

**LIVIA MENDONÇA MUNHÓZ DATI**

**Doença de Parkinson: possível envolvimento de receptores de cininas,  
purinas e de potencial transiente.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Fisiologia Humana do Instituto  
De Ciências Biomédicas da Universidade de  
São Paulo, para obtenção do Título de Doutor  
em Ciências.

São Paulo

2017

**LIVIA MENDONÇA MUNHÓZ DATI**

**Doença de Parkinson: possível envolvimento de receptores de cininas,  
purinas e de potencial transiente.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Prof. Dr. Luiz Roberto G. Britto

Versão Original

São Paulo

2017

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica  
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Mendonça Munhóz Dati, Livia

Doença de Parkinson: possível envolvimento de receptores de cininas, purinas e de potencial transiente. / Livia Mendonça Munhóz Dati; orientador Luiz Roberto G. Britto. -- São Paulo, 2017.

108 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Doença de Parkinson. 2. Modelo 6-OHDA. 3. Receptor de Bradicinina . 4. Receptor Purinérgico. 5. Canal de Potencial de Cation Transiente (TRPM7). I. Roberto G. Britto, Luiz, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a): Livia Mendonça Munhóz Dati

Título da Tese: Doença de Parkinson: possível envolvimento de receptores de 'cininas, purinas e de potencial transiente.

Orientador(a): Luiz Roberto G. de Britto

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

**( ) Aprovado(a)**

**( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"  
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil  
Telefone :(55) (011) 3091.7733 – e-mail: [cep@icb.usp.br](mailto:cep@icb.usp.br)

## CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **92** nas fls. **03** do livro **09** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Luiz Roberto Giorgetti Britto** Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Doença de Parkinson: possível envolvimento de receptores de cininas, purinas e de potencial transiente*" do qual participam o(s) aluno(s) **Livia Mendonça Munhoz Dati**, , está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **13.08.2013, com validade de 4 anos.**

São Paulo, 19 de agosto de 2013.

Prof. Dr. ANDERSON DE SÁ NUNES  
Vice-Coordenador-CEUA- ICB/USP

Profa. Dra. ANA PAULA LEPIQUE  
Secretária- CEUA - ICB/USP

## DEDICÁTORIA

Dedico todo esse trabalho aos meus pais Adelino e Lucy, e a minha irmã Camila, por estarem o tempo todo ao meu lado e me incentivando todos os momentos a realizar todos os meus sonhos.

Foi a partir da força deles e do carinho diário que hoje consigo finalizar mais uma etapa da minha vida profissional.

Amo muito vocês!!!!

**Gostaria de agradecer em especial a FAPESP,  
pelo apoio financeiro em forma de bolsa de doutorado,  
com o processo número 2013-06044/0.**

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a Deus por ter me ajudado em todos os momentos dessa etapa do doutorado.

Gostaria de agradecer à Fapesp pelo apoio financeiro que possibilitou o desenvolvimento desse trabalho.

Agradecer ao Professor Britto pela confiança e ajuda, que sempre muito importante em todos os momentos.

À Professora Andrea Torrão que sempre permitiu que eu utilizasse seu laboratório e equipamentos.

Ao Professor Henning que esteve sempre disposto para a discussão dos resultados.

À minha família que sempre me apoiou e incentivou para continuar realizando minhas vontades acadêmicas.

Aos meus amigos de laboratório, que vivenciaram diariamente minhas alegrias e contribuíram com discussões e ideias para meu trabalho.

Às minhas amigas de laboratório Caroline Real e Priscila Garcia, que estiveram comigo desde o início e que participaram ativamente em todos os momentos do projeto.

Ao Adilson, técnico do laboratório que me ajudou e ensinou em todos os momentos que precisei.

Aos funcionários do biotério que sempre mantiveram o ambiente adequado para a manutenção dos animais.



*“Estamos aqui para fazer  
alguma diferença no  
universo, se não, porque  
estar aqui?”*

*Steve Jobs*

## Resumo

DATI, L. M. M. **Doença de Parkinson: possível envolvimento de receptores de cininas, purinas e de potencial transiente.** 2017. 108f. Tese (Doutorado em Fisiologia Humana) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

A Doença de Parkinson (DP) é uma doença neurodegenerativa que envolve a perda de neurônios da substância negra, provocando bradicinesia, acinesia, tremores de repouso, rigidez muscular, alterações da marcha e instabilidade postural, além de deficiências cognitivas mais tardias. Um modelo animal muito usado para estudar a DP é o modelo que utiliza a administração direta de 6-OH-dopamina (6-OHDA) no feixe prosencefálico medial, substância negra ou no estriado, sendo esta droga responsável pela morte dos neurônios. Há evidências de que alguns sistemas de comunicação celular podem modular o desenvolvimento da DP. Por exemplo, as cininas, que agem em receptores B1 e B2, podem estar envolvidas com neuroproteção. Ainda, outros receptores que têm sido relacionados com neurodegeneração são os canais de potencial transiente (TRPs), que são divididos em subtipos, como: TRPV, TRPM, TRPC, TRPML e TRPP. Outro grupo de receptores que também podem contribuir para o desenvolvimento da DP são os receptores purinérgicos, como P2X2, P2X4, P2X7 e P2Y4. Levando em consideração os efeitos destes receptores em células do sistema nervoso, este trabalho teve como objetivo avaliar a expressão e o envolvimento destes receptores de membrana na DP induzida por 6-OHDA em camundongos da linhagem C57Bl/6 e nocautes para os receptores B2. Além disso, agonistas/ antagonistas dos receptores B2 e um antagonista de TRPM7 foram utilizados para avaliar a possível ação protetora destas moléculas na DP. Para a avaliação dos receptores de bradicinina, TRPM7 e purinérgicos no desenvolvimento do modelo da DP foram realizadas as técnicas de imunohistoquímica e *Western blotting*. Quando o modelo foi induzido no nocaute do receptor B2 foi observado uma redução de tirosina hidroxilase na substância negra. GFAP revelou redução no estriado e na substância negra. Quando utilizado antagonista foi observado redução de tirosina hidroxilase no estriado e substância negra, contudo quando utilizado agonista do receptor B2 não foi encontrado diferença entre os grupos. Em relação aos receptores purinérgicos, foi observado que o receptor P2X2, P2X7 e P2Y4 tiveram aumento da expressão na substância negra dos animais com indução do modelo de DP. O receptor P2X4, revelou aumento da expressão tanto no estriado quanto na substância negra. Quando avaliado o canal TRPM7, foi observado aumento da expressão do receptor no modelo de DP, quando utilizado o antagonista (carvacrol) foi observado que os animais com injeção de 6-OHDA, não apresentaram diferença em relação ao controle, quando verificado os níveis de caspase-3 foi encontrado semelhança entre os grupos. Com isso pode sugerir que todos os receptores avaliados podem estar envolvidos quando ocorre a lesão por 6-OHDA no encéfalo dos animais. A partir desses resultados pode-se sugerir o envolvimento desse canal no desenvolvimento da DP. Levando em consideração os efeitos encontrados utilizando o modelo da DP, em relação àqueles receptores, é possível sugerir novos alvos terapêuticos para a DP.

**Palavras-chave:** Doença de Parkinson. 6-OHDA. Receptor de Bradicinina (B2). Receptor Purinérgico. Canal de Potencial de Cation Transiente (TRPM7).

## ABSTRACT

DATI, L. M. M. **Parkinson's disease: possible involvement of kinin, purine and transient potential receptors.** 2017. 108f. PHD. Thesis (Doctorate in Human Physiology) - Biomedical Sciences Institute, University of São Paulo, São Paulo, 2017.

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disease that involves the loss of neurons of the substantia nigra, causing bradykinesia, akinesia, rest tremors, muscle stiffness, gait changes and postural instability, as well as later cognitive deficiencies. An animal model widely used to study PD is the model that uses the direct administration of 6-OH-dopamine (6-OHDA) in the medial prosencephalic bundle, black substance or striatum, being this drug responsible for the death of the neurons. There is evidence that some cellular communication systems can modulate the development of PD. For example, kinins, which act on B1 and B2 receptors, may be involved in neuroprotection. Furthermore, other receptors that have been related to neurodegeneration are transient potential channels (TRPs), which are divided into subtypes, such as: TRPV, TRPM, TRPC, TRPML and TRPP. Another group of receptors that may also contribute to the development of PD are purinergic receptors, such as P2X2, P2X4, P2X7 and P2Y4. Taking into account the effects of these receptors on cells of the nervous system, this work aimed to evaluate the expression and the involvement of these membrane receptors in 6-OHDA induced PD in mice of the C57Bl / 6 line and knockouts for B2 receptors. In addition, B2 receptor agonists / antagonists and a TRPM7 antagonist were used to evaluate the possible protective action of these molecules in PD. For the evaluation of bradykinin, TRPM7 and purinergic receptors in the development of the PD model immunohistochemistry and Western blot techniques were performed. When the model was induced in the knockout of the B2 receptor a reduction of tyrosine hydroxylase in the substantia nigra was observed. GFAP revealed reduction in striatum and black matter. When used antagonist, reduction of tyrosine hydroxylase was observed in the striatum and substantia nigra, however when used agonist of the B2 receptor, no difference was found between the groups. Regarding the purinergic receptors, it was observed that the P2X2, P2X7 and P2Y4 receptor had increased expression in the substantia nigra of the animals with induction of the PD model. The P2X4 receptor showed increased expression in both the striatum and black matter. When the TRPM7 channel was evaluated, an increase in receptor expression was observed in the PD model. When the antagonist (carvacrol) was used, it was observed that the animals with 6-OHDA injection had no difference in relation to the control, when the levels of Caspase-3 was found similarity between the groups. This may suggest that all the receptors evaluated may be involved when the 6-OHDA injury occurs in the animals' brains. From these results, it is possible to suggest the involvement of this channel in the development of PD. Taking into account the effects found using the PD model, in relation to those receptors, it is possible to suggest new therapeutic targets for PD.

**Keywords:** Parkinson's Disease. 6-OHDA. Bradykinin Receptor (B2). Purinergic Receptor. Transient Cation Potential Channel (TRPM7).

## LISTA DE ILUSTRAÇÃO

Figura 1 - Representação esquemática do movimento à partir dos núcleos da base.....	22
Figura 2 - Formação da Bradicinina e calidina.....	26
Figura 3 - Representação dos subtipos do Receptor Purinérgicos.....	31
Figura 4 - Esquema representativo do TRPM7 e a sinalização intracelular.....	37
Figura 5 - Expressão de TH no modelo da DP, pelo método WB.....	50
Figura 6 - Localização de TH no modelo da DP, pelo método de imuno-histoquímica.....	51
Figura 7 - Expressão de TH em animais nocautes de receptor B2 por WB.....	52
Figura 8 - Localização de receptor B2 por imuno-histoquímica .....	53
Figura 9 - Expressão de TH em animais nocautes de receptor B2 por WB.....	54
Figura 10 - Expressão de GFAP em animais nocautes de receptor B2 por WB.....	55
Figura 11 - Localização de TH em animais nocautes de receptor B2 por imuno-hisoquímica.....	56
Figura 12 – Localização de GFAP em animais nocautes de receptor B2 por imuno-histoquímica.....	57
Figura 13 - Expressão de TH em animais injetado com HOE-140 por WB.....	58

Figura 14 - Expressão de GFAP em animais injetado com HOE-140 por WB.....	59
Figura 15 - Localização de TH em animais injetados com HOE-140 por imunohistoquímica.....	60
Figura 16 - Localização de GFAP em animais injetados com HOE-140 por imunohistoquímica.....	61
Figura 17 - Expressão de TH em animais injetado com BK por WB.....	62
Figura 18 - Expressão de GFAP em animais injetado com BK por WB.....	63
Figura 19 - Localização de TH em animais injetados com BK por imunohistoquímica.....	64
Figura 20 - Localização de GFAP em animais injetados com BK por imunohistoquímica.....	65
Figura 21 - Expressão do receptor purinérgico P2X2 por WB.....	69
Figura 22 - Localização do receptor purinérgico P2X2 por imunohistoquímica.....	70
Figura 23 - Expressão do receptor purinérgico P2X4 por WB.....	71
Figura 24 - Localização do receptor purinérgico P2X4 por imunohistoquímica.....	72

Figura 25 - Expressão do receptor purinérgico P2X7 por WB.....	73
Figura 26 - Localização do receptor purinérgico P2X7 por imunohistoquímica.....	74
Figura 27 - Expressão do receptor purinérgico P2Y4 por WB.....	75
Figura 28 - Localização do receptor purinérgico P2Y4 por imunohistoquímica.....	76
Figura 29 - Expressão do receptor TRPM7 por WB.....	80
Figura 30 - Localização do receptor TRPM7 por imunohistoquímica.....	81
Figura 31 - Expressão de TH em animais injetados com carvacrol por WB.....	83
Figura 32 - Localização de TH em CPu animais injetados com carvacrol por imunohistoquímica.....	84
Figura 33 - Localização de TH em mesencéfalo animais injetados com carvacrol por imunohistoquímica.....	86
Figura 34 - Expressão de caspase-3 em animais injetados com carvacrol por WB.....	88
Figura 35 - Teste do cilindro em animais injetados com carvacrol.....	89

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

DP - Doença de Parkinson

DA - Dopamina

6-OHDA - 6-hidroxi-dopamina

TRP - Canal de Potencial de Cátion Transiente

WB - *Western Blotting*

BK - Bradicinina

TH - Tirosina hidrolase

GFAP - Proteína acidicular de fribras gliais

GPe - Globo pálido externo

GPi - Globo pálido interno

SN - Substância negra

SNc - Substância negra parte compacta

SNr - Substância negra parte reticular

NO – Óxido nítrico



## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	20
1.1	Doença de Parkinson.....	20
1.2	O modelo da DP por injeção de 6-OHDA.....	22
1.3	O sistema de cininas.....	25
1.4	Receptor purinérgico.....	30
1.5	Receptor de Potencial Transiente (TRP).....	34
2	JUSTIFICATIVA.....	39
3	OBJETIVO GERAL.....	40
3.1	Objetivos específicos.....	40
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
4.1	Animais.....	42
4.2	Indução do modelo de Parkinson.....	42
4.3	Tratamento com carvacrol.....	43
4.4	Tratamento com antagonista/agonista.....	43
4.5	Ensaios de imuno-histoquímica.....	44
4.6	<i>Western Blotting</i> .....	46
4.7	Teste do cilindro.....	47
5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	48
6	RESULTADOS.....	49
6.1	Tirosina Hidroxilase (TH).....	49
6.2	Receptor de Bradicinina B2 – Resultados e Discussão.....	52
6.2.1	<i>Expressão do Receptor B2</i> .....	52
6.2.2	<i>Nocautes de Receptor B2 de bradicinina</i> .....	53

6.2.3	<b>Antagonista HOE-140</b> .....	57
6.2.4	<b>Agonista BK</b> .....	61
6.2.5	<b>Discussão</b> .....	65
6.3	<b>Receptores Purinérgicos – Resultados e Discussão</b> .....	69
6.3.1	<b>P2X2</b> .....	69
6.3.2	<b>P2X4</b> .....	70
6.3.3	<b>P2X7</b> .....	72
6.3.4	<b>P2Y4</b> .....	74
6.3.5	<b>Discussão</b> .....	76
6.4	<b>Canal de Potencial de Cátion Transiente – TRPM7 – Resultados e Discussão</b> .....	80
6.4.1	<b>TRPM7</b> .....	80
6.4.2	<b>Carvacrol</b> .....	81
6.4.3	<b>Caspase- 3</b> .....	87
6.4.4	<b>Teste do cilindro</b> .....	88
6.4.5	<b>Discussão</b> .....	89
7	<b>Conclusão Geral</b> .....	93
	<b>Referência</b> .....	95
	<b>Apêndices</b> .....	105
	<b>Apêndices 1 Média e erro padrão dos receptores</b> .....	105
	<b>Apêndices 2 Média e erro padrão dos nocautes, antagonista e agonista do receptor B2 de bradicinina</b> .....	106/107
	<b>Apêndices 3 Média e erro padrão das análises realizadas com carvacrol</b> .....	108

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Doença de Parkinson

A Doença de Parkinson (DP) é caracterizada como um distúrbio neurodegenerativo progressivo, que apresenta sintomas motores como a bradicinesia, ou seja, lentidão dos movimentos voluntários ou dificuldade em iniciar os movimentos, redução da quantidade de movimentos, também chamada de acinesia, tremores de repouso, rigidez muscular, alterações da marcha e instabilidade postural. Os distúrbios motores são acompanhados por sintomas autonômicos, cognitivos e psiquiátricos (RAO et al., 2003; SANTANGELO et. al., 2017). Com o crescimento da população idosa, o Ministério da Saúde estima que no ano de 2014, cerca de 1% da população mundial com 65 anos ou mais, tenha a doença. No Brasil, aproximadamente 200 mil pessoas sofrem com a doença.

Primeiramente descrita por James Parkinson em 1817, a compreensão desta doença ganhou maior significado apenas em 1958, com a descrição do sistema nigro-estriatal de transmissão dopaminérgica. Estudos da década de 1960 revelaram ainda que tipicamente após a redução de 70-80% dos neurônios dopaminérgicos do estriado, os sintomas da patologia são detectados (RUBERG et al., 1995). A partir de então, um precursor ativo da dopamina, a L-dihidroifenilalanina (L-DOPA ou levodopa) passou a ser empregado no tratamento da DP. Com este tratamento foi observada uma melhora significativa no quadro motor. Por outro lado, o uso crônico da levopoda está relacionado com movimentos anormais, como a discinesia (OOSTEN; COOLS, 2002).

Como descrito anteriormente, as alterações motoras são devido à perda de neurônios no sistema nigro-estriatal. Uma das regiões encefálicas mais afetadas na DP é substância negra (SN). A SN é dividida em duas partes, a compacta

(SNc) e a reticulata (SNr). Na SNc, os neurônios utilizam dopamina (DA) como neurotransmissor (BLANDINI et al., 2000). Nesta região também é encontrada a enzima sintetizadora de DA, a tirosina hidroxilase (TH). A parte reticulata é composta principalmente por neurônios GABAérgicos, e suas eferências inibitórias que se projetam principalmente para os núcleos ventrais anterior e lateral do tálamo (Figura 1) (BLANDINI et al., 2000). A SN tem importantes funções dentro dos circuitos dos núcleos da base, com grande participação por meio das projeções ao estriado (caudado-putamen, CPu) (ALEXI et al., 2000).

A neurodegeneração dopaminérgica da SNc resulta na redução do funcionamento de projeções nigro-estriatais inibitórias, o que leva a hiperativação do núcleo subtalâmico. Ocorre então o aumento da ativação dos neurônios do globo pálido interno e da SNr, inibindo assim o tronco encefálico e as projeções talâmicas (OBESO et al., 2000; OBESO et al., 2004). Conseqüentemente, as vias motoras são inibidas, retardando a iniciação do movimento voluntário, essas vias estão representadas na Figura 1. Além da SNc, existe uma perda neuronal progressiva no tronco encefálico, incluindo o *locus coeruleus*, o núcleo reticular do tronco encefálico e o núcleo motor dorsal do vago, bem como nos núcleos basais de Meynert, na amígdala e na região CA2 do hipocampo (FERRER, 2009). Além da perda neuronal, são encontrados precipitados protéicos citoplasmáticos (corpúsculos de Lewy) constituídos principalmente pelas proteínas sinucleína, parkina e ubiquitina, predominantemente na SN, *locus coeruleus* e, em menor quantidade, em neurônios corticais (GIBB; LEES, 1988; LAMOTTE et al., 2016).

