida, expostas a MPP+ por 24h. A Angiotensina- (1-7) reduziu significativamente a produção de EROs induzida por MPP+ usando coloração fluorescente DCFDA. Os dados são expressos como a média \pm SEM de três experimentos independentes em triplicata. As significâncias indicadas são mostradas em comparação com MPP+. A análise estatística foi realizada pelo software GraphPad Prism versão 8.0 usando one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Dunnett ** p < 0,01.

Figura 20. Efeito da Angiotensina- (1-7) associada com A779 na produção de EROs induzida por MPP+ em células SH-SY5Y diferenciadas



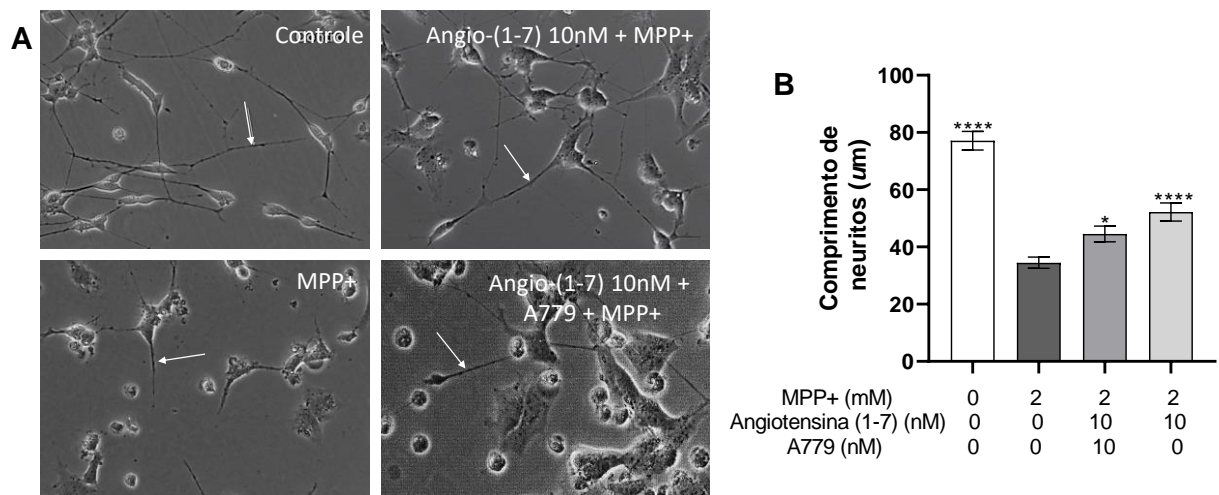
As células foram pré-tratadas com as concentrações indicadas de Angiotensina- (1-7) e A779 por 24 h e, em seguida, expostas a MPP+ por 24 h. Os dados são expressos como a média \pm SEM de três experimentos independentes em triplicata. As significâncias indicadas são mostradas em comparação com o controle. A análise

estatística foi realizada pelo software GraphPad Prism versão 8.0 usando one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Dunnett # $p < 0,05$.

6.8. EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM ANGIOTENSINA- (1-7) ISOLADA E ASSOCIADA COM A779 NO TAMANHO DE NEURITOS DE CÉLULAS SH-SY5Y DIFERENCIADAS SUBMETIDAS AO DANO COM MPP+

Os resultados mostram que o tratamento com MPP+, reduziu significativamente o comprimento dos neuritos para uma média de 34,5 μm em comparação com o controle (77,2 μm). O pré tratamento com Ang- (1-7) à 10 nM, por sua vez, restabeleceu parcialmente a média do comprimento dos neuritos para 52,2 μm (Figura 21).

Figura 21. Efeito da Angiotensina- (1-7) isolada e associada com A779 no tamanho de neuritos de células SH-SY5Y diferenciadas



As células foram pré-tratadas com as concentrações indicadas de Angiotensina- (1-7) e A779 por 24 horas e, em seguida, expostas a MPP+ por 24 horas. Imagens representativas (Ampliação 40x) (A). Comprimento dos neuritos (μm) (B). Os dados são expressos como a média \pm SEM de três experimentos independentes ($n = 30$). As significâncias indicadas são mostradas em comparação com MPP+. A análise estatística foi realizada pelo software GraphPad Prism versão 8.0 usando one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Dunnett **** $p < 0,0001$, * $p < 0,05$.

A associação de A779 com Ang- (1-7) reverteu parcialmente o efeito da Ang- (1-7), diminuindo significativamente a média de crescimento dos neuritos para 44,6 μm .

7. DISCUSSÃO

Nas últimas duas décadas, os componentes do SRA clássico foram identificados em muitas regiões cerebrais despertando interesse de muitos estudos com o objetivo de explorar suas funções biológicas centrais (SANTOS *et al.*, 1988; STORNETTA *et al.*, 1988). Inicialmente, o SRA cerebral foi associado a áreas cerebrais envolvidas no controle central da pressão arterial (ABIODUN & OLA, 2020). Entretanto, mais recentemente, diversos estudos mostraram o seu envolvimento em vários distúrbios cerebrais, incluindo doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer e a DP (CAO *et al.*, 2019; JOGLAR *et al.*, 2009; PASSOS-SILVA; VERANO-BRAGA & SANTOS, 2013; ZHOU & YONG *et al.*, 2018).

Em relação à DP, a maioria dos estudos concentraram-se em determinar os efeitos deletérios do eixo Ang II / AT1R na patogênese da doença. Este eixo demonstrou aumentar o estresse oxidativo, a neuroinflamação e apoptose celular de células dopaminérgicas (GAO *et al.*, 2017; PAREKH; ROBIDOUX & SRIRAMULA, 2020). Recentemente, o eixo Ang- (1-7) / MasR foi sugerido como neuroprotetor devido sua propriedade antioxidante e anti-inflamatória e por agir de forma antagônica à principais ações exercidas pelo eixo Ang II / AT1R em muitas condições (DE CARVALHO SANTUCHI *et al.*, 2019; JIANG *et al.*, 2012).

Os estudos realizados por COSTA-BESADA *et al.* (2018) foram os pioneiros em investigar o papel do eixo Ang- (1-7) / MasR no sistema dopaminérgico. Os pesquisadores mostraram a presença do eixo Ang- (1-7) / MasR na substância nigra de modelos animais, tecido humano, em neurônios dopaminérgicos e células gliais cultivadas de controles humanos saudáveis e pacientes com DP. Eles também mostraram que o eixo Ang- (1-7) / Mas neutraliza os efeitos pró-oxidativos do eixo Ang II / AT1, que demonstrou anteriormente aumentar a progressão da neurodegeneração em modelos de DP. Além disso, o eixo Ang- (1-7) / MasR foi regulado negativamente na substância nigra com o envelhecimento, o principal fator de risco para DP.

Neste estudo em questão foi avaliado o potencial neuroprotetor *in vitro* da Ang- (1-7) sobre a toxicidade induzida por MPP+ na linha neuronal dopaminérgica diferenciada SH-SY5Y derivada de neuroblastoma humano.

O protocolo de neuroproteção em *in vitro* tem sido amplamente utilizado como ferramenta que possibilita a simulação de eventos moleculares que ocorrem durante a DP. Neste contexto, as células neuronais imortalizadas e culturas primárias são utilizadas principalmente para ensaios de neurotoxicidade e como modelo viável para testar o potencial neuroprotetor de novos agentes terapêuticos (FALKENBURGER, BJÖRN H.; SARIDAKI & DINTER, 2016; FAROOQUI & FAROOQUI, 2017).