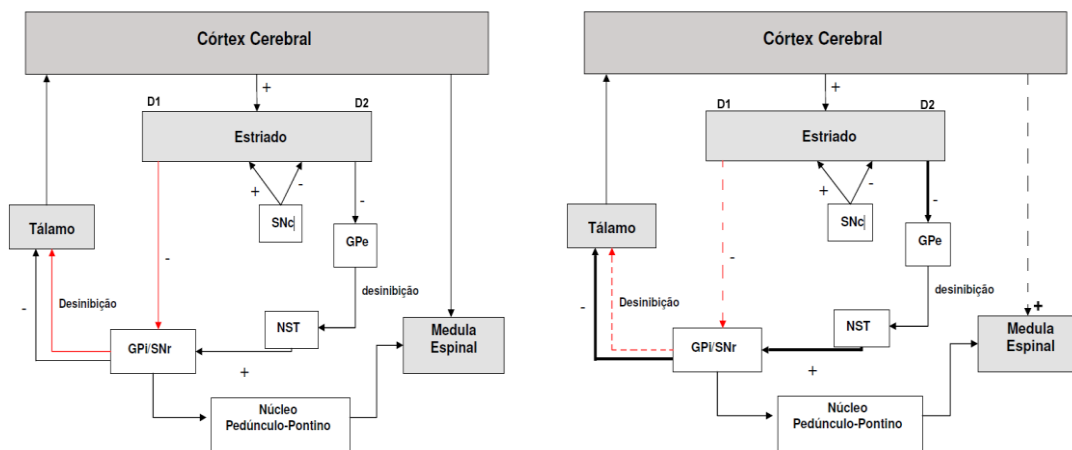


Figura 1 - Representação esquemática do movimento. No primeiro esquema mostra a circuitaria do movimento com as setas completas, em que as setas pretas significa a ativação e as setas vermelhas mostram a inibição da estrutura. No segunda esquema mostra com as setas tracejadas as alterações quando o individuo esta com DP, mostrando em qual momento da circuitaria é afetado com o a DP. Fonte: Real, C. C. 2013.

O desenvolvimento da patologia ainda é obscura, mas trabalho de Sayre e colaboradores (2008) mostrou que alteração na mitocôndria, estresse oxidativo, fatores ambientais e predisposição genética são fatores cruciais para a evolução da doença.

Outros sistemas sofrem alterações no decorrer da doença, como disfunção monoaminérgica múltipla, incluindo além do déficit no sistema dopaminérgico, ainda apresenta déficit no sistema colinérgico, serotoninérgico e noradrenérgico. Estas alterações explicam a diminuição da capacidade do organismo em controlar os movimentos e apresenta alterações psiquiátricas (TEIVE, 2006).

## 1.2 O modelo experimental de DP por injeção de 6-OHDA.

Na tentativa de estudar a DP, muitos modelos experimentais têm sido desenvolvidos para induzir em animais as características da DP observada na clínica em humanos. A DP pode ser induzida experimentalmente em modelos animais utilizando-se algumas substâncias análogas da dopamina como a 6-OH-

Dopamina (6-OHDA), contaminantes da heroína sintética como o 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), herbicidas e pesticidas como a rotenona, paraquat e maneb (OBESO et al., 2004). Esses modelos são capazes de mimetizar uma ou mais características da DP, particularmente se essas lesões induzidas forem parciais ou graduadas (MEREDITH et al., 2008; PURISAI et al., 2007).

A 6-OHDA é a neurotoxina mais comumente utilizada para degeneração nigral em modelos experimentais (BLUM et al., 2001). Apresenta estrutura química parecida com a dopamina (DA) (é um análogo hidroxilado do neurotransmissor DA) (BREESE; TRAYLOR, 1971). A 6-OHDA é transportada para os corpos celulares e fibras dos neurônios catecolaminérgicos (DEUMENS et al., 2002). Nos neurônios, a 6-OHDA é oxidada e durante este processo ocorre a produção de peróxido de hidrogênio, uma espécie reativa altamente tóxica para a célula (MEREDITH et al., 2008). De acordo com Deumens e colaboradores (2002), a 6-OHDA inibe os efeitos de enzimas mitocondriais da cadeia respiratória, como é o caso das enzimas I e IV, provocando assim déficits metabólicos na mitocôndria. A morte dos neurônios dopaminérgicos induzida por 6-OHDA envolve mecanismo de morte celular por apoptose; sendo assim, o processo envolve a ativação da cascata das caspases, sendo ao final ativada a caspase 3 (ALVAREZ-FISCHER et al., 2008).

A 6-OHDA não é capaz de atravessar a barreira hemato-encefálica, e dessa maneira é necessário que ela seja administrada por via direta (intracisternal, intraventricular ou diretamente no parênquima cerebral) (BLUM et al., 2001; MEREDITH et al., 2008). O grau de depleção dos neurônios dopaminérgicos e seus terminais estriatais dependem da localização e da dose da toxina injetada

(MEREDITH et al., 2008 ). A fase inicial de morte celular ocorre 12 horas após a administração de 6-OHDA e continua por aproximadamente mais 7 – 10 dias (JEON et al., 1995). O pico de morte celular ocorre em 4 - 6 dias pós lesão. Esta fase inicial é seguida por uma fase prolongada de morte celular que dura cerca de 30 dias, dependendo da dose administrada (ALEXI et al., 2000).

A 6-OHDA é geralmente administrada unilateralmente na SN, no feixe prosencefálico medial (MFB) ou no estriado (CPu) (MEREDITH et al., 2008; DEUMENS et al., 2002), sendo que o complexo CPu é a região mais utilizada por tornar a destruição da via nigroestriatal dopaminérgica mais seletiva e menos agressiva (DEUMENS et al., 2002). Quando injetada no CPu, a toxina produz uma prolongada degeneração retrógrada dos neurônios nigroestriatais (UNGERSTEDT, 1968; ALVAREZ-FISCHER et al., 2008), reproduzindo assim as características fisiopatológicas responsáveis pelas deficiências motoras na DP (BLUM et al., 2001).

Stott e Barker (2013) utilizou a 6-OHDA na concentração de 5µg/ µL, na porção do estriado de camundongos, com o objetivo de avaliar a morte de neurônios em diferentes tempos e avaliando a eficácia da injeção unilateral, deixando um lado controle e outro tratado. Sendo assim, foi observado que o lado controle não foi alterado com a injeção da droga no lado contralateral; além disso, os autores mostraram que quanto mais tempo de sobrevivência do animal após a cirurgia mais morte de neurônios são observados, utilizando tirosina hidroxilase como marcador da diminuição do sistema dopaminérgico, e conseqüentemente, pode avaliar a evolução da doença.

### 1.3 O Sistema de Cininas

O primeiro estudo relacionando às cininas data de 1909 por Abelous e Bardier, que avaliaram os efeitos hipotensivos das cininas da urina humana. Estudo recente de Monreau e colaboradores (2005) mostrou que as cininas são ativadas em processos fisiológicos como na regulação da pressão sanguínea, funções renais e cardíacas, e processos patológicos, como a inflamação. Além disso, as cininas promovem resposta a estes danos, aumentando o fluxo sanguíneo, dor e edema no local afetado.

A cinina é formada a partir de 2 cascatas bioquímicas, uma no tecido e outra no plasma. No tecido a formação de cininas ocorre quando há um trauma, presença de substância endotóxica e danos, ativando enzimas proteolíticas liberadas durante o trauma. O precursor para a formação da cinina no tecido é o cininogênio de baixo peso molecular, sendo que a calicreína cliva este precursor, formando a calidina, cinina predominante nos tecidos. Já na corrente sanguínea, quando ocorre um trauma, dano ou presença de substância endotóxica, o Fator XII ou Fator de Hageman é ativado, induzindo a clivagem do precursor de cinina, o cininogênio de alto peso molecular, pela calicreína, que irá agir de duas formas: (i) liberando o precursor de bradicinina, e (ii) agindo também no Fator XII, estimulando a continuidade do ciclo (BHOOLA et al.,1992). Essa via esta representada na figura 2, em que mostra esquematicamente a formação da bradicinina e os respectivos receptores em que irão ativar e desencadear as alterações intracelular.



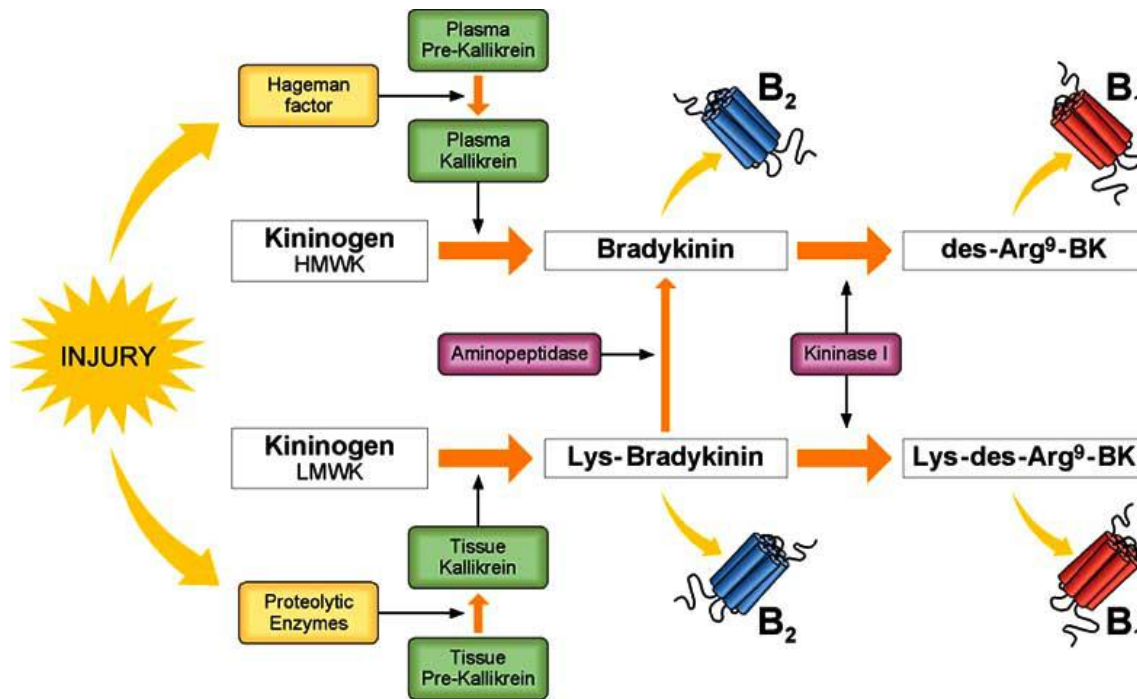


Figura 2 - Figura esquemática da formação via algum trauma com as alterações bioquímicas, até a formação da bradicinina e calidina. Além disso, ainda está representando os receptores. Fonte: Rodi et al., 2005.

Uma das cininas mais comuns é a bradicinina. A bradicinina é encontrada tanto no plasma quanto nos tecidos. No sistema nervoso central a bradicinina é encontrada no bulbo, cerebelo, córtex, estriado e medula espinhal, sendo que a maior concentração da bradicinina ocorre no hipotálamo e na hipófise (PERRY; SNYDER, 1984; KARIYA et al., 1985).

A bradicinina e a calidina são rapidamente degradadas pela peptidase conhecida por cininase. A meia vida da bradicinina é em torno de 30 segundos no plasma ou quando administrada por via intracerebroventricular (KARIYA et al., 1982).

Os efeitos da bradicinina e da calidina são mediados pela ação em dois tipos de receptores, B1 e B2, como mostrado na figura 2. Estes receptores estão

localizados na membrana plasmática, são compostos por 7 domínios transmembrânicos e são acoplados a proteína G (Gs e Gq), sendo importantes pelo número de vias de sinalizações bioquímicas ativadas (WEBB et al., 1994). Os receptores acoplados a proteína G (Gs e Gq), quando ativados, levam à estimulação da fosfolipase C da membrana, o que ativa três vias: a via do inositoltrifosfato (IP<sub>3</sub>) que estimulará a liberação de cálcio intracelular do retículo endoplasmático; a via da estimulação de diacilglicerol (DAG) que irá agir na formação de proteína quinase C (PKC); e a terceira via que pode ser estimulada por esses receptores é a que envolve a fosfolipase A2, induzindo a liberação de ácido araquidônico da membrana celular, estimulando a liberação de prostanoídes que desempenham efeitos pró-inflamatórios (SCHELL; IRVINE, 2006).

O receptor B2 possui afinidade pelas cininas intactas (bradicinina e calidina), enquanto o receptor B1 é ativado pelos metabólitos provenientes da clivagem da Arg C-terminal das cininas, pelas cininases do tipo I, que libera des-Arg9-bradicinina e des-Arg10-calidina (para revisão ver BHOOLA et al., 1992). Em contraste com o receptor B2, que é expresso numa grande variedade de células e tecidos, o receptor B1 é pouco expresso em condições normais, mas pode ser induzido *in vivo* e *in vitro* por endotoxinas, citocinas e fatores de crescimento, o que poderia indicar algum papel durante processos patológicos (PESQUERO; BADER, 1998).

Trabalhos tem mostrado o efeito da bradicinina no sistema nervoso central, como o estudo realizado por Appel e Barefoord (1989), mostrando que, em células PC12, a bradicinina age estimulando o rápido aumento de cálcio intracelular, induzindo a liberação de neurotransmissor. Estudo realizado por

Martins (2008) mostrou que a bradicinina (BK) está envolvida na diferenciação neural de células progenitoras neurais (CPN) por um *loop* autócrino que resulta em ativação do receptor B2 de cininas. Além de seu envolvimento no processo de diferenciação neural, a BK também atua no processo de proteção microvascular endotelial em modelos de acidente vascular encefálico (BOVENZI et al., 2010).

Outro trabalho que utilizou a bradicinina neste contexto foi o desenvolvido por Trujillo e colaboradores, de 2012, que mostrou que em cultura cortical de ratos a expressão do receptor B1 está aumentada; já a expressão do receptor B2 é baixa inicialmente, mas durante a diferenciação celular a expressão deste receptor aumenta consideravelmente. Além disso, os autores avaliaram a migração celular e observaram que quando as células foram incubadas com bradicinina houve maior migração, sugerindo que esta migração está relacionada com neurogênese e gliogênese.

Com objetivo de avaliar o envolvimento desses receptores em traumas no encéfalo, Ferreira e colaboradores (2013) observaram o possível efeito protetor de traumas neurológicos quando utilizados antagonistas para o receptor B2 (HOE-140). Nesse estudo foram utilizados ratos Swiss, com uma cânula fixada no crânio, por onde era administrado o antagonista na concentração de 1 ou 10 nmol/kg.

Os resultados deste trabalho mostram que, quando utilizado o antagonista para receptor B2, os animais pareciam ter sido protegidos contra impacto na memória, atenuando edema cerebral, fatores neurotróficos e metabólitos oxidativos. Concluíram que, quando utilizado o HOE-140, os animais tiveram redução na lesão, indicando uma possível proteção de traumas no encéfalo.

Outro estudo utilizou HOE-140 para bloquear o receptor B2, ao mesmo tempo foi utilizada bradicinina (Bk) como agonista. Nesse trabalho foi realizado com cultura primária de córtex, e as células foram tratadas com 1  $\mu$ M de HOE-140 ou 1  $\mu$ M de Bk. Nesse estudo foi observada a importância da bradicinina e do receptor B2 na diferenciação das células neuronais. Já quando foi utilizado HOE-140, foi encontrado aumento do número de células da glia, sugerindo que a bradicina contribui diretamente para a neurogênese. Neste mesmo sentido, os autores avaliaram os mesmos parâmetros em animais geneticamente modificados, com ausência do receptor B2, e foi observado que a neurogênese, gliogênese e a migração neuronal foram alteradas durante a diferenciação das neuroesferas. Com isso os autores concluíram que a sinalização induzida por bradicinina é determinante para as fases do desenvolvimento neuronal e na expressão de receptores de neurotransmissores (TRUJILLO et al., 2012).

Outro trabalho que mostrou a atuação da bradicinina foi o realizado por Bem-Shmuel e colaboradores (2013), que avaliaram a sinalização de cAMP como um possível mecanismo da Bk, induzindo a redução da produção de NO em linhagem de células de microglia, BV2. Nesse trabalho foi observado que quando as células foram expostas a Bk, a produção de NO foi diminuída de modo dose-dependente. Nesse sentido, a Bk inibiu a ativação de cAMP em resposta a elemento de ligação de proteína (CREB). Os autores concluem que a redução mediada por Bk da produção de NO na microglia é dependente da ligação com a proteína  $G_i$  e envolve a inibição da sinalização de cAMP-PKA-CREB.

#### 1.4 Receptores Purinérgicos

O primeiro estudo que avaliou a ação de receptores purinérgicos foi realizado em 1929, por Drury e Szent-Gyorgyi, que demonstraram a ação de compostos de adenina no meio extracelular (DRURY; SZENT-GYORGYI, 1929); mais tarde, na década de 1950, Pamela Holton demonstrou a liberação de ATP por nervos (HOLTON, 1959). Todavia, somente em 1970, Burnstock e colaboradores sugeriram que o ATP e nucleotídeos relacionados podem ser neurotransmissores ou cotransmissores em sinapses do sistema nervoso central e periférico (BURNSTOCK et al., 1970; BURNSTOCK, 1986).

Os receptores purinérgicos são receptores sensíveis a purinas e são divididos em P1 e P2. O subtipo P1 inclui 4 membros, A1, A2A, A2B e A3, e são acoplados a proteína G, sendo ativados por adenosina (GESSI et al., 2011). O outro subtipo de receptores purinérgicos, P2, é dividido em 2 subfamílias, a metabotrópica P2Y e a ionotrópica P2X (KÜGELGEN; HARDEN, 2011) como está representado na figura 3.

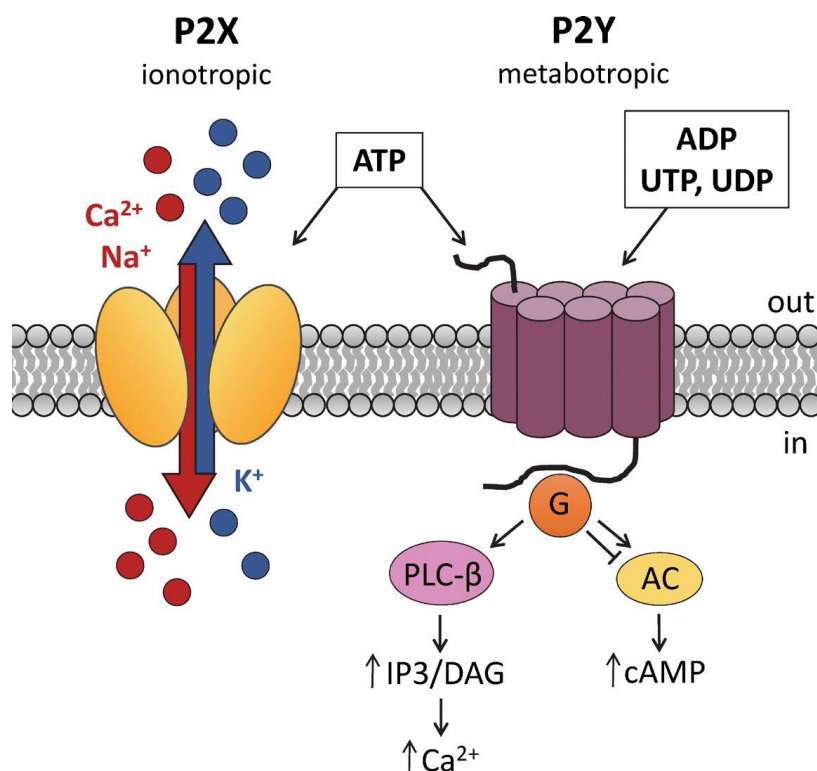


Figura 3 - Esquema representativo dos receptores purinérgicos. Na figura, mostra os subtipos dos receptores e quais os tipos de receptor de membrana, sendo ionotrópico como receptor ligado a proteína G. Fonte: BJÖRKGREM; LISHKO, 2016.

Os receptores P2Y incluem vários subtipos; P2Y1, P2Y2, P2Y4 e P2Y6 são acoplados proteína Gq. Os subtipos P2Y12, P2Y13 e P2Y14 estão acoplados à proteína Gi, e, por fim, o subtipo P2Y11 é acoplado à proteína Gq e Gs (CODDOU et al., 2011).

Os receptores P2X são receptores do tipo canal com sítio de ligação para ATP, e envolvem 7 subunidades. Os subtipos P2X1, 2, 3, 4, 6, 7 são ativados de forma homotrimérica ou heterotrimérica; o subtipo P2X5 apresenta função como heterotrímero, e o subtipo P2X7 interage diretamente com 11 diferentes proteínas intracelulares. Nos receptores P2X o mecanismo de transdução de sinais pode ser alterado com a diferença na concentração intracelular de íons,

sendo o ATP o ligante específico para o receptor P2X (NORTH, 2002; FERRARI et al., 2004; COMPAN et al., 2012).

As subunidades dos receptores P2X1-6 estão localizados predominantemente em neurônios do córtex, SNc, núcleo hipotalâmico ventromedial, núcleos supraóptico e paraventricular, medula ventrolateral, complexo dorsal do vago e núcleo do trato solitário (NORTH; VERKHRATSKY, 2006; BURNSTOCK, 2007). O receptor P2X7 é encontrado principalmente em células do sistema imune, como linfócitos e macrófagos (FERRARI et al. 2006; SCHENK et al., 2011). Os receptores P2Y estão localizados de forma bem difusa, sendo que o P2Y1 está principalmente na região dos núcleos da base, incluindo CPu, núcleo acumbens, globo pálido, hipocampo, cerebelo e córtex; o subtipo P2Y12 está mais expresso nas células da glia e o subtipo P2Y13 é encontrado no tálamo, núcleo caudado, substância negra, hipocampo, cerebelo, córtex e medula ventrolateral. (BOARDER; HOURASI, 1998; BURNSTOCK; KNIGHT, 2004; BURNSTOCK, 2006;)

A ativação de receptores purinérgicos que estão acoplados a proteína Gq induz ao aumento da concentração de cálcio intracelular, resultando em processo de diferenciação celular e embriogênese (SPITZER et al., 2004). O ATP e o UTP são os agonistas dos receptores purinérgicos P2X e P2Y; dependendo do subtipo há maior afinidade por um nucleotídeo e estes são rapidamente degradados no espaço extracelular por ectoenzimas, formando ADP e UDP, respectivamente. Esta é uma mudança importante na indução de respostas fisiológicas, como na ativação de receptor tipo P1. A liberação do ATP, juntamente com a sinalização purinérgica, induz a expansão de células

progenitoras e neurogênese destas células no encéfalo adulto (ZIMMERMANN, 1996).

Os receptores P2X e P2Y são expressos dinamicamente nos períodos pré e pós-natal, tanto no sistema nervoso central como no periférico. Os ligantes dos receptores purinérgicos estão envolvidos no mecanismo de sinalização célula-célula por ativar neurotransmissores ou liberação de neuromoduladores pelas células da glia e neurônios, para o controle da transmissão sináptica no sistema nervoso central (ABBRACCHIO; BURNSTOCK, 1998; COTRINA et al., 2000; FIELDS; BURNSTOCK, 2006). O conceito da sinalização purinérgica expandiu-se ao longo dos anos, incluindo não apenas a co-transmissão em diferentes tipos de nervos periféricos e no sistema nervoso central, mas também a ação de purinas em células não neuronais (FRANKE; ILLES, 2006).

Recentemente, os efeitos biológicos de nucleotídeos de purina extracelulares têm sido material de estudo em diversas células e tecidos. Desta forma, muita atenção tem sido dada à função sinalizatória e à atividade celular de curta duração. No entanto, existem evidências crescentes de que os receptores purinérgicos podem apresentar função na comunicação celular de longa duração, incluindo proliferação celular, diferenciação e apoptose (NEARY et al., 1996; ABBRACCHIO et al., 1998). Além disso, os receptores do tipo P1 têm sido ativamente estudados como potencial alvo terapêutico no tratamento de diversos distúrbios tais como a doença de Parkinson, esquizofrenia, isquemia, e câncer (GESSI, 2011).

Existem poucos trabalhos relacionando a DP com receptores purinérgicos. Um estudo interessante foi o de Chen e colaboradores de 2001,



induziram a DP em animais por 6-OHDA, e foi observado que houve um efeito protetor de neurônios quando foi administrado antagonista de receptor de adenosina A2A; contudo, estes resultados não foram os mesmos quando utilizado o antagonista para receptor do subtipo A1, em que não foi encontrado neuroproteção. Sendo assim, pode-se sugerir que a proteção de neurônios está envolvida com o bloqueio do receptor A2A.

Outro resultado interessante foi o encontrado por Trujillo e colaboradores de 2012, que estudaram os efeitos da bradicinina em cultura primária de neurônios corticais e observaram aumento da expressão das subunidades dos receptores purinérgicos P2X2, P2X3 e P2X4, mas diminuição da expressão dos receptores P2X5, P2X6, P2X7, P2Y2 e P2Y12, sugerindo que a bradicinina age influenciando na expressão destes receptores nos neurônios corticais.

### **1.5 Canal de Potencial de Cátion Transiente (TRP)**

Os canais de potencial transiente (TRP) são receptores sensíveis a mudanças de cátions intracelulares e espécies reativas de oxigênio. Estes receptores são divididos em 6 subfamílias, de acordo com o canal iônico a que estão acoplados, como o receptor com canais canônicos (TRPC), canais para vaniloide (TRPV), canais paramelastatina (TRPM), canais para alquirina (TRPA), canais para mucolipina (TRPML) e canais para policistinas (TRPP) (MONTELL et al., 2002; CLAPHAM, 2003).

Os TRPs são receptores de membrana compostos por 6 domínios transmembrânicos. Para a ativação desses receptores é necessário a ligação de proteínas como SNARE e SNAP-25; sem essa ligação os receptores não se ligam na membrana das células (MONTELL, 2005). Quando estão acoplados na

membrana, estes canais são modulados por vários estímulos, como: calmodulina, temperatura, prótons, peróxido de hidrogênio, depleção dos estoques de cálcio e cátions, como cálcio e magnésio (RAMSEY et al., 2006; VENKATACHALAM; MONTELL, 2007).

Dentre as funções desempenhadas por estes receptores destaca-se, no sistema nervoso central, a contribuição na liberação de neurotransmissores excitatórios, sinalização redox, modulação nos níveis de cálcio mitocondrial, desenvolvimento do tecido neuronal, formação de brotos neuronais, comunicação entre células, ativação de microglia, balanço hidroeletrolítico, controle da temperatura corporal e sinalização sensorial (PEDERSEN et al., 2005).

Os canais tipo TRP permitem o aumento do fluxo de cálcio (MINKE, 2006) e estão envolvidos na excitotoxicidade e danos oxidativos nos tecidos neuronais. Ambos os processos estão correlacionados com a progressão das doenças neurodegenerativas, como Doença de Parkinson e esclerose lateral amiotrófica, relacionadas ao desbalanço de cálcio e conseqüentes danos neuronais mediados por processos oxidativos (BEZPROZVANNY, 2009).

Os subtipos destes receptores são encontrados em diferentes regiões com funções específicas, como o caso do subtipo TRPC5 que é encontrado no encéfalo, com a função de modular a extensão de neuritos (Revisão de MONTELL, 2005).

A função de outros canais de TRP, como o TRPC3 e TRPC4, também pode ser desencadeada por estresse oxidativo (BALZER et al., 1999; GROSCHNER et al., 2004). Os mecanismos citados para explicar a sensibilidade dos canais TRPC envolvem a ativação do TRPC pela fosfolipase C (PLC). A PLC

e seus efetores modulam positivamente a função de muitos TRPCs (VENKATACHALAM; MONTELL, 2007).

Nosso grupo tem estudado a participação do canal TRPV1 e correlacionado com o desenvolvimento de receptores na retina e degeneração neuronal que ocorre após danos no nervo óptico (LEONELLI et al., 2005; LEONELLI et al., 2009; LEONELLI et al., 2010; LEONELLI et al., 2011). Foi encontrado que a sinalização do canal tipo TRPV1 é responsável pela produção excessiva de óxido nítrico e consequente nitração de proteína em neurônios da retina e células da glia (LEONELLI et al., 2010).

O subtipo TRPM7 foi encontrado em grandes quantidades no coração, pulmão, ossos e tecido adiposo de humanos, sendo fator importante no estágio embrionário e essencial no desenvolvimento embrionário; a ausência desse receptor na fase embrionária de ratos é letal (FONFRIA, et.al. 2006).

Trabalho de Aarts e colaboradores (2003) mostrou que os receptores TRPM2 e TRPM7 estão envolvidos com morte neuronal induzida por estresse oxidativo. Estes canais são permeáveis ao cálcio, induzindo a formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Sendo assim, há indícios de que o receptor TRPM7 está envolvido na morte neuronal mediada pela formação de espécies reativas de oxigênio.

O receptor TRPM7 requer a atividade de  $PIP_2$  para manter as atividades normais. Este fato foi demonstrado no trabalho de Langeslang e colaboradores de 2007, em que observaram que a ativação de  $PIP_2$  mediada por PLC age estimulando potencialmente o influxo de cálcio intracelular por intermédio do receptor TRPM7, via deste receptor está representada na figura 4.

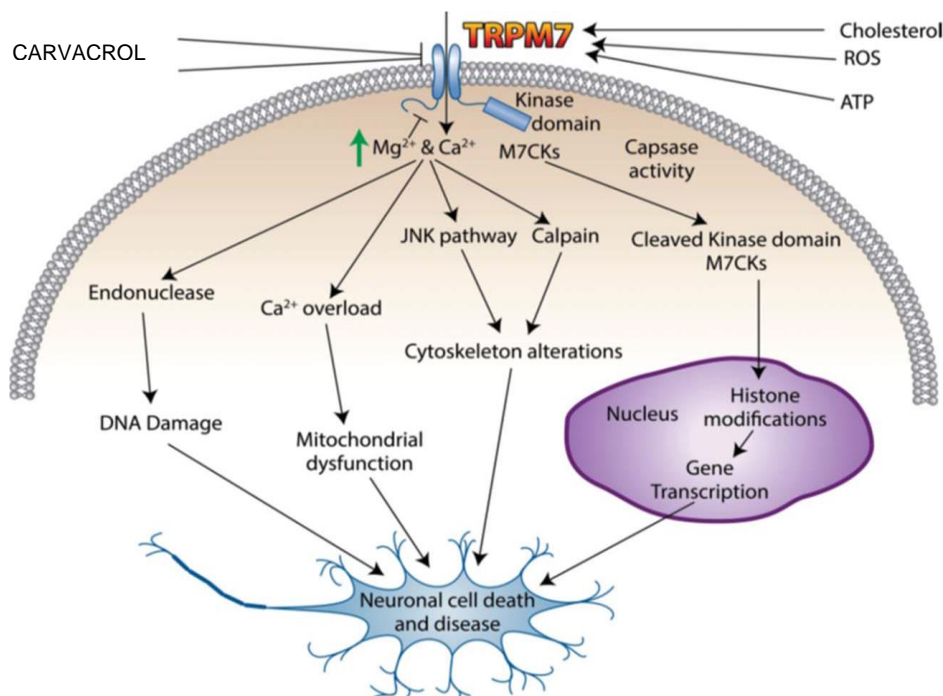


Figura 4 - Representação esquemática da sinalização intracelular do receptor TRPM7, levando em consideração o inibidor específico, no caso carvacrol e as substâncias que estimulariam o receptor. Além disso, ainda demonstra a sinalização até a morte neuronal e a possível doença. Fonte: Modificado de SUN et. al., 2015.

Além disso, foi observado que a clivagem das caspases é potencializada pela quinase do TRPM7, indicando um possível envolvimento na apoptose das células (DESAI et al., 2012). Nesse sentido, foi observado que esta ação é mediada por dinâmica do citoesqueleto, quando os canais do TRPM7 estão abertos (JEONG et al., 2006).

Foi observado que o aumento da expressão do TRPM7 ou a atividade dos canais promovem apoptose em células T, mediada por clivagem da caspase e modulação do receptor. Faz por atividade do TRPM7 (DESAI et al., 2012) ou morte neuronal por altos níveis de cálcio (NUNEZ-VILLENA et al., 2011).

Nesse sentido, foi observado que quando utilizado um antagonista do TRPM7, no caso o carvacrol, nas concentrações de 30 e 50 mg/kg, houve a inibição do receptor e uma neuroproteção nos animais que tinham sofrido indução de isquemia. Esta neuroproteção foi mediada por diminuição de

caspase-3, autoregulação de Bcl-2/Bax e Akt fosforilada, marcadores típicos de apoptose (CHEN et al., 2015).

Outro trabalho que utilizou a inibição do receptor TRPM7 foi o realizado por Li e colaboradores, de 2015, que avaliaram a neuroproteção utilizando carvacrol (0,5 e 1 mM) em cultura primária de células, essas células foram tratadas com agentes farmacológicos e foi observado a proteção dessas células quando o receptor TRPM7 estava inibido. Foi observado a inibição de óxido nítrico sintetase, prevenção do fluxo de cálcio e redução da clivagem da caspase 3. Assim, a inibição do TRPM7 pelo carvacrol foi capaz de proteger as células das injúrias.

## 2 JUSTIFICATIVA

A DP é uma doença neurodegenerativa com aumento marcante de casos no Brasil e no mundo devido o aumento da expectativa de vida, mas pouco se sabe das causas e prevenção para esta doença. Os efeitos provocados por alguns receptores de membrana podem modular o desenvolvimento, progressão ou até proteção à doença. Como pode ser observado acima, no sistema nervoso central encontram-se diversos tipos de receptores, sensíveis a diferentes estímulos e que podem interagir com mecanismos de sinalização celular em condições fisiológicas e na DP. Sendo assim, conhecer se os receptores de membrana, receptor de bradicinina B2, purinérgicos e TRPM7 estão mais expressos, e se eles estão envolvidos no desenvolvimento da doença é muito importante, como forma de contribuir para o conhecimento dos mecanismos envolvidos na DP e no desenvolvimento de possíveis estratégias de neuroproteção.

### 3 OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo principal avaliar a expressão e o possível envolvimento de receptores para bradicinina (B2), TRP (TRPM7) e receptores purinérgicos (P2X2, P2X4, P2X7, P2Y4) no modelo de DP induzida por 6-OHDA em camundongos.

#### 3.1 Objetivos específicos

- Analisar, com as técnicas de *Western blotting*, para avaliar a expressão das proteínas e imuno-histoquímica, para verificar a localização dos receptores no tecido, a expressão de tirosina-hidroxilase no estriado e substância negra, em camundongos C57Bl/6 com 15 dias pós lesão parkinsoniana por 6-OHDA; como forma de padronização do modelo e avaliação da doença

- Utilizando as técnicas de *Western blotting* e imuno-histoquímica, avaliar a expressão do receptor B2 em camundongos C57Bl/6 após a indução do modelo de DP;

- Utilizando as técnicas de *Western blotting* e imuno-histoquímica, avaliar a expressão do canal TRP (TRPM7) em camundongos C57Bl/6 após a indução do modelo de DP;

- Utilizando agonistas e antagonistas do receptor B2, avaliar a expressão da tirosina-hidroxilase e GFAP nos animais com modelo de DP; GFAP – como marcador de astrócitos

-Utilizando antagonista para TRPM7, avaliar a expressão da tirosina-hidroxilase nos animais com modelo de DP;

- Em animais nocautes para o receptor B2 foi avaliada a extensão da lesão induzida por 6-OHDA, pela análise da expressão de tirosina-hidroxilase e GFAP por *Western blotting* e imuno-histoquímica;

-Utilizando as técnicas de *Western blotting* e imuno-histoquímica, avaliar a expressão dos receptores purinérgicos, P2X2, P2X4, P2X7, P2Y2, P2Y4 em camundongos C57Bl/6 após a indução do modelo de DP;



## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Animais

Foram utilizados aproximadamente 50 camundongos machos da linhagem C57Bl/6, provenientes do biotério central do Instituto de Ciências Biomédicas da USP; foram utilizados machos com cerca de 3 meses de idade, pesando entre 25 e 30 g. Os animais foram mantidos com água e ração *ad libitum* em uma sala apropriada, com isolamento acústico, temperatura controlada ( $22^{\circ}\text{C} \pm 1$ ) e ciclo claro/escuro (12:12 horas). Os animais foram operados sendo que o lado direito do animal foi injetado 6-OHDA e o esquerdo salina, esse procedimento foi mantido para os camundongos C57Bl/6 como para os animais nocaute e os animais que foi utilizado antagonista ou agonista. Os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Ciências Biomédicas, com número de protocolo registrado sob o número 92 nas folhas 03 do livro 09.

### 4.2 Indução do modelo de Parkinson

A 6-OHDA foi administrada estereotaxicamente por microinfusão no estriado (CPu) de camundongos machos para efetuar uma lesão retrógrada dos neurônios nigro-estriatais (BLUM et al., 2001). A anestesia geral foi realizada com tribromoetanol (250 mg/kg, i.p.). Após a craniotomia, as injeções do veículo (solução salina 0,9%) ou da 6-OHDA (6-OHDA Hydrochloride-H4381– Sigma®, Saint Louis, MO, USA) diluída em salina e 0,2% de ácido ascórbico foram realizadas nas coordenadas AP 0,8; L 1,9; V 2,6 (PAXINOS; FRANKLIN, 2001). O volume e concentração da 6-OHDA foi de 6  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  e a injeção foi realizada apenas em um ponto do CPu. Após a indução do modelo de doença de

Parkinson, os animais foram mantidos no biotério por 15 dias, período em que já apresenta lesão na região de estudo, como mostrado no trabalho de Hernandez e colaboradores de 2014. As estruturas avaliadas foram o estriado (CPu) e a substância negra (SN), porém pela dificuldade de extrair a substância negra, para realizar os experimento de *Western Blotting* foi extraído o mesencéfalo.