Nossos primeiros resultados mostraram que o pré-tratamento de células SH-SY5Y com Ang- (1-7) protegeu contra a morte celular por MPP+ através de dois métodos distintos (MTT e LDH). Tal efeito protetor foi completamente abolido quando as células foram tratadas com Ang- (1-7) + A779, demonstrando assim que o efeito alcançado pela Ang- (1-7), neste modelo, é dependente do MasR.

Estudos na literatura até o momento tem avaliado o efeito neuroprotetor da Ang- (1-7) após insulto neurotóxico em modelos *in vitro* e *in vivo*. Este estudo é o primeiro a avaliar o potencial neuroprotetor da Ang- (1-7) contra a toxicidade por MPP+ em células SH-SY5Y. GAO *et al.* (2021) mostraram que a infusão de Ang- (1-7) alivia comportamentos parkinsonianos característicos da DP e reduz apoptose e agregação de α -sinucleína na substância nigra de animais tratados com rotenona. Eles também mostraram que a Ang- (1-7) aumentou a remoção de α -sinucleína e a autofagia de neurônios dopaminérgicos primários tratadas com rotenona. RABIE *et al.* (2018), por sua vez, mostraram que a administração intra-estriatal de Ang- (1-7), usando um modelo de DP de 6-OHDA, melhorou o desempenho motor e a coordenação muscular. A nível molecular, a Ang- (1-7) regulou positivamente a expressão estriatal de MasR, de TH e DA. Além disso, Ang- (1-7) inibiu o eixo Ang II / AT1R, suprimindo a inflamação e o estresse oxidativo.

Estes estudos utilizaram metodologia *in vivo*, que é bastante útil para estudos do dinamismo das estruturas cerebrais. Os estudos *in vitro*, como o nosso, são necessários para analisar os efeitos de determinado agente, sob uma estrutura isolada. Desta forma, nossos resultados agregam aos estudos citados, mecanismos utilizados pela Ang- (1-7) em células SH-SY5Y submetidas à toxicidade por MPP+, isoladamente, o que pode ser bastante útil para os estudos das respostas moleculares.

Os estudos anteriores mostram que o dano neural após tratamento com MPP⁺ ocorre pela ativação da via intrínseca da apoptose. O MPP⁺ é transportado para os neurônios dopaminérgicos por DAT e concentra-se na mitocôndria, impedindo os elétrons provenientes do NADH de entrarem na CTE, o que resulta na incapacidade de produzir ATP a partir da oxidação do NADH. A depleção de ATP levando à perda do $\Delta\Psi_m$ contribui para a morte em neurônios dopaminérgicos (KALIVENDI *et al.*, 2003)

Nosso trabalho mostrou que o pré-tratamento com Ang- (1-7) reduziu a fragmentação de DNA por MPP⁺ que foi avaliada como uma medida indireta de apoptose celular.

As pesquisas conduzidas por GAO *et al.* (2021) em neurônios dopaminérgicos primários extraídos do mesencéfalo ventral investigaram mais a fundo, mostrando que a Ang-(1-7) reverteu o aumento de caspase 3 induzida por rotenona, outra neurotoxina que inibe enzimas do CI da CTE.

Alguns estudos sugerem que a morte celular induzida por MPP⁺ envolve múltiplos mecanismos, e não apenas a inibição do CI (KALIVENDI *et al.*, 2003; NAKAMURA *et al.*, 2000). Um mecanismo primário alternativo que contribui para a toxicidade pode ser a geração de estresse oxidativo por EROs, possivelmente através do fluxo de elétrons alterado em direção ao oxigênio em uma subunidade do CI (KRUG *et al.*, 2014). As pesquisas realizadas por CASSARINO *et al.* (1997) detectaram aumentos significativos de EROs e de atividade de enzimas antioxidantes em células SH-SY5Y tratadas com o metabólito tóxico MPP⁺, atingindo o pico após 6-12 horas e declinando para perto da linha de base após 48 horas de exposição. Esses dados são inconsistentes com nosso estudo que evidenciou o pico de EROs após 3 horas de incubação com MPP⁺ (dados não mostrados).

O estresse oxidativo é cada vez mais sugerido como um evento central que contribui para a degeneração dos neurônios dopaminérgicos na patogênese da DP (PUSPITA; CHUNG & SHIM, 2017). Portanto, o manejo adequado de EROs e enzimas antioxidantes podem representar um alvo terapêutico para reduzir a degeneração neuronal.

As pesquisas realizadas por ZHOU & YONG *et al.* (2018) mostram que a Ang- (1-7) (100 nM) diminuiu EROs produzidas por rotenona em células CATH. Além disso, a Ang- (1-7) aumentou a atividade das enzimas antioxidantes SOD e GSH. RABIE *et al.* (2018), por sua

vez, mostrou que Ang- (1-7) diminuiu substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) formadas como um subproduto da peroxidação lipídica e NADPH oxidase aumentadas em modelo animal de neurotoxicidade por 6-OHDA. Esses efeitos foram completamente abolidos por A779.

Nosso trabalho mostrou que o tratamento com Ang- (1-7) diminuiu, significativamente, os níveis de EROs após dano por MPP+ em células SH-SY5Y. Além disso, este efeito foi abolido pelo A-779, o que permite inferir que tal ação é dependente do MasR. Neste trabalho, utilizou-se a sonda DCF-DA que pode ser usada para mensurar especificamente a concentração de H₂O₂ e radical O₂•- (CURTIN; DONOVAN & COTTER, 2002; LEBEL; ISCHIROPOULOS & BONDY, 1992).

O radical O₂•- e H₂O₂ representam as principais EROs produzidas durante a fosforilação oxidativa, e sua geração é substancialmente aumentada quando a CTE é prejudicada em mitocôndrias disfuncionais. O O₂•- ao contrário da maioria dos radicais livres, é inativo em meio aquoso, mas é capaz de reagir rapidamente com o óxido nítrico (NO) para formar o potente oxidante e agente nitrante ONOO- e subsequentemente outras RNOs. O H₂O₂, por sua vez, tem vida longa e é capaz de atravessar membranas lipídicas. Como uma espécie redox ativa, o H₂O₂ pode inativar enzimas oxidando seus grupos tiol, embora seja incapaz de oxidar DNA ou lipídios diretamente. Se não for removido, é capaz de transpor facilmente as membranas celulares e gerar radical hidroxila (OH•), conforme a reação de Fenton: $M^{n+} + H_2O_2 \rightarrow M^{(n+1)+} + OH\cdot + OH^-$. O radical OH• é o mais deletério ao organismo, já que possui meia-vida curta, podendo danificar praticamente todos os tipos de macromoléculas. Além disso, ao contrário do radical O₂•- e do H₂O₂, que podem ser desintoxicados por uma conversão enzimática, nenhuma rota enzimática é conhecida para eliminar radicais OH• (PUSPITA; CHUNG & SHIM, 2017).

A oxidação dos componentes da membrana incluindo canais iônicos e receptores por EROs resultam no aumento de permeabilidade da membrana. O influxo aumentado de cálcio resulta em aumento da produção de EROs, disfunção das mitocôndrias, desestabilização dos microtúbulos e interrupção do sistema de transporte axonal, conduzindo a célula para degeneração dos neuritos. A degeneração dos neuritos pode preceder até mesmo a morte celular (FUKUI, 2016).