### **4.3 Tratamento com Carvacrol**

Os animais foram pré-tratados com carvacrol (Sigma®, Saint Louis, MO, USA) na concentração de 40 mg/ kg, como estabelecido no trabalho de Chen e colaboradores (2015). O carvacrol é um antagonista específico do TRPM7, e dessa maneira poderíamos verificar quais seriam os efeitos encontrados nos animais, com a inibição desse receptor. Trinta minutos antes da realização do procedimento de indução do modelo da doença de Parkinson, foi injetado carvacrol diluído em salina 0,9 %, via intraperitoneal, como realizado no trabalho de Chen et. al., 2015. Os animais foram mantidos na caixa de manutenção e após o período de trinta minutos foram anestesiados e realizado o procedimento da indução do Parkinson. Após estes procedimentos, os animais foram mantidos no biotério com água e comida a vontade por 15 dias e então foi realizado o sacrifício dos animais.

### **4.4 Tratameto com agonista / antagonita**

Os animais foram inicialmente anestesiados e colocados no estereotáxico para então serem tratados com antagonista (HOE-140) / agonista (Bradicinina,

BK). Esses compostos foram injetados com a intenção de verificar quais seriam os efeitos dos animais quando teriam alteração da ação dos receptores, foram selecionados esse pois eram específicos para o receptor em estudo (TORRES-RIVERA et. al., 2013). A injeção foi realizada no mesmo momento em que foi injetado a 6-OHDA. A concentração de 1  $\mu$ M de antagonista/ agonista (TORRES-RIVERA et. al., 2013), mantendo a concentração padrão da 6-OHDA. O antagonista/ agonista foram diluídos em salina 0,9 %. Após a cirurgia os animais foram mantidos por 15 dias no biotério de manutenção, com água e comida a vontade, sendo observados diariamente para ter certeza que estavam bem. Após esse período foram sacrificados para então realizar as técnicas desejadas.

#### **4.5 Ensaios de Imuno-histoquímica**

Após 15 dias da indução da doença de Parkinson, os animais foram anestesiados e submetidos à perfusão transcardíaca, com solução salina, seguida de solução fixadora constituída de paraformaldeído 2 % dissolvido em tampão fosfato 0,1 M (PB, pH 7,4). Após a perfusão, o encéfalo foi coletado e armazenado em paraformaldeído 2 %, por 4 horas. Passado este período, o material foi transferido para uma solução contendo sacarose a 30 % em PB para crioproteção. Após 24 horas, os tecidos foram cortados em uma espessura de 30  $\mu$ m em micrótomo deslizante de congelamento. Os cortes foram submetidos à metodologia de imuno-histoquímica com anticorpos específicos para os receptores: P2X2 (Abcam, Cambridge, CA), feito em coelho, usado na concentração de 1:500; P2X4 (Santa Cruz, Santa Cruz, CA), feito em coelho e utilizado na concentração de 1:500; P2X7 (Abcam, Cambridge, CA) feito em

coelho e usado na concentração de 1:500; P2Y4 (Santa Cruz, Santa Cruz, CA), feito em cabra e foi utilizado na concentração de 1:500; receptores B2 (BD, Franklin Lakes, Nova Jersey), feito em camundongo e utilizado na concentração de 1:500 e TRPM7 (Abcam, Cambridge, CA), feito em cabra e utilizado na concentração de 1:500; as concentrações foram determinadas de acordo com indicação da empresa de cada fabricante. Foi utilizado soro de burro para bloquear os cortes e foi incubado junto com o anticorpo e triton 10%, esse utilizado como detergente. Para avaliar a extensão da lesão nigral causada pela 6-OHDA foi realizada imuno-histoquímica para tirosina-hidroxilase (TH). Os anticorpos primários foram aplicados aos cortes por 48 horas, período que garantia uma ligação mais eficiente. A marcação imunoquímica foi realizada por imunoperoxidase, de acordo com protocolo do laboratório (REAL et al., 2013).

A imunorreatividade foi analisada em microscópio de luz; a análise das imagens do estriado foi feita através do programa Image J (NIH), sendo determinada a densidade óptica em 10 campos distintos de cada corte, e feita uma média dos valores. Para a substância negra foi realizada contagem automática dos corpos neuronais, e para isso as imagens foram abertas no programa Image J (NIH); o primeiro passo foi selecionar o tamanho das células utilizando a ferramenta “*threshold*” (neste caso deixa as células em vermelho). Para determinar esse tamanho ideal as células, foram comparadas com imagens originais sem alteração da cor. Após esta etapa foi selecionada uma área que foi fixada para todas as imagens e por fim foi feita a contagem automática das células, utilizando um número determinado de pixels (janela de 30 a 1000). Os valores contados foram organizados, colocados em porcentagem em relação ao controle e então realizada a análise estatística.

#### **4.6 Western Blotting**

As proteínas foram separadas através de SDS-PAGE em gel de poliacrilamida, e foram transferidas para membrana de nitrocelulose a 30 V. Após verificação da transferência com o corante Ponceau, foi feito o bloqueio com leite em pó desnatado Molico (NESTLE, Brasil) durante 2 horas em temperatura ambiente com 5 % de BSA diluído em TBS-T (25 mM de Tris, 125 mM de NaCl e 0,1% de Tween 20), seguido por incubação com anticorpo primário diluído em TBS-T, sendo eles: Tirosina hidroxilase (TH) (56 KDa) (1:1000), P2X2 (50 KDa) (1:1000), P2X4 (70 KDa) (1:1000), P2X7 (69 KDa) (1:1000), P2Y4 (45 KDa) (1:500), receptores B2 (42 KDa) (1:500) e TRPM7 (160 KDa) (1:500) permanecendo por 48 horas em temperatura de 4 °C. Após 3 ciclos de lavagens de 10 minutos cada, o anticorpo secundário conjugado com peroxidase foi incubado durante 1 hora, também diluído em TBS-T. Após 3 ciclos de lavagens de 10 minutos, as imagens das bandas foram obtidas através do escaneador de imuno-blotting (C-digit) com o substrato quimioluminescente ECL (Pierce, WI, EUA), seguindo instruções do fabricante. Foi utilizada beta actina (peso molecular: 45 KDa) como padrão das bandas; após realizada a revelação, a membrana foi tratada com solução de “stripping” (glicina, SDS, Tween 20 e água), com o pH da solução 2,2. As membranas foram novamente bloqueadas e incubado com anti-beta actina “overnight”, seguindo o processo semelhante ao realizado com o anticorpo primário. A análise de bandas foi realizada com o programa Image J®.

#### **4.7 Teste do cilindro**

O teste foi realizado de acordo com Glajch et al., 2012 e Smith et al., 2012 em que os animais foram analisados em três momentos, antes da cirurgia de indução da DP, sete e 14 dia após a lesão. O animal foi colocado em um cilindro de acrílico, de 12 cm de diâmetro por 25 cm de altura, e os movimentos dos animais foram filmados por 5 minutos. Os filmes foram avaliados no sentido de avaliar o número de vezes que o animal apoiava as patas na parede do cilindro e qual era a pata que mais apoiava. Para essa análise foram utilizados 5 animais para cada grupo do estudo.

## 5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram normalizados utilizando o lado controle, com injeção de salina. A análise dos dados foram realizadas utilizando o teste T, para comparar os 2 grupos e two-way ANOVA, com pós teste Tukey, para avaliar mais grupos. A significância dos dados foi para  $p < 0,05$ , as média  $\pm$  erro padrão da média (SEM) estão apresentados nas tabelas nos apêndices. Os gráficos e análises foram feitos pelo Software GraphPad Prism 5 (La Jolla, CA, USA). Os resultados foram expressos em porcentagem em relação ao controle.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Tirosina Hidroxilase (TH)

A primeira avaliação em todos os animais operados para a indução do modelo de DP foi a expressão da TH, possibilitando identificar a eficácia da intervenção cirúrgica. A TH é uma enzima responsável em limitar a síntese de dopamina, neurotransmissor importante para o refinamento dos movimentos. Desta forma, pode-se sugerir que estes animais estão com lesão semelhante à encontrada na DP.

Sendo assim, os resultados obtidos a partir do *Western blotting* mostraram que na substância negra (SN) há uma diminuição da TH nos animais em que foi injetado 6-OHDA, de aproximadamente 50 % ( $p < 0,01$ ), garantindo a eficácia da intervenção cirúrgica e que os animais desenvolveram quadro de morte neuronal semelhante de DP (Figura 5). No CPu foi observado resultado similar ao da SN, caracterizado por uma diminuição da TH, em torno de 50 % ( $p < 0,05$ ) nos animais com modelo de DP (Figura 5). As médias e o erro padrão estão apresentados no apêndice 1.



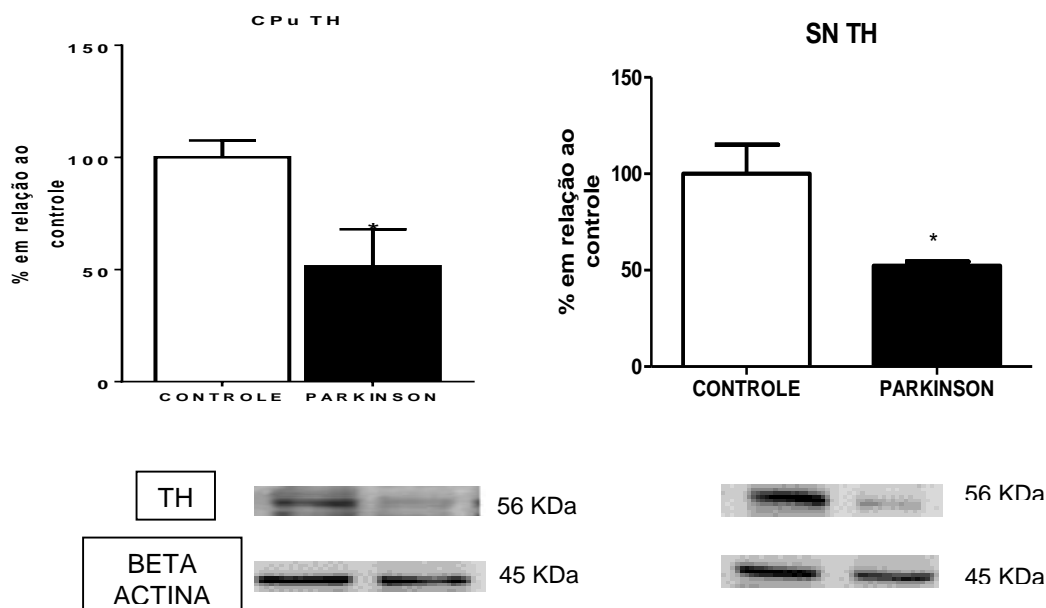


Figura 5 - Representação gráfica dos resultados de *Western Blotting*, utilizando o anticorpo contra tirosina hidrosilase (TH) na concentração de 1:1000, Peso Molecular 56KDa; foram comparados os animais controle com os animais com DP. Foram analisadas duas estruturas, substância negra (SN) e estriado (CPu); n=5 e \* para  $p < 0,05$ .

O mesmo anticorpo, a TH foi utilizado na imuno-histoquímica; como observado na Figura 6, na SN há uma diminuição de aproximadamente 60 % ( $p < 0,01$ ) de neurônios dopaminérgicos dos animais com modelo da DP em relação aos animais controle. Esta diferença também foi observada nos terminais dopaminérgicos do CPu, sendo uma diminuição de aproximadamente 80 % ( $p < 0,001$ ) do animais com modelo da DP em relação aos animais controle. As médias e o erro padrão estão apresentados no apêndice 1. As imagens representativas da diferença entre os grupos e reproduzindo ao encontrado no gráfico, estão representadas na Figura 6.

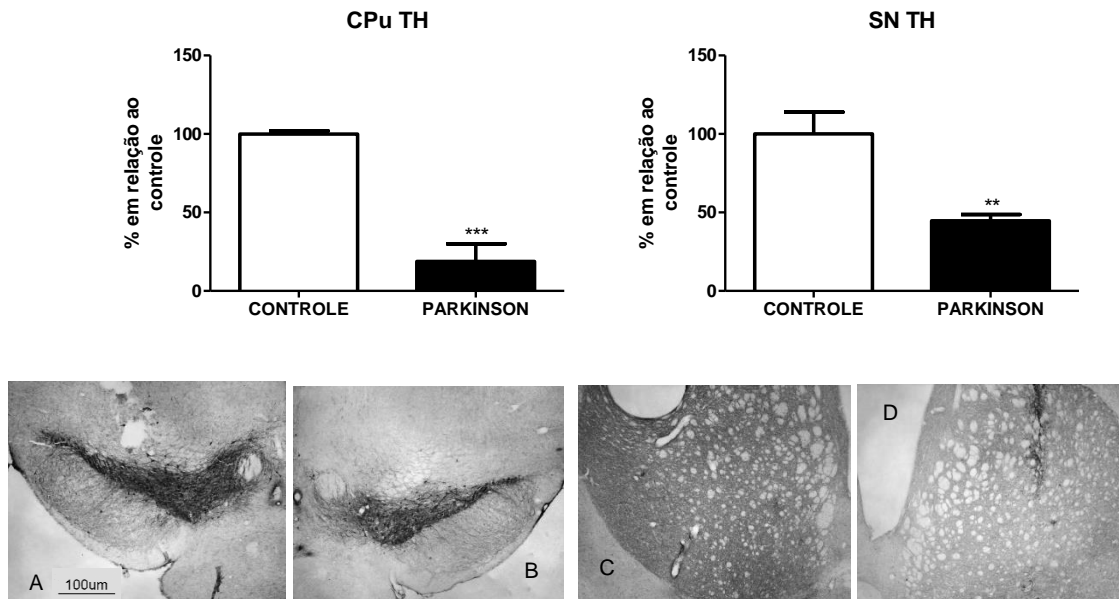


Figura 6 - Representação gráfica dos resultados encontrados através da técnica de imunohistoquímica. Foi utilizado o anticorpo para TH, na concentração de 1:1000. A comparação foi feita em relação ao animal controle com DP. Foram analisadas duas estruturas, a substância negra (SN) e estriado (CPu). A) Substância Negra (SN) animal controle; B) Substância Negra (SN) animal injetado com 6-OHDA; C) Estriado (CPu) em animal controle; D) Estriado (CPu) em animal com injeção de 6-OHDA. Imagem capturada com objetiva 10 X; N= 15; \*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$ .

Os resultados encontrados quando as estruturas foram incubadas com anti-TH indicam que houve uma diminuição da células dopaminérgicas, ou seja, as células que expressam TH.

Este método para avaliar a lesão já está bem estabelecido, como mostra o trabalho de Real e colaboradores (2013). Este trabalho mostrou que, em ratos, quando houve a injeção de 6-OHDA (6  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) há diminuição equivalente dos neurônios dopaminérgicos, avaliado com as mesmas técnicas aqui descritas.

O trabalho de Stott e Barker (2013) mostrou que lesão com 6-OHDA na região da substância negra (após 12 dias da cirurgia) produz uma perda neuronal de aproximadamente 42 % quando avaliada a substância negra, e no estriado a perda de dopamina em terminais provenientes da substância negra é em torno de 55 %. Esta diferença também foi encontrada nas análises deste projeto,

mostrando que os resultados deste trabalho estão condizentes com os de outros grupos.

## 6.2 Receptor de Bradicinina B2– Resultados e Discussão

### 6.2.1 Expressão do Receptor B2

Foi utilizado anticorpo para o receptor B2, na técnica de *Western Blotting* e foi observado que no CPu houve um aumento de aproximadamente 40 % ( $p < 0,05$ ) do grupo induzido ao DP em relação ao controle. Quando avaliada a SN, foi observado que o aumento da expressão do receptor B2 foi de aproximadamente 60 % ( $p < 0,01$ ) do grupo em que foi injetado 6-OHDA em relação ao grupo injetado salina (Figura 7). As médias e o erro padrão estão apresentados no apêndice 1.

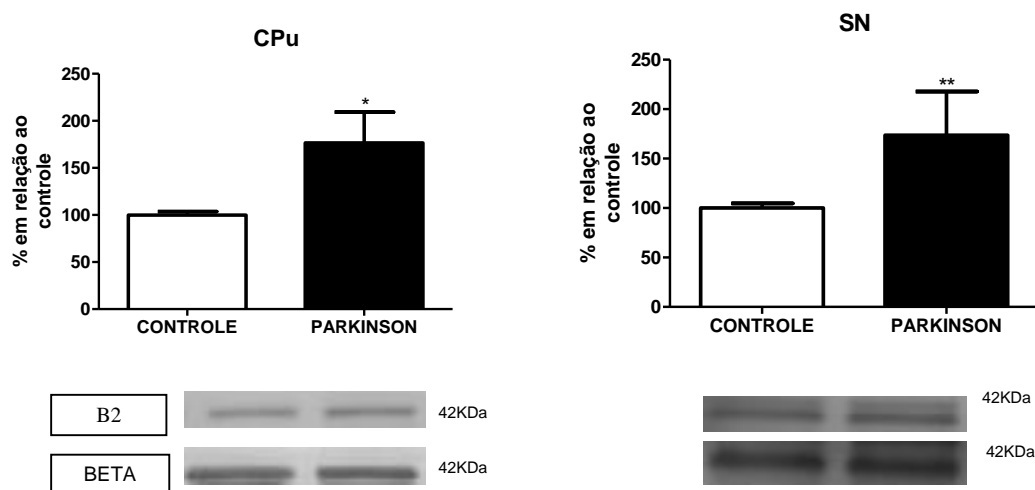


Figura 7 - Representação gráfica da expressão do receptor de bradicinina B2 na técnica de Western Blotting, na concentração 1:500. Peso molecular 42KDa, analisando o estriado (CPu) e a substância negra (SN). N= 5.

O mesmo anticorpo foi utilizado na técnica de imuno-histoquímica; nesse caso foi observada uma alteração quando avaliado no CPu, que apresentou uma

maior presença, de aproximadamente 40 % ( $p < 0,05$ ), desse receptor nos animais que receberam 6-OHDA, como visto na Figura 8. Contudo o mesmo não foi encontrado quando avaliado a SN, em que foi observado uma semelhança em relação aos grupos controle e ao modelo da DP. As médias e o erro padrão estão apresentados no apêndice 1.

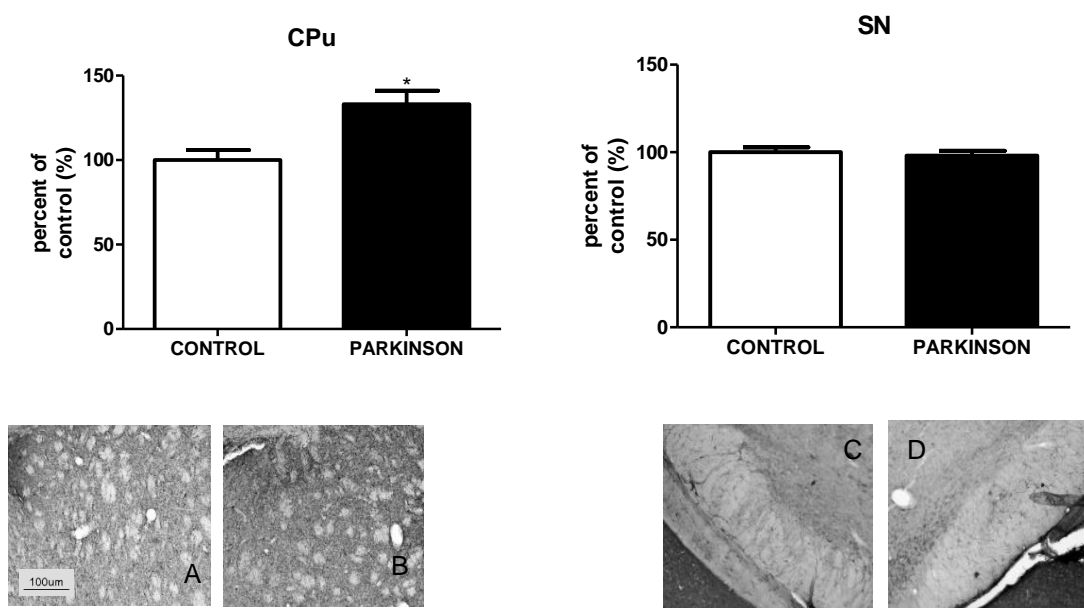


Figura 8 - Representação gráfica do experimento de imuno-histoquímica, dos animais que foram induzidos ao modelo de DP e controle, utilizando o anticorpo anti receptor de bradicinina B2, na concentração de 1:500. Foi comparado o grupo controle com o grupo de animais com modelo para DP, sendo (A) estriado, animal controle; (B) estriado, animal injetado 6-OHDA; (C) substância negra, animal controle; (D) substância negra, animal injetado 6-OHDA. Foram analisados duas estruturas: a substância negra (SN) e o estriado (CPu). As imagens foram capturadas na objetiva de 10 X. N=5; \*  $p < 0,05$ .

### 6.2.2 Nocaute de Receptor B2 de Bradicinina

Com intuito de estudar os possíveis efeitos de cininas no modelo da DP, foram utilizados animais nocautes para o receptor B2 de bradicinina.

O primeiro teste realizado foi a análise da tirosina-hidroxilase, utilizando a técnica de *Western Blotting* após a cirurgia com 6-OHDA, em animais nocautes para o receptor B2 de bradicinina. Foi observado que no CPu e na SN, houve

alteração da proteína (TH), quando comparado o grupo controle com o grupo com modelo da DP. A diminuição da proteína foi em torno de 40 % ( $p < 0,05$ ). As médias e o erro padrão estão apresentados no apêndice 2. As imagens e os resultados estão representados nos gráficos da Figura 9.

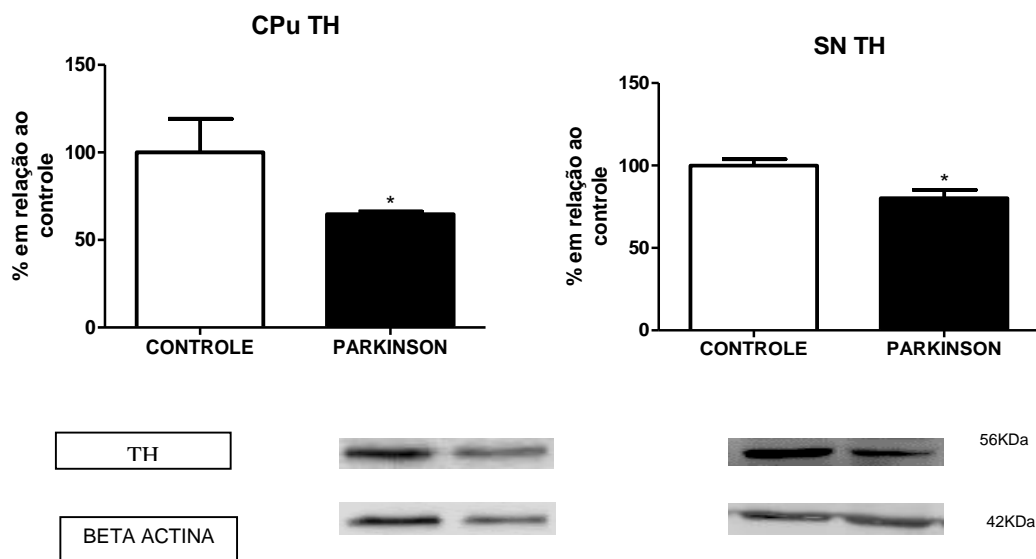


Figura 9 - Representação gráfica da expressão da tirosina hidroxilase na técnica de Western Blotting, na concentração 1:1000; animais nocautes para o receptor B2. Peso molecular 56KDa, analisando o estriado (CPu) e a substância negra (SN). N= 5 e  $p < 0,05$ .

Nos mesmos animais geneticamente modificados para o receptor B2, foram avaliadas as células da glia, com o anticorpo anti GFAP. Foi observado que com esta técnica tanto o CPu quanto a SN não apresentaram alteração significativa entre os grupos controle e indução do modelo da DP; as médias e o erro padrão estão apresentados no apêndice 2. Estes resultados estão representados na Figura 10; a única alteração foi uma tendência de diminuição de GFAP no estriado. A representação das bandas acompanhadas aos gráficos estão abaixo.

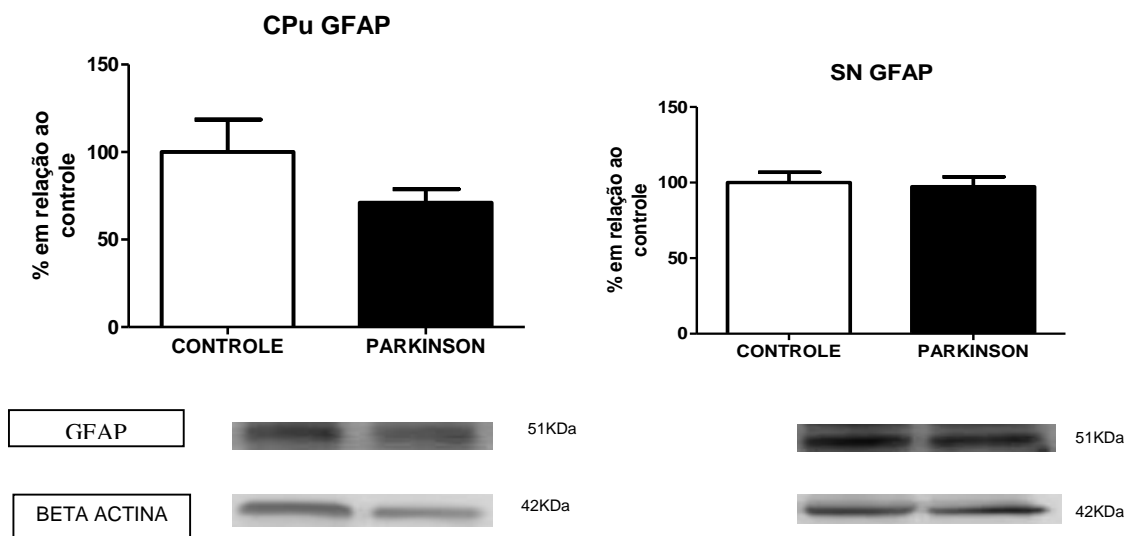


Figura 10 - Representação gráfica da expressão das células da glia, usando anti - GFAP, na técnica de Western Blotting, na concentração 1:1000, em animais nocaute para o receptor B2. Peso molecular 51 KDa, analisando o estriado (CPu). N= 5.

Outra técnica realizada com esses animais nocautes para o receptor B2, foi a imuno-histoquímica, em que foi analisado a tirosina hidroxilase nesses animais. Quando analisado o CPu foi observada diminuição de aproximadamente 70 % ( $p < 0,01$ ) em relação aos grupos, controle e tratado com 6-OHDA. Mas quando foi avaliado a SN, foi encontrada uma redução destes neurônios de aproximadamente 40 % ( $p < 0,05$ ), quando comparado os animais com indução do modelo de Parkinson com os animais que receberam salina. As médias e o erro padrão estão apresentados no apêndice 2. A Figura 11 abaixo mostra os resultados estatísticos e algumas imagens representativas dos resultados visto nos gráficos.

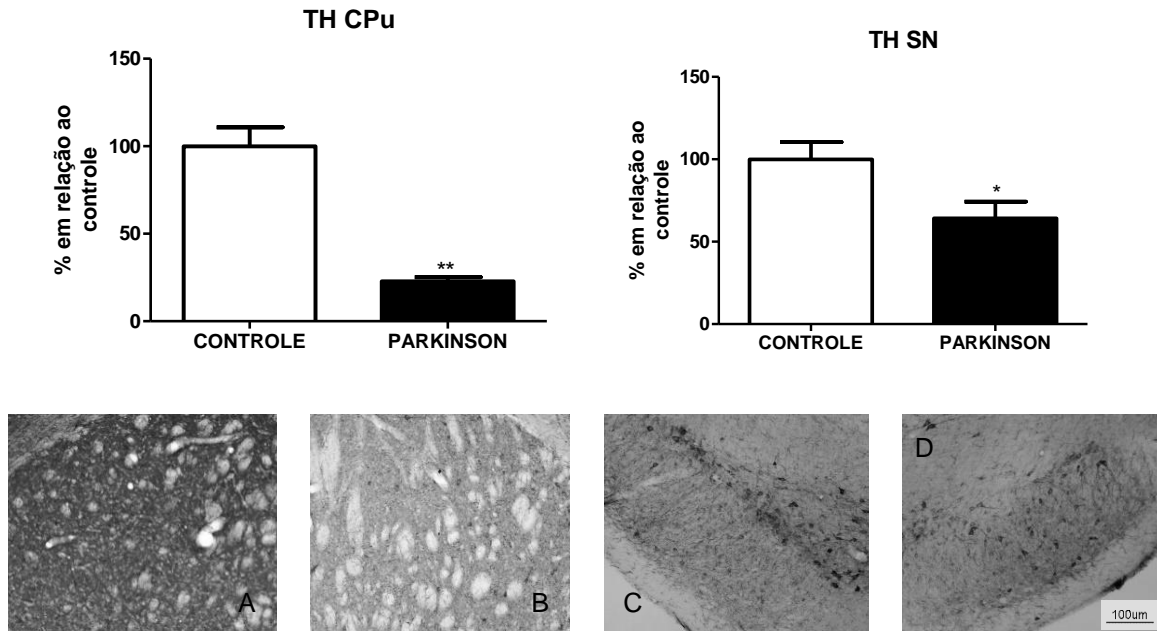


Figura 11 - Representação gráfica do experimento de imuno-histoquímica, dos animais nocautes para o receptor B2, utilizando o anticorpo para tirosina hidroxilase, na concentração de 1:1000. Foi comparado o grupo controle com o grupo de animais com modelo para DP, sendo (A) estriado, animal controle; (B) estriado, animal injetado 6-OHDA; (C) substância negra, animal controle; (D) substância negra, animal injetado 6-OHDA. Foram analisados duas estruturas: a substância negra (SN) e o estriado (CPu). Imagem capturada com objetiva 10 X. N=5 e \* $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$ .

Utilizando ainda a técnica de imuno-histoquímica, foram avaliadas as células da glia, utilizando o anticorpo anti-GFAP. A Figura 12 mostra que no CPu houve uma redução de aproximadamente 40 % ( $p < 0,05$ ) das células da glia nos animais que foram induzido ao modelo de Parkinson quando comparado com os animais que receberam salina (controle). Quando foi avaliada a SN, os animais tratados com 6-OHDA também apresentaram diferença significativa de 40 % ( $p < 0,05$ ) em relação aos animais controle. As médias e o erro padrão estão apresentados no apêndice 2.

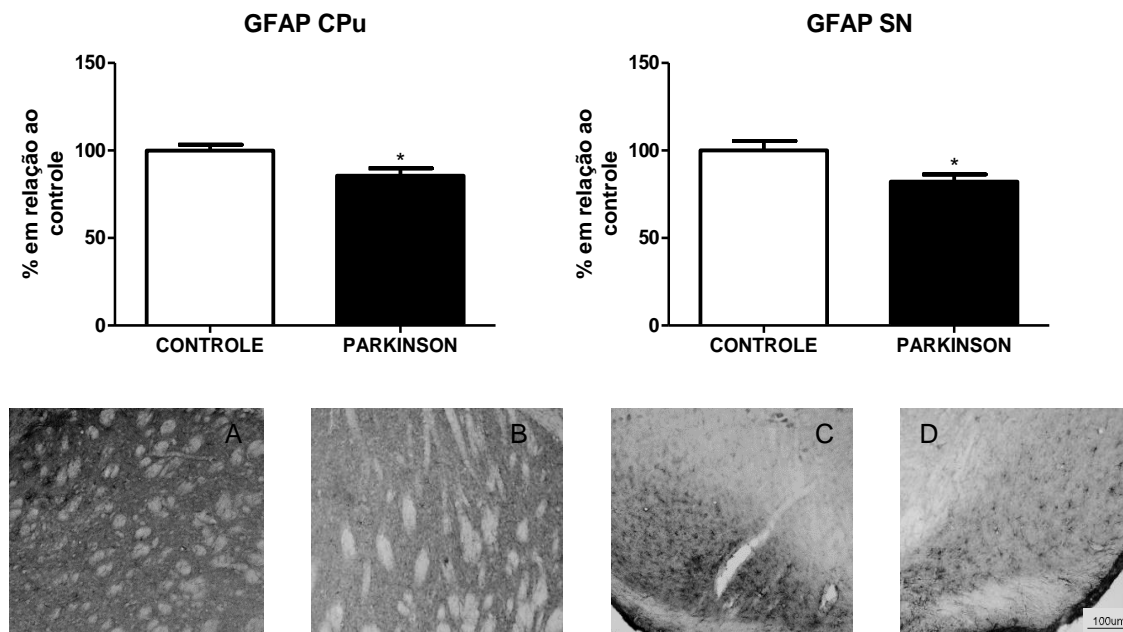


Figura 12 - Representação gráfica do experimento de imuno-histoquímica, dos animais nocaute para o receptor B2, utilizando o anticorpo anti - GFAP, para análise das células da glia, na concentração de 1:1000. Foi comparado o grupo controle com o grupo de animais com modelo para DP, sendo (A) estriado, animal controle; (B) estriado, animal injetado 6-OHDA; (C) substância negra, animal controle; (D) substância negra, animal injetado 6-OHDA. Foram analisados duas estruturas: a substância negra (SN) e o estriado (CPu). Imagem capturada com objetiva 10 X. N=5; P<0,05.

### 6.2.3 Antagonista HOE-140

Para analisar o envolvimento do receptor B2 no modelo da DP, foi utilizado o antagonista HOE-140, na concentração de 1 µM. A injeção foi realizada juntamente com a 6-OHDA, e os animais foram mantidos no biotério por 15 dias. Primeiramente foi avaliada a tirosina-hidroxilase, nas duas estruturas de estudo, estriado e substância negra, por *Western Blotting*. Como pode ser observado, nas duas estruturas analisadas foi encontrada uma diminuição da tirosina-hidroxilase, com uma redução de aproximadamente 50 % (p<0,05) em relação ao controle, como visto no gráfico abaixo (Figura 13). As médias e o erro padrão estão apresentados no apêndice 2.



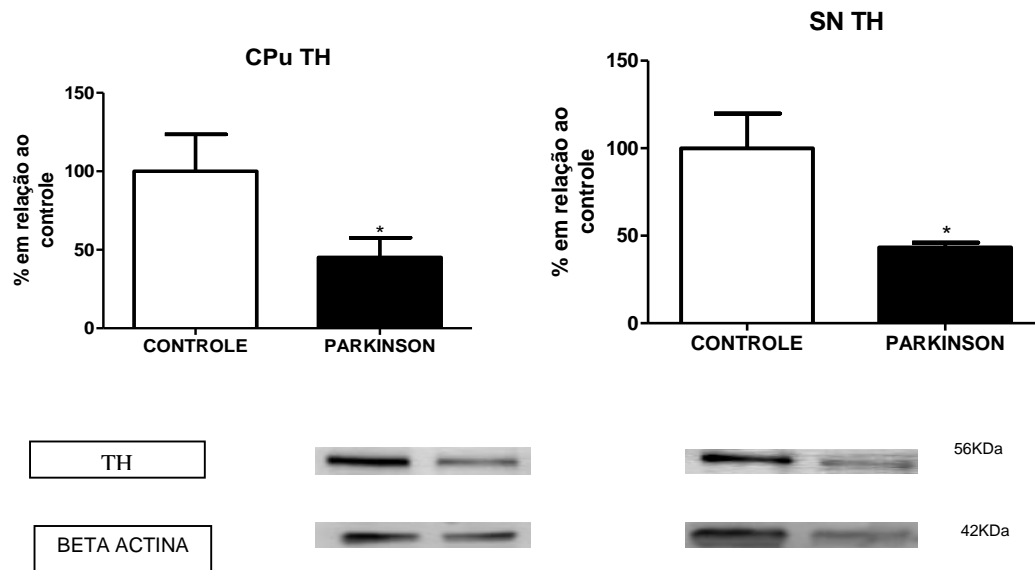


Figura 13 - Representação gráfica da expressão de tirosina-hidroxilase, na técnica de *Western Blotting*, na concentração 1:1000, em animais em que foi injetado antagonista para o receptor de bradicinina, B2 (HOE-140). Peso molecular 56KDa, analisando o estriado (CPu) e a substância negra (SN). N= 5 e \* $p < 0,05$ .

Com a mesma técnica, no caso *Western Blotting*, foi avaliada a quantidade de células da glia através do anticorpo anti-GFAP. Foi avaliada também nas duas estruturas, no CPu e na SN, e foi observado que não houve alteração de células da glia quando os animais foram tratado com antagonista para receptor B2 quando avaliado o CPu, contudo quando analisado a SN foi encontrado uma redução de células da glia em relação ao controle de aproximadamente 40 % ( $p < 0,05$ ), as médias e o erro padrão estão apresentados no apêndice 2. A Figura 14 representa a quantificação das bandas.

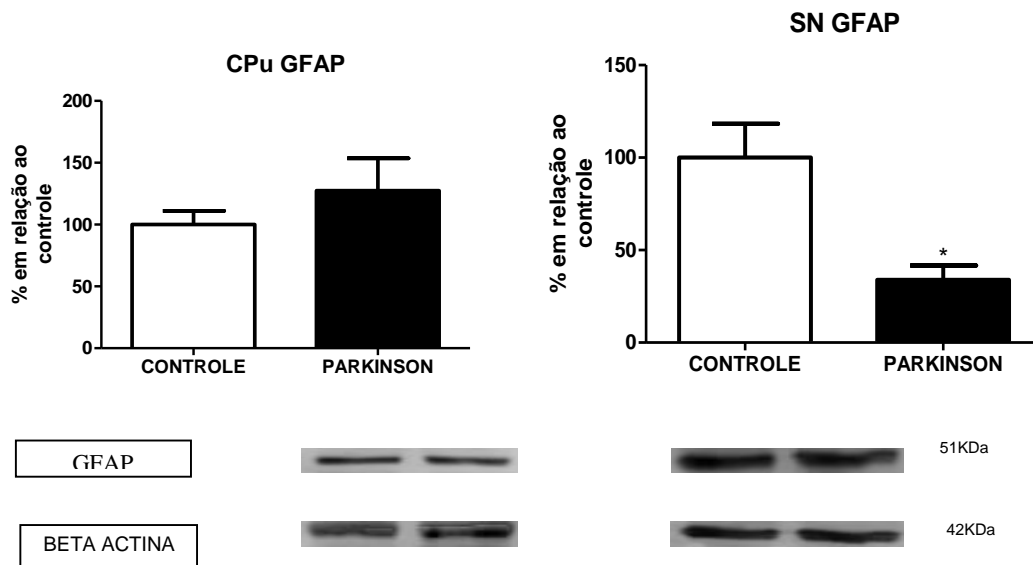


Figura 14 - Representação gráfica da expressão de células da glia, com a utilização do anticorpo anti – GFAP, na técnica de Western Blotting, na concentração 1:1000, em animais em que foi injetado antagonista para o receptor de bradicinina, B2 (HOE-140). Peso molecular 51KDa, analisando o estriado (CPu) e a substância negra (SN). N= 5 e \* $p < 0,05$ .