Neste trabalho, o pré-tratamento com Ang- (1-7) protegeu contra a degeneração dos neuritos por MPP+, enquanto que a associação de A779 com Ang- (1-7) reduziu este efeito. Contudo, o exato mecanismo pelo qual a Ang- (1-7) reduz o efeito degenerativo induzido pelo MPP+ aqui descrito, precisa ser melhor investigado com métodos mais sofisticados para confirmação destes achados.

Um achado importante deste estudo é que a Ang- (1-7) desempenhou um efeito neuroprotetor significativo contra o estresse oxidativo induzido por MPP+. Essas observações fornecem novas perspectivas para a compreensão completa desse sistema, mais claramente, os mecanismos envolvidos na neuroproteção pela Ang- (1-7) em outros modelos de neuroproteção e DP. Estudos *in vivo* são importantes para o avaliar o dinamismo das interações celulares, logo, tais estudos são necessários. Além disso, o emprego de animais transgênicos pode ser uma ferramenta útil para responder, com mais precisão, questões relacionadas ao receptor e ligações inespecíficas.

Esse estudo apresentou muitas limitações. Primeiro, células SH-SY5Y continuaram a proliferar mesmo diferenciadas com AR pelo que é difícil estabelecer se a Ang- (1-7) influenciou a taxa de divisão ou a morte celular. Segundo, não foram avaliados marcadores neuronais de células maduras nas células SH-SY5Y, expressão de MasR e neurotoxicidade do MPP+ em concentrações mais altas devido à falta de reagentes e às limitações impostas pela pandemia. Terceiro, embora a meia-vida da Ang- (1-7) *in vitro* não seja conhecida, ela é rapidamente clivada por peptidases. Os estudos *in vivo* demonstraram meia-vida muito curta (~30 min em humanos e 20s em roedores), o que sugere que o pré-tratamento por 24 horas, embora também realizado por ZHOU & YONG *et al.* (2018) pode não ter sido o ideal. Quarto, é importante ressaltar o grande número de estudos clínicos que falharam em reproduzir os resultados obtidos em modelos pré-clínicos que usam neurotoxinas exógenas em geral em estudos da DP. A razão para isso pode ser o fato de que as neurotoxinas exógenas não replicam o que acontece com a doença. A degeneração de neurônios dopaminérgicos nigroestriatais contendo neuromelanina é um processo muito lento, de tal forma que muitos anos se passam antes que os sintomas motores apareçam, além de que a progressão da doença também é muito lenta (Braak) (BERNHEIMER *et al.*, 1973; NANDIPATI & LITVAN, 2016).

8. CONCLUSÃO

O presente estudo permite concluir que, no modelo experimental proposto, o tratamento com Ang- (1-7) foi capaz de proteger células SH-SY5Y contra o dano por MPP+. Esses achados apoiam a ideia de que o eixo Ang- (1-7) / MasR deve ser incluído como um alvo farmacológico potencial contra lesão oxidativa em modelos mais complexos de neuroproteção e DP.

9. BIBLIOGRAFIA

ABIODUN, O. A.; OLA, M. S. Role of brain renin angiotensin system in neurodegeneration: An update. *Saudi Journal of Biological Sciences*, v. 27, n. 3, p. 905–912, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.01.026>>.

ALAM, P. *et al.* A-Synuclein Oligomers and Fibrils: a Spectrum of Species, a Spectrum of Toxicities. *Journal of Neurochemistry*, v. 150, n. 5, p. 522–534, 2019.

ALBERIO, T.; LOPIANO, L.; FASANO, M. Cellular models to investigate biochemical pathways in Parkinson's disease. *FEBS Journal*, v. 279, n. 7, p. 1146–1155, 2012.

ALBRECHT, D. Angiotensin-(1-7)-induced plasticity changes in the lateral amygdala are mediated by COX-2 and NO. *Learning and Memory*, v. 14, n. 3, p. 177–184, 2007.

ANGELOVA, P. R. *et al.* Lipid Peroxidation is essential for α -synuclein-induced cell death. *Journal of Neurochemistry*, v. 133, p. 582–589, 2015.

ARENDSE, L. B. *et al.* Novel therapeutic approaches targeting the renin-angiotensin system and associated peptides in hypertension and heart failure. *Pharmacological Reviews*, v. 71, n. 4, p. 539–570, 2019.

ARMSTRONG, M. J.; OKUN, M. S. Diagnosis and Treatment of Parkinson Disease: A Review. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, v. 323, n. 6, p. 548–560, 2020.

ATHAUDA, D.; FOLTYNIE, T. The ongoing pursuit of neuroprotective therapies in Parkinson disease. *Nature Reviews Neurology*, v. 11, n. 1, p. 25–40, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrneurol.2014.226>>.

BENNION, D. M. *et al.* Neuroprotective Mechanisms of the ACE2–Angiotensin-(1-7)–Mas Axis in Stroke. *Current Hypertension Reports*, v. 17, n. 2, p. 1–16, 2015.

BERNHEIMER, H. *et al.* Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington Clinical, morphological and neurochemical correlations. *Journal of the Neurological Sciences*, v. 20, n. 4, p. 415–455, 1973.

BILLINGSLEY, K. J. *et al.* Genetic risk factors in Parkinson's disease. *Cell and Tissue Research*, v. 373, n. 1, p. 9–20, 2018.

BLANDINI, F.; PORTER, R. H. P.; GREENAMYRE, J. T. Glutamate and Parkinson's disease. *Molecular Neurobiology*, v. 12, n. 1, p. 73–94, 1996.

BLOCK, M. L.; ZECCA, L.; HONG, J. S. Microglia-mediated neurotoxicity: Uncovering the molecular mechanisms. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 8, n. 1, p. 57–69, 2007.

CACABELOS, R. Parkinson's disease: From pathogenesis to pharmacogenomics. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 18, n. 3, 2017.

CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J. *et al.* Cardiovascular effects of angiotensin-(1-7) injected into the dorsal medulla of rats. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, v. 257, n. 1, 1989.

CAO, C. *et al.* Chronic Angiotensin 1-7 infusion prevents angiotensin-II-induced cognitive dysfunction and skeletal muscle injury in a mouse model of alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, v. 69, n. 1, p. 297–309, 2019.

CAO, S. S.; KAUFMAN, R. J. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress in cell fate decision and human disease. *Antioxidants and Redox Signaling*, v. 21, n. 3, p. 396–413, 2014.

CASSARINO, D. S. *et al.* Elevated reactive oxygen species and antioxidant enzyme activities in animal and cellular models of Parkinson's disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, v. 1362, n. 1, p. 77–86, 1997.

CHAPPELL, M. C. *et al.* Identification of angiotensin-(1-7) in rat brain. Evidence for differential processing of angiotensin peptides. *Journal of Biological Chemistry*, v. 264, n. 28, p. 16518–16523, 1989. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)84737-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258(19)84737-3)>.

CHARTIER-HARLIN, M.-C. *et al.* α -synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. *Lancet*, v. 364, p. 1167–1169, 2004.

CHIA, S. J.; TAN, E.; CHAO, Y. Historical Perspective : Models of Parkinson ' s Disease. p. 1–14, 2020.

COELHO, M. S. *et al.* High sucrose intake in rats is associated with increased ACE2 and

angiotensin-(1-7) levels in the adipose tissue. *Regulatory Peptides*, v. 162, n. 1–3, p. 61–67, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.regpep.2010.03.008>>.

COSTA-BESADA, M. A. *et al.* Paracrine and Intracrine Angiotensin 1-7/Mas Receptor Axis in the Substantia Nigra of Rodents, Monkeys, and Humans. *Molecular Neurobiology*, v. 55, n. 7, p. 5847–5867, 2018.

CURTIN, J. F.; DONOVAN, M.; COTTER, T. G. Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. *Journal of Immunological Methods*, v. 265, n. 1–2, p. 49–72, 2002.

DAGUR, P. K.; MCCOY, J. P. Collection, storage, and preparation of human blood cells. *Current Protocols in Cytometry*, v. 73, p. 5.1.1-5.1.16, 2015.

DE CARVALHO SANTUCHI, M. *et al.* Angiotensin-(1-7) and Alamandine Promote Anti-inflammatory Response in Macrophages in Vitro and in Vivo. *Mediators of Inflammation*, v. 2019, 2019.

DEAS, E. *et al.* Alpha-Synuclein Oligomers Interact with Metal Ions to Induce Oxidative Stress and Neuronal. v. 24, n. 7, p. 376–391, 2016.

DENIAUD, A. *et al.* Endoplasmic reticulum stress induces calcium-dependent permeability transition, mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis. *Oncogene*, v. 27, n. 3, p. 285–299, 2008.

DEZSI, L.; VECSEI, L. Monoamine Oxidase B Inhibitors in Parkinson's Disease. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, v. 16, n. 4, p. 425–439, 2017.

DU, J. J.; CHEN, S. DI. Current nondopaminergic therapeutic options for motor symptoms of parkinson's disease. *Chinese Medical Journal*, v. 130, n. 15, p. 1856–1866, 2017.

FALKENBURGER, B. H.; SCHULZ, J. B. Limitations of cellular models in Parkinson's disease research. *Journal of Neural Transmission, Supplement*, n. 70, p. 261–268, 2006.

FALKENBURGER, BJÖRN H.; SARIDAKI, T.; DINTER, E. Cellular models for Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*, v. 139, p. 121–130, 2016.

FAROOQUI, T.; FAROOQUI, A. A. *Neuroprotective effects of garlic in model systems of neurodegenerative diseases*. [S.l.]: Elsevier Inc., 2017. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-811959-4.00016-X>>.

FERRAZ, H. B. Agonistas Dopaminérgicos no tratamento da Doença de Parkinson. *Revista Neurociências*, v. 12, p. 192–197, 2004.

FOLLMER, C. *et al.* Oligomerization and membrane-binding properties of covalent adducts formed by the interaction of α -synuclein with the toxic dopamine metabolite 3,4-dihydroxyphenylacetaldehyde (DOPAL). *Journal of Biological Chemistry*, v. 290, n. 46, p. 27660–27679, 2015.

FONNUM, F. Glutamate: A Neurotransmitter in Mammalian Brain. *Journal of Neurochemistry*, v. 42, n. 1, p. 1–11, 1984.

FOUNTAIN, J. H.; LAPPIN, S. L. Physiology, Renin Angiotensin System. *StatPearls*, p. 5–7, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29261862>>.

FOX, J. L.; MACFARLANE, M. Targeting cell death signalling in cancer: Minimising “Collateral damage”. *British Journal of Cancer*, v. 115, n. 1, p. 5–11, 2016.

FOX, S. H. *et al.* International Parkinson and movement disorder society evidence-based medicine review: Update on treatments for the motor symptoms of Parkinson’s disease. *Movement Disorders*, v. 33, n. 8, p. 1248–1266, 2018.

GAKI, G. S.; PAPAVALASSIOU, A. G. Oxidative stress-induced signaling pathways implicated in the pathogenesis of Parkinson’s disease. *NeuroMolecular Medicine*, v. 16, n. 2, p. 217–230, 2014.

GALLAGHER, P. E.; TALLANT, E. A. Inhibition of human lung cancer cell growth by angiotensin-(1-7). *Carcinogenesis*, v. 25, n. 11, p. 2045–2052, 2004.

GAO, Q. *et al.* Angiotensin-(1–7) reduces α -synuclein aggregation by enhancing autophagic activity in Parkinson’s disease. *Neural Regen Res*, v. 17, n. 5, p. 1138–1145, 2021.

GAO, Q. *et al.* Azilsartan ameliorates apoptosis of dopaminergic neurons and rescues characteristic parkinsonian behaviors in a rat model of Parkinson’s disease. *Oncotarget*, v. 8, n. 15, p. 24099–24109, 2017.

GARCÍA-DOMÍNGUEZ, I. *et al.* Peripheral Inflammation Enhances Microglia Response and

Nigral Dopaminergic Cell Death in an in vivo MPTP Model of Parkinson's Disease. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, v. 12, n. November, p. 1–16, 2018.

GARCIA-RUIZ, P. J. *et al.* Impulse control disorder in patients with Parkinson's disease under dopamine agonist therapy: A multicentre study. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, v. 85, n. 8, p. 841–845, 2014.

GELDERS, G.; BAEKELANDT, V.; VAN DER PERREN, A. Linking neuroinflammation and neurodegeneration in parkinson's disease. *Journal of Immunology Research*, v. 2018, 2018.

GOODMAN; GILMAN. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. [S.l: s.n.], 2012.

GUO, L. *et al.* Angiotensin-(1-7) attenuates angiotensin II-induced cardiac hypertrophy via a Sirt3-dependent mechanism. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, v. 312, n. 5, p. H980–H991, 2017.

HARMS, A. S. *et al.* Peripheral Monocyte Entry is Required for Alpha-Synuclein Induced Inflammation and Neurodegeneration in a Model of Parkinson Disease. *Exp Neurol*, v. 300, p. 179–187, 2018.

HELLNER, K. *et al.* Angiotensin-(1-7) enhances LTP in the hippocampus through the G-protein-coupled receptor Mas. *Molecular and Cellular Neuroscience*, v. 29, n. 3, p. 427–435, 2005.

HENCHCLIFFE, C.; BEAL, F. M. Mitochondrial biology and oxidative stress in Parkinson disease pathogenesis. *Nature Clinical Practice Neurology*, v. 4, n. 11, p. 600–609, 2008.

HERNANDEZ, D. G.; REED, X.; SINGLETON, A. B. Genetics in Parkinson disease: Mendelian versus non-Mendelian inheritance. *Journal of Neurochemistry*, v. 139, n. Suppl 1, p. 59–74, 2016.

HERRERA, A. *et al.* Are Dopamine Oxidation Metabolites Involved in the Loss of Dopaminergic Neurons in the Nigrostriatal System in Parkinson's Disease? *ACS Chemical Neuroscience*, v. 8, n. 4, p. 702–711, 2017.

HIRSCH, L. *et al.* The Incidence of Parkinson's Disease: A Systematic Review and Meta-

Analysis. *Neuroepidemiology*, v. 46, n. 4, p. 292–300, 2016.

IOVINO, L.; TREMBLAY, M. E.; CIVIERO, L. Glutamate-induced excitotoxicity in Parkinson's disease: The role of glial cells. *Journal of Pharmacological Sciences*, v. 144, n. 3, p. 151–164, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jphs.2020.07.011>>.