Outro experimento realizado foi o de imuno-histoquímica, em que foi analisada a tirosina-hidroxilase nas duas estruturas, no CPu e na SN; contudo dessa vez foi observado que na SN houve uma redução de aproximadamente 60 % ( $p < 0,01$ ) dos neurônios dopaminérgicos, comparando o modelo da DP com os animais controle. Quando estudado no CPu, foi encontrada diminuição de tirosina- hidroxilase de aproximadamente 40 % ( $p < 0,05$ ) em relação aos grupos de estudo; os resultados estão representados na Figura 15. As médias e o erro padrão estão apresentados no apêndice 2.

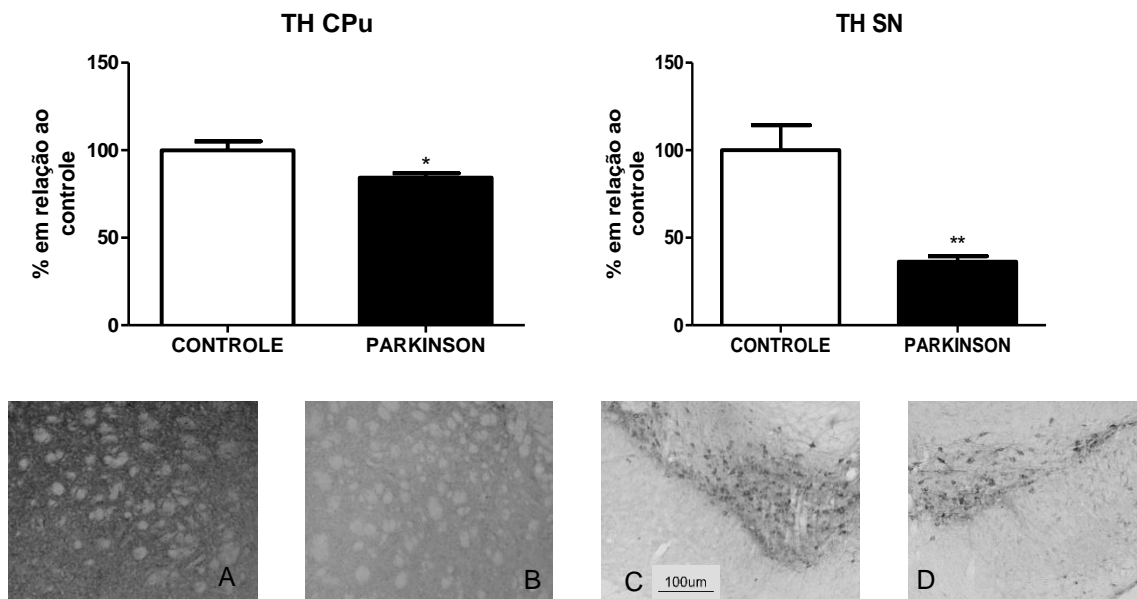


Figura 15 - Representação gráfica do experimento de imuno-histoquímica, dos animais que foi injetado com antagonista do receptor de bradicinina, B2 (HOE-140), utilizando o anticorpo para tirosina hidroxilase, na concentração de 1:1000. Foi comparado o grupo controle com o grupo de animais com modelo para DP, sendo (A) estriado, animal controle; (B) estriado, animal injetado 6-OHDA; (C) substância negra, animal controle; (D) substância negra, animal injetado 6-OHDA. Foram analisadas duas estruturas: a substância negra (SN) e o estriado (CPu). As imagens foram capturas na objetiva 10 X. N=5 e \* $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$ .

Outro anticorpo analisado por imuno-histoquímica nesses animais foi o anti-GFAP. Como observado na representação gráfica, em nenhuma das estruturas, no CPu e na SN, foi visto alteração, indicando que tanto no grupo tratado e quanto no grupo controle não houve alteração na quantidade de células da glia (Figura 16). As médias e o erro padrão estão apresentados no apêndice 2.

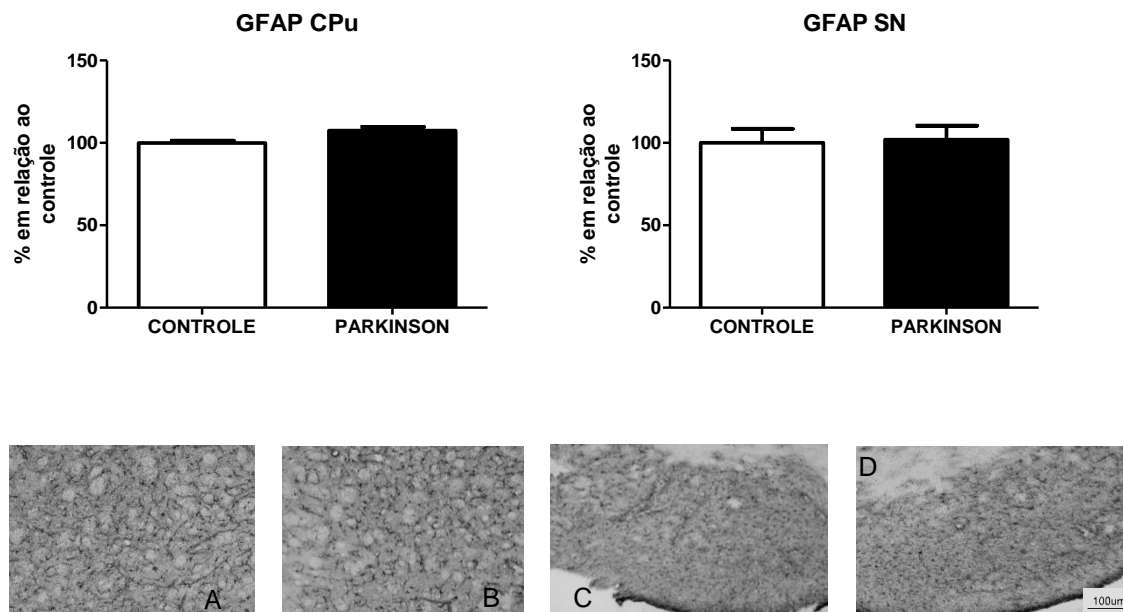


Figura 16 - Representação gráfica do experimento de imuno-histoquímica, dos animais que foi injetado com antagonista do receptor de bradicinina, B2 (HOE-140), utilizando o anticorpo anti - GFAP, na concentração de 1:1000. Foi comparado o grupo controle com o grupo de animais com modelo para DP, sendo (A) estriado, animal controle; (B) estriado, animal injetado 6-OHDA; (C) substância negra, animal controle; (D) substância negra, animal injetado 6-OHDA. Foram analisadas duas estruturas: a substância negra (SN) e o estriado (CPu). As imagens foram capturadas na objetiva de 10 X. N=5.

#### 6.2.4 Agonista BK

Nos animais induzidos ao modelo da DP foi também aplicado um agonista para o receptor B2. Nesse caso foi utilizado bradicinina (Bk), na concentração de 1  $\mu$ M. A injeção foi realizada junto com a 6-OHDA e os animais foram mantidos por 15 dias e após isso foram sacrificados de acordo com os experimentos.

Inicialmente foi realizado o experimento de *Western blotting*, sendo analisado a expressão de tirosina-hidroxilase, em que foi observado que nem no CPu e nem na SN, não foi encontrada alteração significativa (as médias e o erro padrão estão apresentados no apêndice 2), quando comparado o grupo com modelo da DP com os animais controle, como pode ser observado na Figura 17.

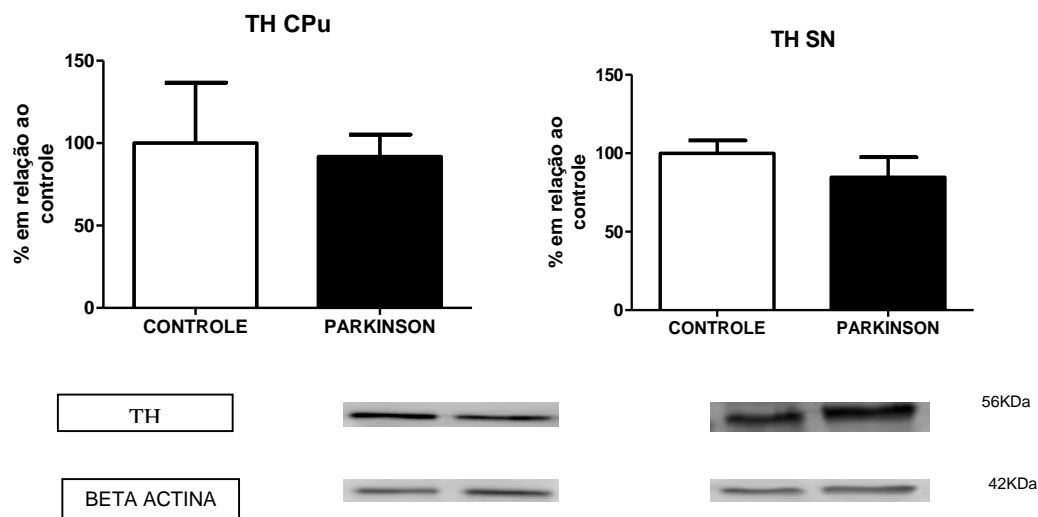


Figura 17 - Representação gráfica da expressão de tirosina-hidroxilase, na técnica de Western Blotting, na concentração 1:1000, em animais em que foi injetado agonista para o receptor de bradicinina, B2 (BK). Peso molecular 56KDa, analisando o estriado (CPu) e a substância negra (SN). N= 5.

Utilizando a mesma técnica, foi então avaliada a expressão de GFAP após injeção com o agonista. E foi observado que nas duas estruturas não foi encontrado diferença do grupo com indução do modelo de DP em relação ao grupo controle. As médias e o erro padrão estão apresentados no apêndice 2. A representação gráfica pode ser vista na Figura 18 abaixo.

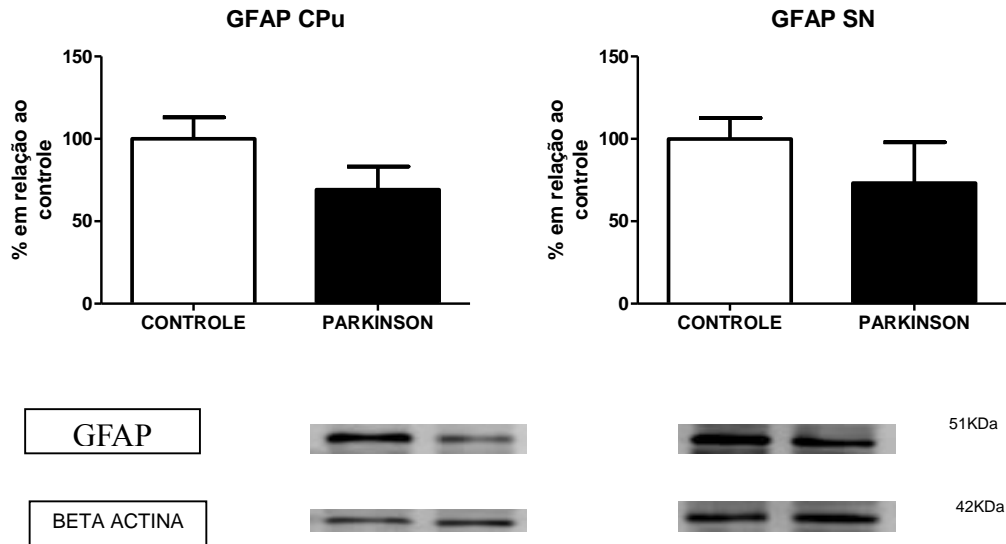


Figura 18 - Representação gráfica da expressão de células da glia, com a utilização do anticorpo anti – GFAP, na técnica de Western Blotting, na concentração 1:1000, em animais em que foi injetado agonista para o receptor de bradicinina, B2 (BK). Peso molecular 51KDa, analisando o estriado (CPu) e a substância negra (SN). N= 5.

Outro método utilizado para avaliar os efeitos do uso da bradicinina nos animais com indução do modelo de DP foi o método de imuno-histoquímica. Quando analisado o anticorpo tirosina-hidroxilase, foi observado que no CPu e na SN não foi encontrada diferença significativa entre os grupos controle e o modelo da DP, como visto na Figura 19. As médias e o erro padrão estão apresentados no apêndice 2.

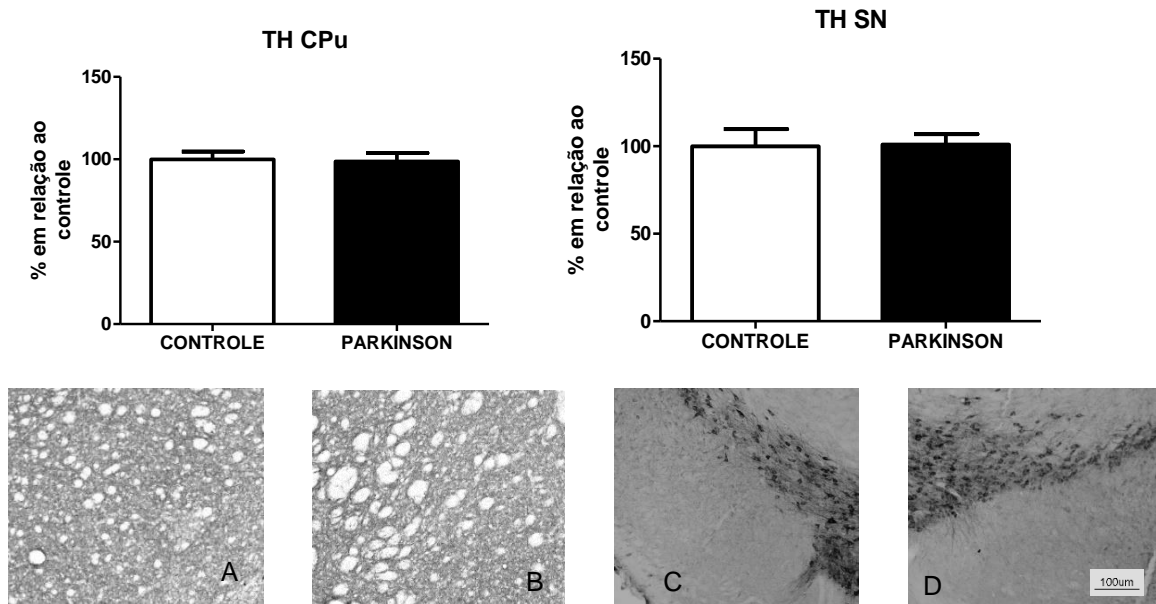


Figura 19 - Representação gráfica do experimento de imuno-histoquímica, dos animais que foi injetado agonista do receptor de bradicinina B2 (BK), utilizando o anticorpo para tirosina hidroxilase, na concentração de 1:1000. Foi comparado o grupo controle com o grupo de animais com modelo para DP, sendo (A) estriado, animal controle; (B) estriado, animal injetado 6-OHDA; (C) substância negra, animal controle; (D) substância negra, animal injetado 6-OHDA. Foram analisadas duas estruturas: a substância negra (SN) e o estriado (CPu). As imagens foram capturadas na objetiva de 10 X. N=5.

Com essa mesma técnica de imuno-histoquímica, avaliamos a expressão de GFAP. Foi observado que não houve alteração significativa do grupo tratado com 6-OHDA e agonista do receptor B2 em relação ao grupo controle; esses resultados foram vistos tanto no CPu, quanto na SN, as médias e o erro padrão estão apresentados no apêndice 2. A Figura 20 representa os resultados descritos.

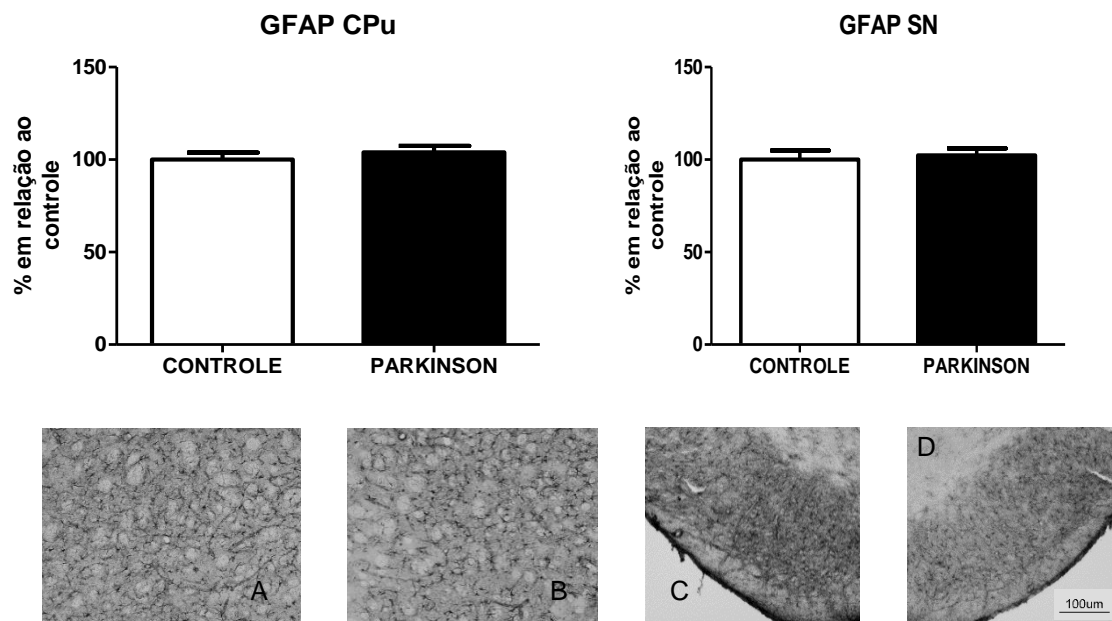


Figura 20 - Representação gráfica do experimento de imuno-histoquímica, dos animais que foi injetado com agonista do receptor de bradicinina, B2 (BK), utilizando o anticorpo anti – GFAP, na concentração de 1:1000. Foi comparado o grupo controle com o grupo de animais com modelo para DP, sendo (A) estriado, animal controle; (B) estriado, animal injetado 6-OHDA; (C) substância negra, animal controle; (D) substância negra, animal injetado 6-OHDA. Foram analisadas duas estruturas: a substância negra (SN) e o estriado (CPu). As imagens foram capturadas na objetiva de 10 X. N=5.

### 6.2.5 Discussão

Os resultados encontrados quando avaliado o sistema de cininas sugerem que há um aumento na expressão do receptor B2 após a injeção de 6-OHDA, indicando um possível envolvimento desse receptor na neurodegeneração. Esses resultados vão de acordo com o trabalho de Caetano et al., 2015, em que afirmam a presença aumentada de receptor B2 de bradicinina em modelo de Doença de Alzheimer, modelo similar ao utilizado nesse estudo em que injeta proteína  $\beta$ -amiloide no encéfalo dos animais.