JACKSON, L. *et al.* Within the brain: The renin angiotensin system. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 19, n. 3, p. 1–23, 2018.

JENNER, P. Oxidative Stress in Parkinson's Disease. *Annals of Neurology*, v. 53, n. 3, p. 26–38, 2003.

JENNER, P. *et al.* Redefining the strategy for the use of COMT inhibitors in Parkinson's disease: the role of opicapone. *Expert Review of Neurotherapeutics*, v. 21, n. 9, p. 1019–1033, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/14737175.2021.1968298>>.

JIANG, T. *et al.* Angiotensin-(1-7) is Reduced and Inversely Correlates with Tau Hyperphosphorylation in Animal Models of Alzheimer's Disease. *Molecular Neurobiology*, v. 53, n. 4, p. 2489–2497, 2016.

JIANG, T. *et al.* Suppressing inflammation by inhibiting the NF- κ B pathway contributes to the neuroprotective effect of angiotensin-(1-7) in rats with permanent cerebral ischaemia. *British Journal of Pharmacology*, v. 167, n. 7, p. 1520–1532, 2012.

JOGLAR, B. *et al.* The inflammatory response in the MPTP model of Parkinson's disease is mediated by brain angiotensin: Relevance to progression of the disease. *Journal of Neurochemistry*, v. 109, n. 2, p. 656–669, 2009.

JOSEPH, C. *et al.* Cell cycle deficits in neurodegenerative disorders: Uncovering molecular mechanisms to drive innovative therapeutic development. *Aging and Disease*, v. 11, n. 4, p. 946–966, 2020.

KALIVENDI, S. V. *et al.* 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺)-induced apoptosis and mitochondrial oxidant generation: Role of transferrin-receptor-dependent iron and hydrogen peroxide. *Biochemical Journal*, v. 371, n. 1, p. 151–164, 2003.

KALYANARAMANA, B. *et al.* Measuring reactive oxygen and nitrogen species with

fluorescent probes: challenges and limitations. *Free Radic Biol Med*, v. 52, n. 1, p. 1–6, 2012.

KANG, K. *et al.* Flow cytometric fluorescence pulse width analysis of etoposide-induced nuclear enlargement in HCT116 cells. *Biotechnology letters*, v. 32, n. 8, p. 1045–52, ago. 2010.

KEANE, P. C. *et al.* Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Parkinson's Disease*, 2011.

KIM, A. *et al.* Amantadine and the Risk of Dyskinesia in Patients with Early Parkinson's Disease: An Open-Label, Pragmatic Trial. *Journal of Movement Disorders*, v. 11, n. 2, p. 65–71, 2018.

KLINGELHOEFER, L.; REICHMANN, H. Parkinson's disease as a multisystem disorder. *Journal of Neural Transmission*, v. 124, n. 6, p. 709–713, 2017.

KOVALEVICH, J.; LANGFORD, D. Considerations for the Use of SH-SY5Y Neuroblastoma Cells in Neurobiology. *Methods Mol Bio*, v. 1078, p. 9–21, 2013. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/978-1-62703-640-5>>.

KRISHNA, A. *et al.* Systems genomics evaluation of the SH-SY5Y neuroblastoma cell line as a model for Parkinson's disease. *BMC Genomics*, v. 15, n. 1, p. 1–21, 2014.

KRUG, A. K. *et al.* Transcriptional and metabolic adaptation of human neurons to the mitochondrial toxicant MPP+. *Cell Death and Disease*, v. 5, n. 5, p. 1–15, 2014.

LASHUEL, H. A. *et al.* The many faces of α -synuclein: from structure and toxicity to therapeutic target. *Nat Rev Neurosci.*, v. 14, n. 1, p. 38–48, 2013.

LEBEL, C. P.; ISCHIROPOULOS, H.; BONDY, S. C. Evaluation of the Probe 2',7'-Dichlorofluorescein as an Indicator of Reactive Oxygen Species Formation and Oxidative Stress. *Chemical Research in Toxicology*, v. 5, n. 2, p. 227–231, 1992.

LI, R.; JIA, Z.; TRUSH, M. A. Defining ROS in Biology and Medicine. *React Oxyg Species*, v. 1, n. 1, p. 9–21, 2016.

LIANG, X. *et al.* Proline mechanisms of stress survival. *Antioxidants and Redox Signaling*, v. 19, n. 9, p. 998–1011, 2013.

LIGUORI, I. *et al.* Oxidative stress, aging, and diseases. *Clinical Interventions in Aging*, v. 13, p. 757–772, 2018.

LIMOUSIN, P.; FOLTYNIE, T. Long-term outcomes of deep brain stimulation in Parkinson disease. *Nature Reviews Neurology*, v. 15, n. 4, p. 234–242, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41582-019-0145-9>>.

LIU, C. *et al.* Angiotensin-(1-7) suppresses oxidative stress and improves glucose uptake via Mas receptor in adipocytes. *Acta Diabetologica*, v. 49, n. 4, p. 291–299, 2012.

LOPES, F. M. *et al.* RA Differentiation Enhances Dopaminergic Features, Changes Redox Parameters, and Increases Dopamine Transporter Dependency in 6-Hydroxydopamine-Induced Neurotoxicity in SH-SY5Y Cells. *Neurotoxicity Research*, v. 31, n. 4, p. 545–559, 2017.

MAGRINELLI, F. *et al.* Pathophysiology of Motor Dysfunction in Parkinson's Disease as the Rationale for Drug Treatment and Rehabilitation. *Parkinson's Disease*, v. 2016, 2016.

MARILL, J. *et al.* Retinoic Acid Metabolism and Mechanism of Action: A Review. *Current Drug Metabolism*, v. 4, n. 1, p. 1–10, 2005.

MARKEY, S. P. *et al.* Intraneuronal generation of a pyridinium metabolite may cause drug-induced parkinsonism. *Nature*, v. 311, n. 5985, p. 464–467, 1984.

MAROTEAUX, L.; CAMPANELLI, J. T.; SCHELLER, R. H. Synuclein: A neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal. *Journal of Neuroscience*, v. 8, n. 8, p. 2804–2815, 1988.

MASEREJIAN, N.; VINIKOOR-IMLER, L.; DILLEY, A. Estimation of the 2020 Global Population of Parkinson's Disease (PD) [abstract]. 2020, [S.l.]: Mov Disord, 2020. Disponível em: <<https://www.mdsabstracts.org/abstract/estimation-of-the-2020-global-population-of-parkinsons-disease-pd/>>.

MATTOS, J. P. DE; MATTOS, V. M. D. B. C. Novos agonistas dopaminérgicos. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, v. 57, n. 2A, p. 329–332, 1999.

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. 1285–1291, 1988.

MEADE, R. M.; FAIRLIE, D. P.; MASON, J. M. Alpha-synuclein structure and Parkinson's disease – lessons and emerging principles. *Molecular Neurodegeneration*, v. 1, p. 1–14, 2019.

MENON, J. *et al.* Angiotensin-(1-7) inhibits growth of human lung adenocarcinoma xenografts in nude mice through a reduction in cyclooxygenase-2. *Cancer Research*, v. 67, n. 6, p. 2809–2815, 2007.

MILLER, G. W. Paraquat: The red herring of Parkinson's disease research. *Toxicological Sciences*, v. 100, n. 1, p. 1–2, 2007.

MIYAZAKI, I.; ASANUMA, M. Neuron-Astrocyte Interactions in Parkinson's Disease. *Cells*, v. 9, n. 12, p. 2623, 2020.

MIZUNO, Y.; SONE, N.; SAITOH, T. Effects of 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine and 1-Methyl-4-Phenylpyridinium Ion on Activities of the Enzymes in the Electron Transport System in Mouse Brain. *Journal of Neurochemistry*, v. 48, n. 6, p. 1787–1793, 1987.

MOU, Z. *et al.* Endoplasmic reticulum stress, an important factor in the development of Parkinson's disease. *Toxicology Letters*, v. 324, n. January, p. 20–29, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2020.01.019>>.

NAKAMURA, K. *et al.* The selective toxicity of 1-methyl-4-phenylpyridinium to dopaminergic neurons: The role of mitochondrial complex I and reactive oxygen species revisited. *Molecular Pharmacology*, v. 58, n. 2, p. 271–278, 2000.

NANDIPATI, S.; LITVAN, I. Environmental exposures and Parkinson's disease. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 13, n. 9, 2016.

NATIONAL INSTITUTE FOR HEALTH AND CARE; EXCELLENCE. *Parkinson's disease in adults: diagnosis and management*. [S.l.: s.n.], 2017. Disponível em: <<https://www.nice.org.uk/guidance/ng71/evidence/full-guideline-pdf-4538466253>>.

OERTEL, W.; SCHULZ, J. B. Current and experimental treatments of Parkinson disease: A guide for neuroscientists. *Journal of Neurochemistry*, p. 325–337, 2016.

PÅHLMAN, S. *et al.* Retinoic acid-induced differentiation of cultured human neuroblastoma cells: a comparison with phorbol ester-induced differentiation. *Cell Differentiation*, v. 14, n. 2, p. 135–144, 1984.

PAREKH, R. U.; ROBIDOUX, J.; SRIRAMULA, S. Kinin B1 Receptor Blockade Prevents Angiotensin II-induced Neuroinflammation and Oxidative Stress in Primary Hypothalamic Neurons. *Cell Mol Neurobiol*, v. 40, n. 5, p. 845–857, 2020.

PARKINSON, J. Um ensaio sobre a paralisia agitante. *Revista Latinoamericana de Psicopatologia Fundamental*, v. 19, n. 1, p. 122–149, 2016.

PASSOS-SILVA, D. G.; VERANO-BRAGA, T.; SANTOS, R. A. S. Angiotensin-(1-7): Beyond the cardio-renal actions. *Clinical Science*, v. 124, n. 7, p. 443–456, 2013.

PEREIRA, V. M. *et al.* Gonadotropin stimulation increases the expression of angiotensin-(1-7) and mas receptor in the rat ovary. *Reproductive Sciences*, v. 16, n. 12, p. 1165–1174, 2009.

PFEIFFER, R. F. Non-motor symptoms in Parkinson's disease. *Parkinsonism and Related Disorders*, v. 22, p. S119–S122, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.parkreldis.2015.09.004>>.

PISOSCHI, A. M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 97, p. 55–74, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.040>>.

PLOTEGHER, N. *et al.* DOPAL derived alpha-synuclein oligomers impair synaptic vesicles physiological function. *Scientific Reports*, v. 7, p. 1–16, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/srep40699>>.

POLYMEROPOULOS, M. H. *et al.* Mutation in the α -synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science*, v. 276, n. 5321, p. 2045–2047, 1997.

PRINGLE, K. G. *et al.* The expression and localization of the human placental prorenin/renin-angiotensin system throughout pregnancy: Roles in trophoblast invasion and angiogenesis? *Placenta*, v. 32, n. 12, p. 956–962, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.placenta.2011.09.020>>.

PRINGSHEIM, T. *et al.* The prevalence of Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis. *Movement Disorders*, v. 29, n. 13, p. 1583–1590, 2014.

PUSPITA, L.; CHUNG, S. Y.; SHIM, J. W. Oxidative stress and cellular pathologies in Parkinson's disease. *Molecular Brain*, v. 10, n. 1, p. 1–12, 2017.

RABELO, L. A.; ALENINA, N.; BADER, M. ACE2-angiotensin-(1-7)-Mas axis and oxidative stress in cardiovascular disease. *Hypertension Research*, v. 34, n. 2, p. 154–160, 2011.

RABIE, M. A. *et al.* Angiotensin 1-7 ameliorates 6-hydroxydopamine lesions in hemiparkinsonian rats through activation of MAS receptor/PI3K/Akt/BDNF pathway and inhibition of angiotensin II type-1 receptor/NF- κ B axis. *Biochemical Pharmacology*, v. 151, p. 126–134, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.01.047>>.

RAO, R. V.; ELLERBY, H. M.; BREDESEN, D. E. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. *Cell Death and Differentiation*, v. 11, n. 4, p. 372–380, 2004.

REDZA-DUTORDOIR, M.; AVERILL-BATES, D. A. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, v. 1863, n. 12, p. 2977–2992, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.09.012>>.

REIS, A. B. *et al.* Angiotensin (1-7) and its receptor Mas are expressed in the human testis: Implications for male infertility. *Journal of Molecular Histology*, v. 41, n. 1, p. 75–80, 2010.

REIS, F. M. *et al.* Angiotensin-(1-7), its receptor Mas, and the angiotensin-converting enzyme type 2 are expressed in the human ovary. *Fertility and Sterility*, v. 95, n. 1, p. 176–181, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.06.060>>.

RICCARDI, C.; NICOLETTI, I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nature Protocols*, v. 1, n. 3, p. 1458–1461, 2006.

RIEDEL, O. *et al.* Estimating the prevalence of Parkinson's disease (PD) and proportions of patients with associated dementia and depression among the older adults based on secondary claims data. *International Journal of Geriatric Psychiatry*, v. 31, n. 8, p. 938–943, 2016.

RISS, T. L. *et al.* Cell Viability Assays. *Assay Guidance Manual*, n. Md, p. 1–25, 2004.

Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23805433>>.

SALAMON, A. *et al.* Neuroprotection in Parkinson's disease: facts and hopes. *Journal of Neural Transmission*, v. 127, n. 5, p. 821–829, 2020. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1007/s00702-019-02115-8>>.

SAN LUCIANO, M. *et al.* Nonsteroidal Anti-inflammatory Use and LRRK2 Parkinson's Disease Penetrance. *Movement Disorders*, v. 35, n. 10, p. 1755–1764, 2020.

SANTOS, R. A. *et al.* Metabolism in the Dog Brainstem. *Hypertension*, v. 11, p. 153–157, 1988.

SCHAPIRA, A. H. V. *et al.* Mitochondrial Complex I Deficiency in Parkinson's Disease.

Journal of Neurochemistry, v. 54, n. 3, p. 823–827, 1990.

SCHASER, A. J. *et al.* Alpha-synuclein is a DNA binding protein that modulates DNA repair with implications for Lewy body disorders. *Scientific Reports*, v. 9, n. 1, p. 1–19, 2019.

Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-47227-z>>.

SCHNEIDER, F. *et al.* Pharmacokinetics, metabolism and safety of deuterated L-DOPA (SD-1077)/carbidopa compared to L-DOPA/carbidopa following single oral dose administration in healthy subjects. *British Journal of Clinical Pharmacology*, v. 84, n. 10, p. 2422–2432, 2018.