O receptor B2 tem sido associado com neurodegeneração em alguns modelos animais (MARTINS et al., 2012; TORRES-RIVERA et al., 2013). Da mesma forma, o receptor B1 tem sido associado positivamente com processos



neurodegenerativos (AUSTINAT et al., 2009; MARTINS et al., 2012). Entretanto, há dados conflitantes na literatura. Como é o caso de um estudo que bloqueio o receptor B2 e revelou uma neuroproteção no modelo de isquemia cerebral (LUMENTA et al., 2006), o que sugere a necessidade de mais estudos sobre o tema. O modelo de Parkinson usado nesse projeto poderia ajudar para uma resposta sobre a questão.

Como foi observado, os animais nocautes e os que foram injetados com antagonista específico para o receptor B2, apresentaram níveis de tirosina hidroxilase diminuídos. O receptor B2 é caracterizado como um receptor constitutivo e que estimula rapidamente a dessensibilização, levando ação da via intracelular, a hidrólise de fosfatidil inositol (IP) e aumento de cálcio intracelular nas células (BASCANDS et al., 1993, SMITH et al., 1995, MATHIS et al., 1996). Em neurônios, o aumento de cálcio pela sinalização mediada pelo receptor B2 e inositol-1,4,5-trifosfato é um fator crítico para a indução de microdomínios que levam a resposta seletiva, discriminando informações associadas com o receptor B2 (DELMAS et al., 2002).

O trabalho de Su et al., 2009, vai de acordo com os resultados encontrados nesse trabalho, em que inibiram os receptor B2 e observaram redução da gravidade neurológica, permeabilidade da barreira hematoencefálica e liberação de citocinas que estimulam o receptor B1, ou seja, a inibição do receptor B2 leva ao suprimento dos níveis de proteínas do receptor B1.

Nesse sentido, Viel e Buck (2011) sugeriram que o receptor B2 pode desempenhar um papel de neuroproteção, uma vez que a ausência desse

receptor acelerou o déficit cognitivo observado somente na quinta semana após o início do período de infusão de  $\beta$ -amiloide, como observado em animais C<sub>57</sub>Bl<sub>6</sub>. Além disso, o receptor B1 pode contribuir para neurodegeneração, uma vez que a ausência desse receptor aparentemente previne déficits cognitivos normalmente observados no final do período de infusão. A regulação normal desses receptores faz sugerir que a presença desses receptores podem ser alternados pela ausência do receptor B1 ou B2.

Um outro ponto interessante encontrado nos resultados desse trabalho foi o fato de que quando foi injetado agonista, no caso BK, nos animais e os níveis de tirosina hidroxilase e astrócitos, não diferiram do controle. Esse fato pode estar relacionado com o trabalho desenvolvido por Bem-Shmuel et al., 2013, em que avaliou a sinalização de cAMP como um possível mecanismo envolvido em como a BK induz a redução da produção de óxido nítrico (NO) em linhagem de células da micróglia, BV2. Nesse trabalho os autores observaram que a BK reduz a produção de NO nas células da micróglia por um mecanismo dependente de receptor acoplado com proteína Gi e envolvendo a inibição da sinalização cAMP-PKA-CREB, o NO estaria enormemente envolvido no processo de neurodegeneração.

Por outro lado, um resultado que pouco se sabe na literatura é a ação dos astrócitos quando ocorre alteração da concentração de BK e também quando os receptores estão ativos ou inativos no modelo de DP, utilizando 6-OHDA. Dentre essa discussão o trabalho de Nicoletti et al., 2016 afirma que foi demonstrado que a autoregulação do receptor B1 em astrócitos reativos em torno de injeção de A $\beta$ , num modelo genético da doença de Alzheimer. Ainda afirmam que não é possível excluir que o receptor B1 também tem ação em

outras células centrais, tais como microglia, neurônios e oligodendrócitos. Nesse sentido, foi observado que os receptores de cinina estão envolvidos na proliferação das células de gliomas *in vivo*.

O trabalho de Batassini et al., 2015 mostrou que no modelo de DP, utilizando 6-OHDA, os animais após 7 e 21 dias de lesão tem um aumento gradativo de astrócitos em relação aos animais controle, quando avaliado o CPu. Contudo, quando foi avaliado a SN nesse mesmo período de tempo, foi observado que a porcentagem de astrócitos foi semelhante ao controle. Os autores então concluem que a disfunção dos astrócitos pode estar relacionada com o progresso e iniciação da DP.

Por fim, o envolvimento das cininas no modelo de DP, por 6-OHDA, sugere que estão envolvidos tanto o receptor B2 quando o B1, sendo que cada um agindo da sua maneira, mas um interferindo na ação do outro.

### 6.3 Receptores Purinérgicos – Resultados e discussão

#### 6.3.1 P2X2

Inicialmente foi utilizada a técnica de *Western blotting* para verificar a expressão do receptor P2X2 no modelo de DP. As mesmas estruturas citadas anteriormente foram analisadas e foi observado que na SN houve aumento de aproximadamente 80 % ( $p < 0,001$ ), (Figura 21). No CPu não foi observada alteração entre os grupos tratado e controle (Figura 21). As médias e o erro padrão estão apresentados no apêndice 1.

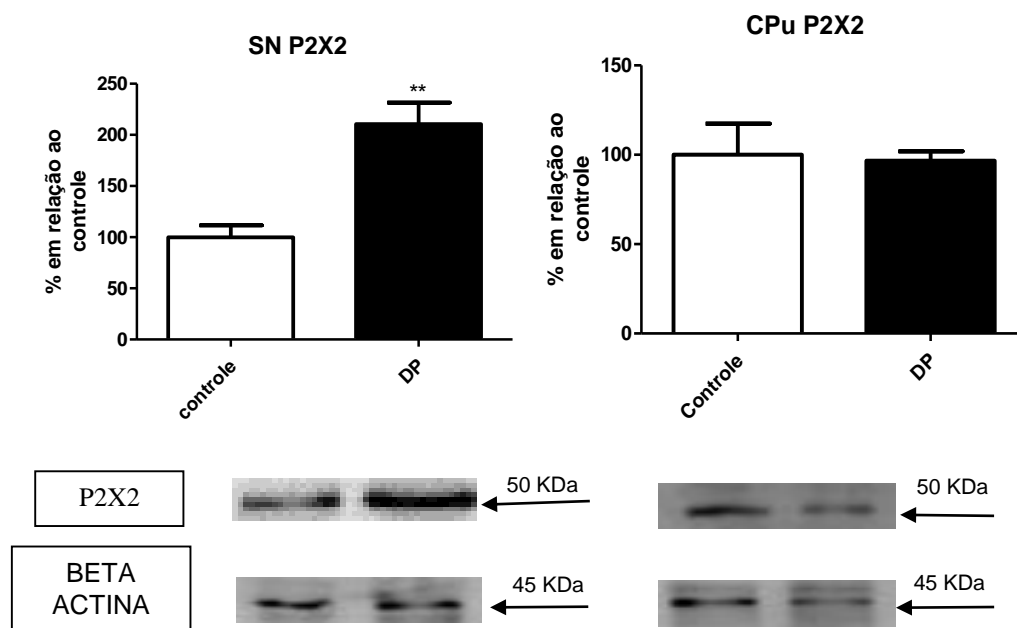


Figura 21 - Representação gráfica da expressão do receptor P2X2 na técnica de *Western Blotting*, utilizando o anticorpo para P2X2, na concentração 1:1000, Peso molecular 50KDa, analisando a substância negra (SN) e o estriado (CPu). N= 5 e \*  $p < 0,05$ .

Em relação à técnica de imuno-histoquímica, os resultados encontrados em relação para o anticorpo do receptor P2X2 mostraram que houve aumento

de aproximadamente 40 % ( $p < 0,05$ ) na SN (Figura 22). No CPu, não houve alteração entre os grupos (Figura 22). As médias e o erro padrão estão apresentados no apêndice 1. Os resultados são semelhantes aos vistos na técnica de *Western Blotting*.

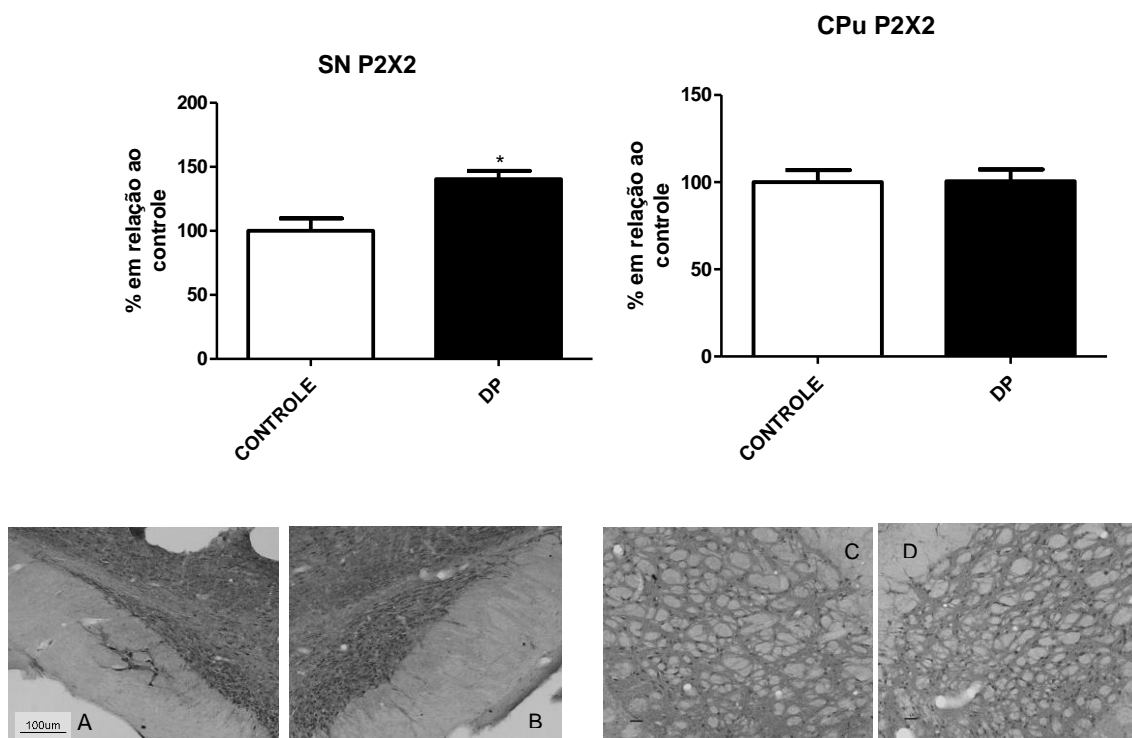


Figura 22 - Representação gráfica do experimento de imuno-histoquímica, utilizando o anticorpo para P2X2, na concentração de 1:500. Foi comparado o grupo controle com o grupo de animais com DP. Foram analisadas duas estruturas a substância negra (SN) e o estriado (CPu). A) Substância Negra (SN) animal controle; B) Substância Negra (SN) animal com DP; C) Estriado (CPu) em animal controle; D) Estriado (CPu) em animal com DP. As imagens foram capturadas na objetiva de 10 X. N=5 e  $*p < 0,05$ .

### 6.3.2 P2X4

Os resultados observados na técnica de *Western Blotting* mostraram que houve aumento do receptor P2X4 próximo de 40 % ( $p < 0,05$ ) no CPu dos animais com DP (Figura 23). Nesse sentido, quando foi analisado este mesmo receptor

na SN o aumento foi pouca coisa maior, sendo de aproximadamente 30 % ( $p < 0,05$ ) (Figura 23), comparando os animais DP com os controle. As médias e o erro padrão estão apresentados no apêndice 1. Estes resultados sugerem que em ambas estruturas há expressão aumentada deste receptor nos animais DP.

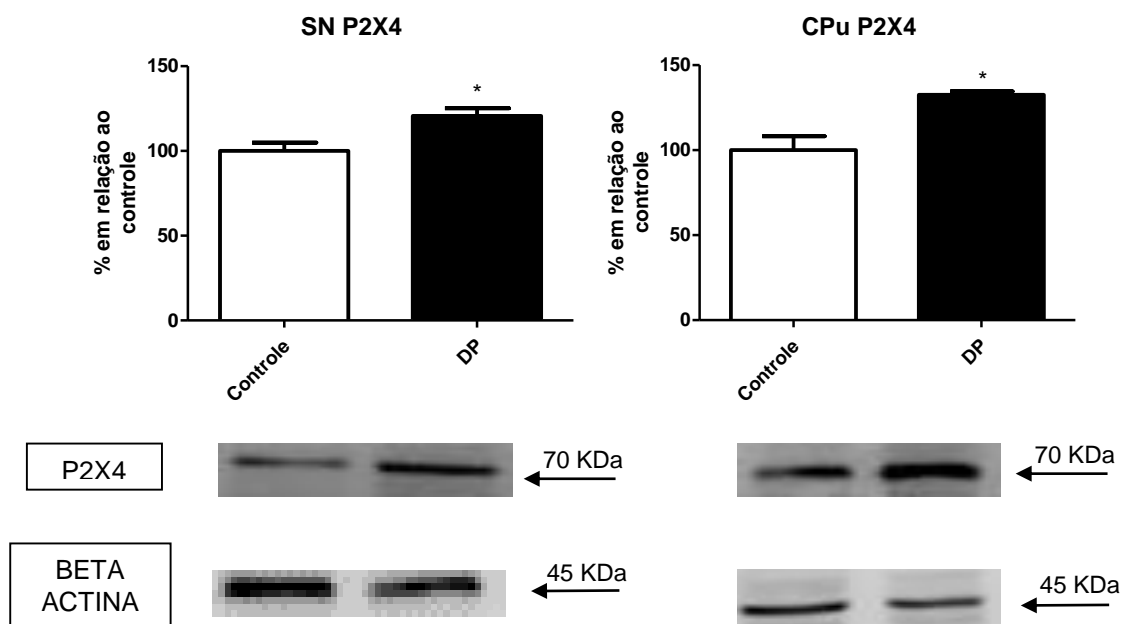


Figura 23 - Representação gráfica dos ensaios de Western blotting. Foi utilizado o anticorpo para P2X4, na concentração de 1:1000, Peso Molecular 70KDa. Foi comparado o grupo controle com o grupo com DP. As estruturas avaliadas foram a substância negra (SN) e estriado (CPu). N=5 e \* $p < 0,05$ .

Este receptor também foi analisado na técnica de imuno-histoquímica, em que foi observado resultado semelhante ao *Western Blotting*. Foi encontrado aumento de aproximadamente 30 % ( $p < 0,05$ ) (Figura 24), do grupo DP em relação ao grupo controle na SN. Quando avaliado o CPu, foi visto que houve um aumento de 40 % ( $p < 0,05$ ) no grupo DP (Figura 24). As médias e o erro padrão estão apresentados no apêndice 1.

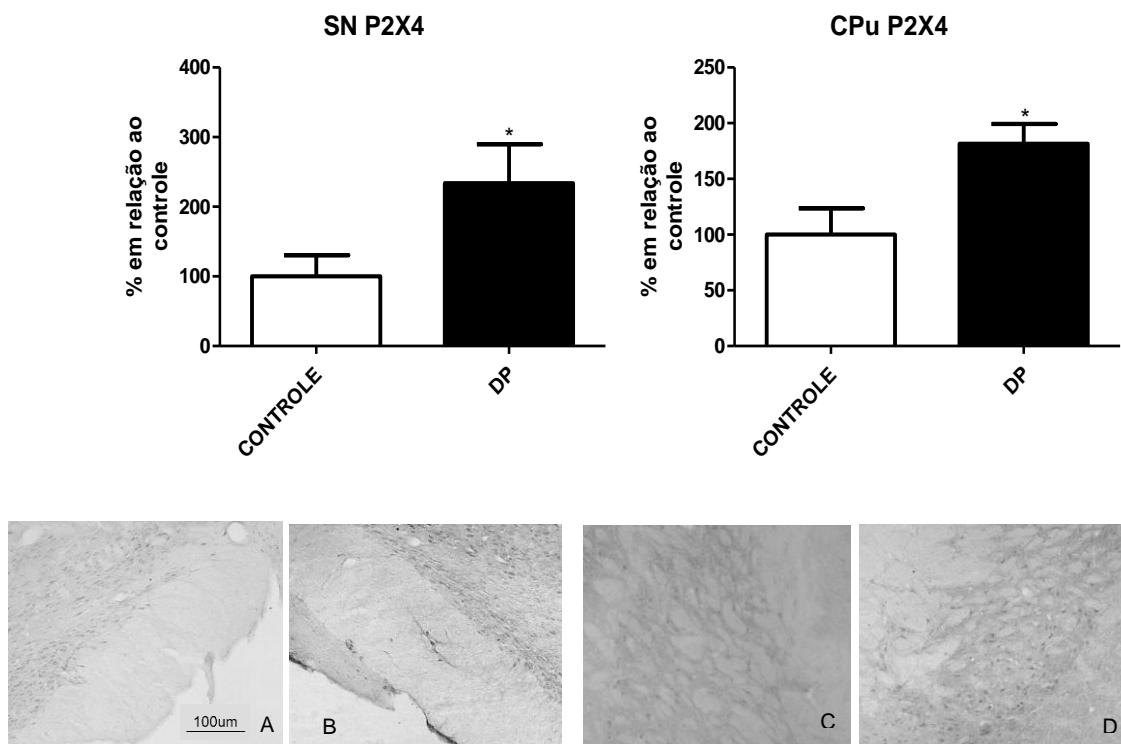


Figura 24 - Representação gráfica do experimento de imuno-histoquímica, utilizando o anticorpo para P2X4, na concentração de 1:1000. Foi comparado o grupo controle com o grupo de animais com DP. Foram analisadas duas estrutura a substância negra (SN) e o estriado (CPu). A) Substância Negra (SN) animal controle; B) Substância Negra (SN) animal com DP; C) Estriado (CPu) em animal controle; D) Estriado (CPu) em animal com DP. As imagens foram capturadas na objetiva de 10 X. N=5 e \* $p < 0,05$ .

### 6.3.3 P2X7

A técnica de *Western Blotting* foi utilizada para verificar a presença da proteína do receptor P2X7. Foi observado que na SN houve aumento de 45 % ( $p < 0,05$ ) no grupo DP quando comparado com o grupo controle (Figura 25). Já quando analisado este receptor no CPu, não foi observada diferença significativa entre os grupos (Figura 25). As médias e o erro padrão estão apresentados no apêndice 1.