SEGURA-AGUILAR, J. On the Role of Aminochrome in Mitochondrial Dysfunction and Endoplasmic Reticulum Stress in Parkinson's Disease. *Frontiers in Neuroscience*, v. 13, n. March, p. 1–6, 2019.

SINGH, K.; SINGH, T.; SHARMA, P. L. Beneficial effects of angiotensin (1–7) in diabetic rats with cardiomyopathy. *Therapeutic Advances in Cardiovascular Disease*, v. 5, n. 3, p. 159–167, 2011.

SPILLANTINI, M. G. *et al.* a-Synuclein in Lewy bodies. v. 388, p. 839–840, 1997.

STEFANIS, L. *et al.* How is alpha-synuclein cleared from the cell? *Journal of Neurochemistry*, v. 150, n. 5, p. 577–590, 2019.

STOKER, T. B.; GREENLAND, J. C. *Parkinson's Disease: Pathogenesis and Clinical*

Aspects. [S.l: s.n.], 2018.

STORNETTA, R. L. *et al.* Astrocytes synthesize angiotensinogen in brain. *Science*, v. 242, n. 4884, p. 1444–1446, 1988.

SWIFT, C. C. *et al.* Updates in diagnosis, management, and treatment of neuroblastoma. *Radiographics*, v. 38, n. 2, p. 566–580, 2018.

TALLANT, E. A.; DIZ, D. I.; FERRARIO, C. M. Antiproliferative actions of angiotensin-(1-7) in vascular smooth muscle. *Hypertension*, v. 34, n. 4 II, p. 950–957, 1999.

TANSEY, M. G.; GOLDBERG, M. S. Neuroinflammation in Parkinson's disease: its role in neuronal death and implications for therapeutic intervention. *Neurobiol Dis*, v. 37, n. 3, p. 510–518, 2010.

TIEU, K. A guide to neurotoxic animal models of Parkinson's disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, v. 1, n. 1, p. 1–20, 2011.

TOMPKINS, M. M. *et al.* Apoptotic-like changes in Lewy-body-associated disorders and normal aging in substantia nigral neurons. *American Journal of Pathology*, v. 150, n. 1, p. 119–131, 1997.

TRONCOSO-ESCUADERO, P. *et al.* Outside in: Unraveling the role of neuroinflammation in the progression of Parkinson's disease. *Frontiers in Neurology*, v. 9, n. OCT, p. 1–15, 2018.

TYSNES, O. B.; STORSTEIN, A. Epidemiology of Parkinson's disease. *Journal of Neural Transmission*, v. 124, n. 8, p. 901–905, 2017.

VALVONA, C. J. *et al.* The Regulation and Function of Lactate Dehydrogenase A: Therapeutic Potential in Brain Tumor. *Brain Pathology*, v. 26, n. 1, p. 3–17, 2016.

VAN DEN BERGE, N. *et al.* Ageing promotes pathological alpha-synuclein propagation and autonomic dysfunction in wild-type rats. *Brain*, v. 144, n. 6, p. 1853–1868, 2021.

VAZ-SILVA, J. *et al.* The vasoactive peptide angiotensin-(1-7), its receptor Mas and the angiotensin-converting enzyme type 2 are expressed in the human endometrium. *Reproductive Sciences*, v. 16, n. 3, p. 247–256, 2009.

VENDEROVA, K.; PARK, D. S. Programmed Cell Death in Parkinson ' s Disease. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, p. 1–24, 2012.

WEI, Z. *et al.* Oxidative Stress in Parkinson's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, v. 11, n. July, p. 1–7, 2018.

WILLIAM LANGSTON, J. *et al.* Chronic parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science*, v. 219, n. 4587, p. 979–980, 1983.

WRIGHT, J. W.; HARDING, J. W. The brain renin-angiotensin system: A diversity of functions and implications for CNS diseases. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, v. 465, n. 1, p. 133–151, 2013.

XICOY, H.; WIERINGA, B.; MARTENS, G. J. M. The SH-SY5Y cell line in Parkinson's disease research: a systematic review. *Molecular Neurodegeneration*, v. 12, n. 1, p. 1–11, 2017. Disponible em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s13024-017-0149-0>>.

XIE, H. R.; HU, L. SEN; LI, G. Y. SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: In vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Chinese Medical Journal*, v. 123, n. 8, p. 1086–1092, 2010.

XU, P.; SRIRAMULA, S.; LAZARTIGUES, E. ACE2/ANG-(1-7)/Mas pathway in the brain: The axis of good. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, v. 300, n. 4, p. 1–25, 2011.

YUAN, Y. HE *et al.* The molecular mechanism of rotenone-induced α -synuclein aggregation: EMPHASIZING the role of the calcium/GSK3 β pathway. *Toxicology Letters*, v. 233, n. 2, p. 163–171, 2015. Disponible em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.11.029>>.

ZAKHAROV, S. D. *et al.* Helical R -Synuclein Forms Highly Conductive Ion Channels †. *Biochemistry*, v. 46, p. 14369–14379, 2007.

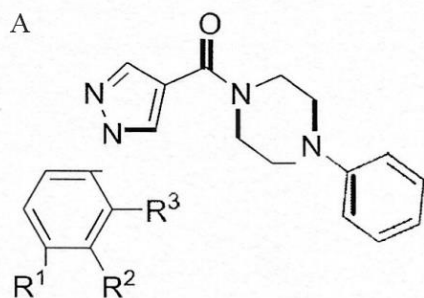
ZAWADA, W. M. *et al.* Loss of angiotensin II receptor expression in dopamine neurons in Parkinson's disease correlates with pathological progression and is accompanied by increases in Nox4- and 8-OH guanosine-related nucleic acid oxidation and caspase-3 activation. *Acta neuropathologica communications*, v. 3, p. 9, 2015.

ZHANG, W.-H. *et al.* Antioxidant attenuation of ROS-involved cytotoxicity induced by Paraquat on HL-60 cells. *Health*, v. 02, n. 03, p. 253–261, 2010.

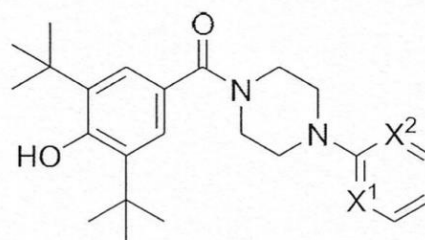
ZHOU, Y.; DANBOLT, N. C. Glutamate as a neurotransmitter in the healthy brain. *Journal of Neural Transmission*, v. 121, n. 8, p. 799–817, 2014.

ZHOU, YONG *et al.* Neuroprotective effect of angiotensin-(1–7) against rotenone-induced oxidative damage in CATH.a neurons. *Toxicology in Vitro*, v. 50, n. 2017, p. 373–382, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2018.04.005>>.

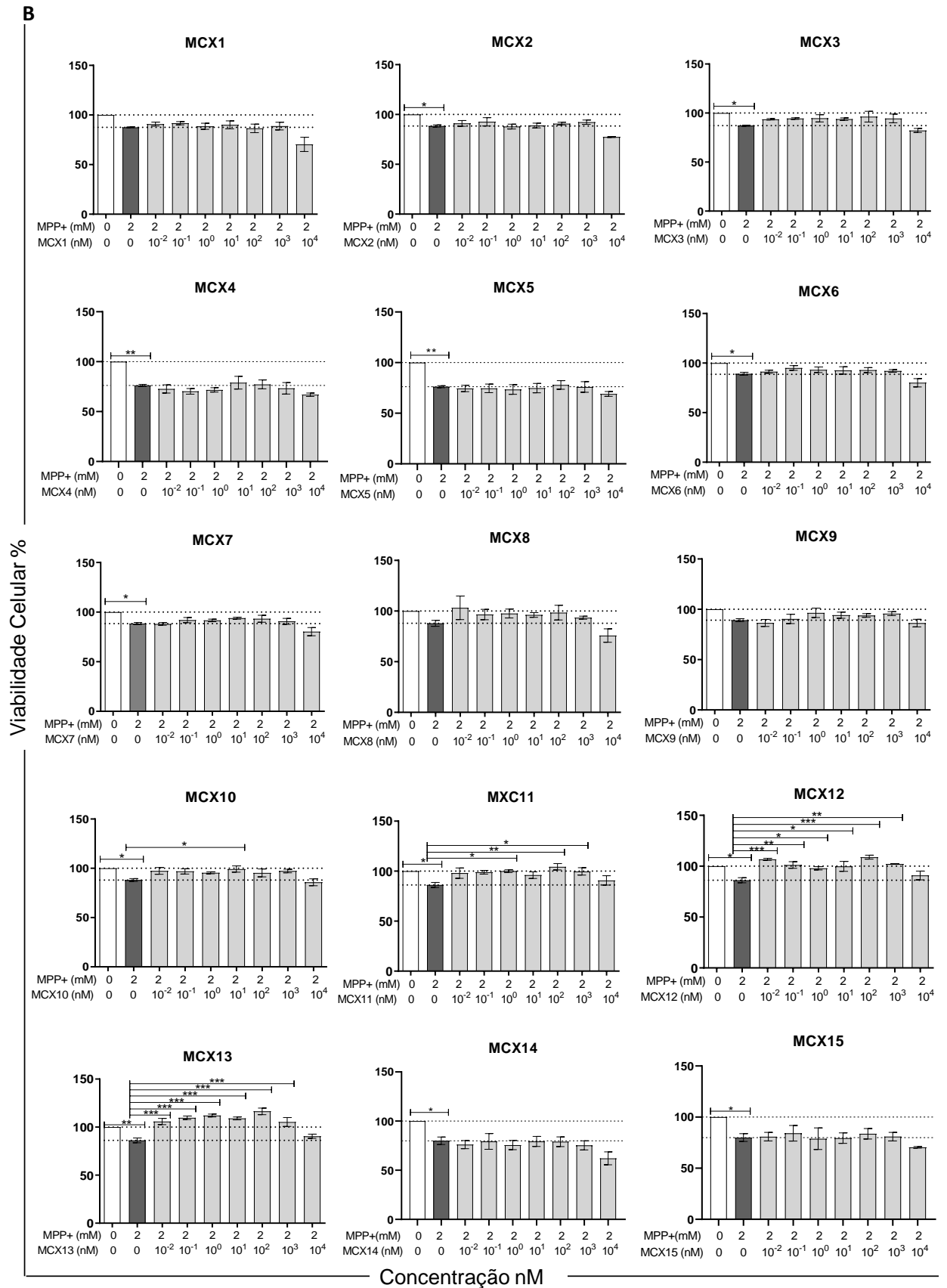
ANEXO A- Efeito de 15 novos compostos derivados de piperazina (inibidores da captação de prolina) contra o dano celular desencadeado por MPP⁺ em células SH-SY5Y.



- 1) MCX6 R¹= Cl, R²= H, R³= H
- 2) MCX7 R¹= H, R²= Cl, R³= H
- 3) MCX8 R¹=Br, R²= H, R³= H
- 4) MCX9 R¹= H, R²= Br, R³= H
- 5) MCX10 R¹= H, R²=, R³= F
- 6) MCX11 R¹= H, R²= F, R³= H
- 7) MCX12 R¹= F, R²= H, R³= H
- 8) MCX13 R¹= H, R²= H, R³= Br
- 9) MCX5 R¹= H, R²= H, R³= H
- 10) MCX14 R¹= H, R²= H, R³= Cl
- 11) MCX15 R¹= NO₂, R²= H, R³= H



- 12) MCX1 X¹= CH, X²= CH
- 13) MCX2 X¹= CH, X²= N
- 14) MCX3 X¹= N, X²= N



Derivados do núcleo (4-R-piperazin-1-il) (1-W-fenil-1H-pirazol-4-il) metadona (A). Efeito dos compostos derivados de piperazine contra o dano celular desencadeado por MPP+ em células SH-SY5Y (B). As células foram pré-tratadas com as concentrações indicadas dos compostos por 24h e depois expostas ao MPP+ por 24h. Os resultados representam a viabilidade celular avaliada pelo ensaio MTT. Os dados são expressos como a média \pm SEM de três experimentos independentes em triplicata. Os significados indicados são mostrados em comparação com o MPP+. A análise estatística foi realizada pelo software GraphPad Prism versão 8.0 usando one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Dunnett * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$.

ANEXO B- Notificação de Criação- Patente de Invenção- Inibidores dos transportadores de prolina como fármacos para o tratamento de doenças psiquiátricas, neurológicas e neurodegenerativas.



Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2020 021141 2

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 3

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 01567601000143

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: UFG, PRÉDIO DA REITORIA, CAMPUS SAMAMBAIA

Cidade: Goiânia

Estado: GO

CEP: 74690-900

País: Brasil

Telefone: (62)3521 2043

Fax: (62)3521 2023

Email: dpitt.ufg@gmail.com

Depositante 2 de 3

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 33663683000116

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Avenida Pedro Calmon, 550 - Cidade Universitária da Universidade Federal do Rio de Janeiro

Cidade: Rio de Janeiro

Estado: RJ

CEP: 21941-901

País: BRASIL

Telefone: (21) 393 87001

Fax:

Email: diretoria@ie.ufrj.br

Depositante 3 de 3

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 17217985000104

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: AVENIDA ANTÔNIO CARLOS, N.º6627,

Cidade: BELO HORIZONTE

Estado: MG

CEP: 31270-901

País: BRASIL

Telefone: (55) 313 409500

Fax:

Email: patentes@ctit.ufmg.br

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): INIBIDORES DOS TRANSPORTADORES DE PROLINA COMO FÁRMACOS PARA O TRATAMENTO DE DOENÇAS PSIQUIÁTRICAS, NEUROLÓGICAS E NEURODEGENERATIVAS

Resumo: Os inibidores dos transportadores de prolina (PROT) apresentam potencial para o tratamento de doenças psiquiátricas, neurológicas e neurodegenerativas. Aqui são descritos processos e o uso dos derivados (3,5-di-tert-butil-4-hidroxifenil)(4-fenilpiperazin-1-il)metanona e/ou sais farmaceuticamente aceitáveis, composições farmacêuticas contendo os mesmos e processos de preparação dos compostos que inibem transportadores de prolina. Estas moléculas atuam em modelos de psicose, doença de Alzheimer, isquemia cerebral, demência vascular, Parkinson, doença de Huntington, epilepsia e autismo sendo úteis no tratamento de doenças psiquiátricas, neurológicas e neurodegenerativas. Nestes compostos são uma ferramenta farmacológica relevante para abordagens no sistema nervoso central.

Figura a publicar: 00