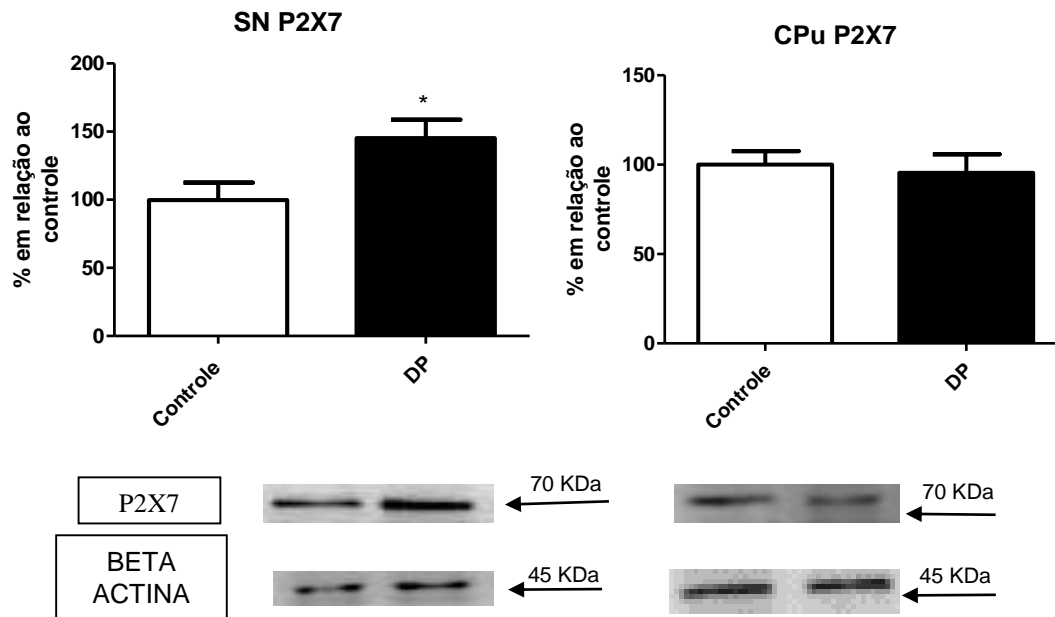


Figura 25 - Representação gráfica dos ensaios de *Western blotting*. Foi utilizado o anticorpo para P2X7, na concentração de 1:1000, Peso Molecular 70KDa. Foi comparado o grupo controle com o grupo com DP. As estruturas avaliadas foram a substância negra (SN) e estriado (CPu). N=5 e \* $p < 0,05$ .

O mesmo anticorpo para o receptor P2X7 foi utilizada na técnica de imuno-histoquímica. Na SN foi encontrada diferença significativa entre os grupos, sendo que no grupo DP houve um aumento de 30 % ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle (Figura 26). Quando analisado o CPu foi observada diferença significativa entre os grupos, sendo que o grupo DP teve aumento da proteína de 40 % ( $p < 0,05$ ), comparada com o controle (Figura 26), as médias e o erro padrão estão apresentados no apêndice 1.



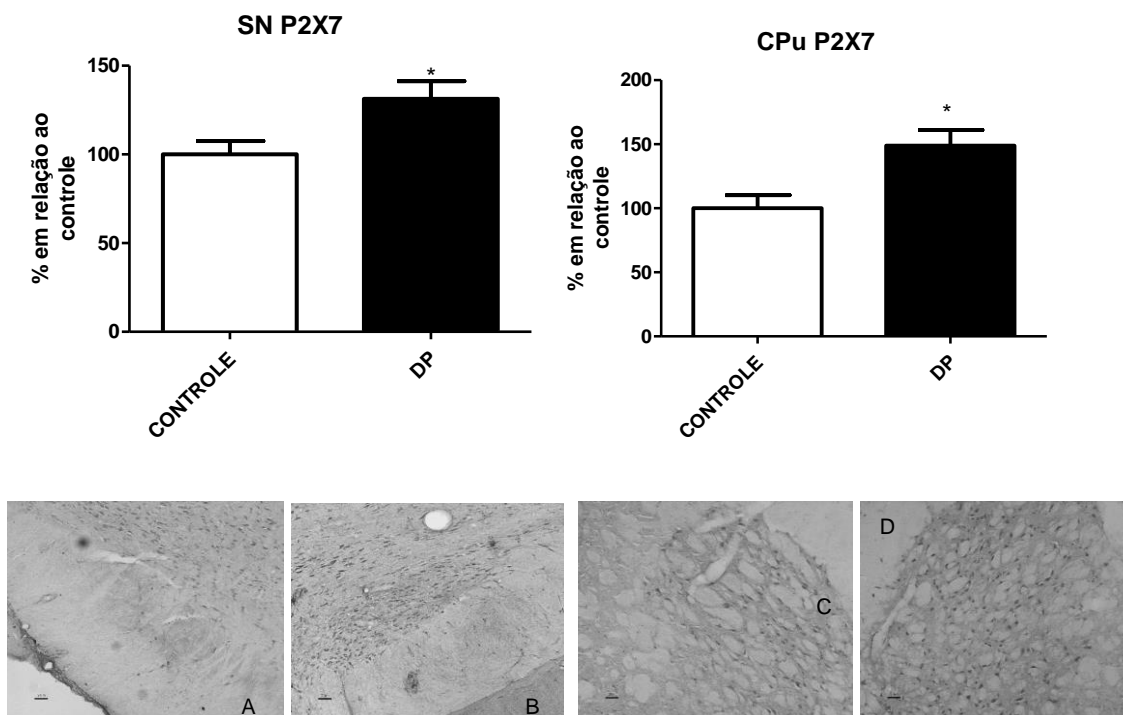


Figura 26 - Representação gráfica do experimento de imuno-histoquímica, utilizando o anticorpo para P2X7, na concentração de 1:1000. Foi comparado o grupo controle com o grupo de animais com DP. Foram analisadas duas estrutura a substância negra (SN) e o estriado (CPu). A) Substância Negra (SN) animal controle; B) Substância Negra (SN) animal com DP; C) Estriado (CPu) em animal controle; D) Estriado (CPu) em animal com DP. As imagens foram capturadas na objetiva de 10 X. N=5 e \* $p < 0,05$ .

#### 6.3.4 P2Y4

A proteína do receptor P2Y4 foi avaliada pela técnica de *Western Blotting*, foi observada diferença em relação aos grupos quando foi analisada a SN. No grupo com modelo de DP houve um aumento de aproximadamente 150 % ( $p < 0,001$ ) (Figura 27). Contudo, quando analisada o CPu, não foi observada alteração significativa entre os grupos (Figura 27). As médias e o erro padrão estão apresentados no apêndice 1.

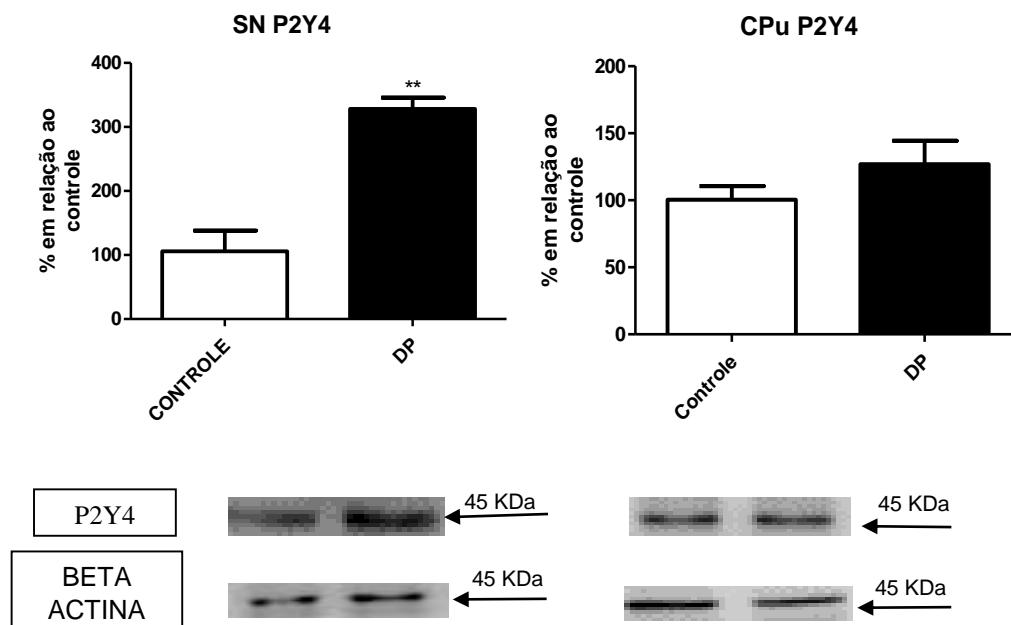


Figura 27 - Representação gráfica dos ensaios de *Western blotting*. Foi utilizado o anticorpo para P2Y4, na concentração de 1:500, Peso Molecular 45KDa. Foi comparado o grupo controle com o grupo com DP. As estruturas avaliadas foram a substância negra (SN) e estriado (CPu). N=5 e \* $p < 0,05$ .

O mesmo aconteceu quando foi analisado este receptor na técnica de imuno-histoquímica, em que a SN apresentou aumento, menor do que o encontrado na técnica de *Western Blotting*, sendo que o grupo DP mostrou aumento de 20 % ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle (Figura 28). Já no CPu, foi observado o mesmo resultado da técnica anterior, em que os grupos não apresentam diferença significativa (Figura 28). As médias e o erro padrão estão apresentados no apêndice 1.

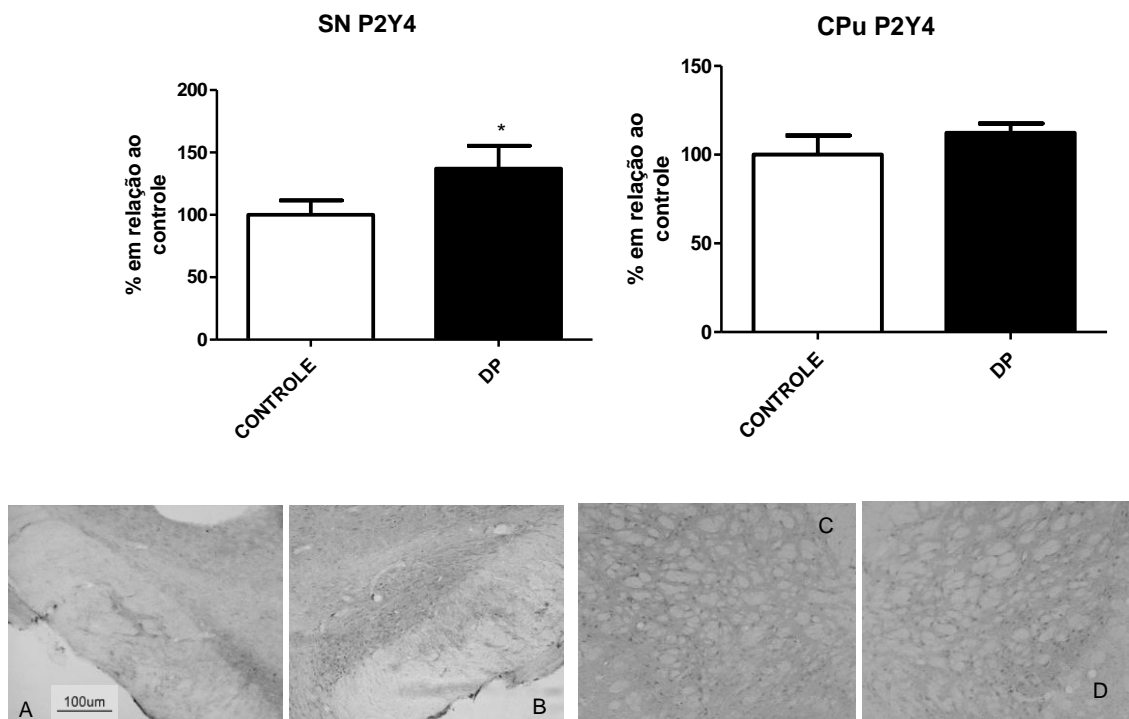


Figura 28 - Representação gráfica do experimento de imuno-histoquímica, utilizando o anticorpo para P2Y4, na concentração de 1:250. Foi comparado o grupo controle com o grupo de animais com DP. Foram analisadas duas estrutura a substância negra (SN) e o estriado (CPu). A) Substância Negra (SN) animal controle; B) Substância Negra (SN) animal com DP; C) Estriado (CPu) em animal controle; D) Estriado (CPu) em animal com DP. As imagens foram capturadas na objetiva de 10 X. N=5 e \* $p < 0,05$ .

### 6.3.5 Discussão

Os receptores purinérgicos são canais iônicos de membrana sensíveis a ATP, e quando ativos possibilitam a permeabilidade de íons como sódio, potássio e principalmente de cálcio, isto para os receptores purinérgicos do subtipo P2X. O aumento intracelular destes íons induz alterações nos neurônios, dentre elas mediando a transmissão sináptica e facilitando a plasticidade sináptica (SURPRENANT; NORTH, 2009). O outro subtipo do receptor purinérgico, o P2Y é receptor de membrana metabotrópico acoplado a proteína Gq.

Os receptores purinérgicos são divididos em P2X e P2Y, e neste trabalho foram analisados: P2X2, P2X4, P2X7 e P2Y4. Estes receptores foram escolhidos por estarem bastante expressos no encéfalo.

Trabalho de Rubio e Soto (2001), mostrou que as subunidades dos receptores purinérgicos P2X2 e P2X4 participam das sinapses excitatórias no encéfalo. Nesse sentido, foi visto que o receptor P2X2 nos neurônios pré-sinápticos aumenta a liberação de glutamato nos interneurônios (KHAKH et. al., 2003).

Além disso, foi observado que em animais nocautes para o receptor P2X2, durante a diferenciação neuronal, acontece uma diminuição da expressão da  $\beta$ -3-tubulina, indicando prejuízo no processo da neurogênese (YUHASHI, et. al. 2012). De acordo com os resultados encontrados nesse trabalho, que revelou aumento deste receptor na SN, podendo sugerir uma possível alteração neuronal por aumento na liberação de neurotransmissor, como glutamato, deixando as células com maior possibilidade de excitabilidade em animais com DP.

As subunidades do receptor purinérgico P2X4 são encontradas no encéfalo, especialmente em sinapses excitatórias. Além disso, foi observado que a ativação do receptor mediada por ATP causa a liberação de fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) na micróglia, indicando que age em fatores que estão envolvidos na inflamação (COULL, 2005). Desta maneira, pode-se sugerir que os resultados encontrados nesse trabalho, em que nas duas estruturas analisadas há um aumento deste receptor, indicam que estes receptores podem estar envolvidos no processo inflamatório presente durante o desenvolvimento da DP.

O trabalho de Khoja et al., 2016, mostrou que em animais nocaute para P2X4 foi encontrado um aumento de TH no estriado na região dorsal. Desta forma os autores concluíram que esse receptor está envolvido em múltiplas funções do SNC e regula a formação de dopamina.

Outro subtipo de receptor purinérgico analisado foi o P2X7, que tem sido associado com a indução de proliferação e gliogênese (YUAHASI, et. al. 2012). O trabalho realizado por Ulrich e colaboradores (2012), mostrou que a subunidade P2X7 participa no direcionamento da migração e neurogênese, promovendo a radiação de células da glia durante o desenvolvimento do córtex.

Mais um subtipo de receptor purinérgico, contudo agora acoplado a proteína Gq, o receptor P2Y4, foi também avaliado neste trabalho. Quando ativado, pode inibir a liberação de glutamato no neurônio pré-sináptico e modular a função da barreira hematoencefálica (RODRIGUES et. al., 2005). Este receptor é encontrado também na micróglia e em astrócitos. Na glia está localizado nos prolongamentos gliais nos vasos sanguíneos, regulando o fluxo sanguíneo, metabolismo e fluxo de água nas células (BIANCO et. al., 2005).

Considerando a função desempenhada pelo receptor P2Y4 e levando em consideração os resultados encontrados nesse trabalho, pode-se inferir que o aumento na proteína e a presença dele nas células indica que pode atuar na direção de manter as células íntegras, pela regulação metabólica das células e por possível ação gênica que estes receptores podem desempenhar, mesmo quando os animais sofreram lesão tipo DP.

Diante dos trabalhos e avaliando os resultados obtidos nesse estudo quando avaliado os subtipos dos receptores purinérgicos, nos permite pensar que o aumento da expressão da proteína e a presença deste receptor nas células,

principalmente por ser maior na DP, sugere que este receptor pode estar envolvido na DP. Levando em consideração o mecanismo de ação de cada subtipos, mas pode-se supor que cada um dos subtipos são ativados quando os animais são induzidos ao modelo de DP por 6-OHDA.

## 6.4 Canal de potencial transiente - TRPM7– Resultados e discussão

### 6.4.1 TRPM7

Inicialmente foi utilizada a técnica de *Western blotting* para verificar o possível envolvimento do receptor TRPM7 na DP. Foi observado que na SN houve um aumento de expressão de aproximadamente 50 % ( $p < 0,05$ ) nos animais com modelo da DP, quando comparado com os animais controle (Figura 29). No CPu foi observado um aumento de aproximadamente 50 % ( $p < 0,05$ ) dos animais com modelo da DP em relação ao controle (Figura 29). As médias e o erro padrão estão apresentados no apêndice 1.

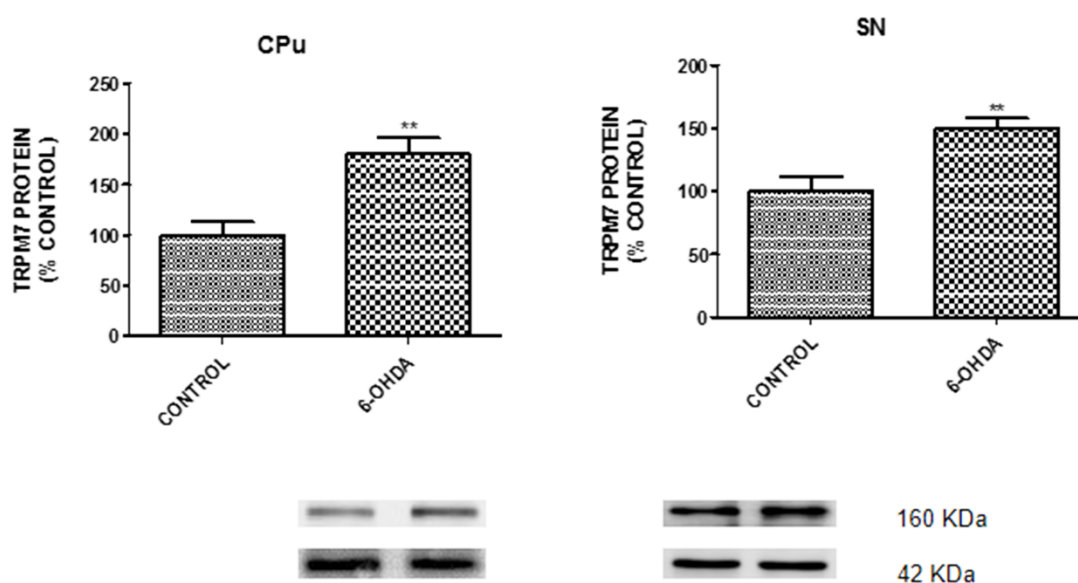


Figura 29 - Representação gráfica da expressão do receptor TRPM7 na técnica de Western Blotting, utilizando o anticorpo para TRPM7, na concentração 1:5000, Peso molecular 160KDa, analisando a substância negra (SN) e o estriado (CPu). N= 5 e \*  $p < 0,05$ .

O mesmo anticorpo foi utilizado na técnica de imuno-histoquímica, e nesse caso foi observado que na SN reticulata dos animais que tinham sido submetidos ao modelo da DP não apresentaram alteração na marcação de

quando comparado com os animais controle. Estes dados foram obtidos a partir das imagens dos cortes de cada região cerebral, como mostrado na Figura 30. As médias e o erro padrão estão apresentados no apêndice 1. Em contrapartida, foi encontrada diferença entre o grupo que foi induzido ao modelo de DP em relação ao grupo controle de aproximadamente 30 % ( $p < 0,05$ ) quando analisado o CPu. As representações gráficas estão mostradas na figura 30 abaixo.

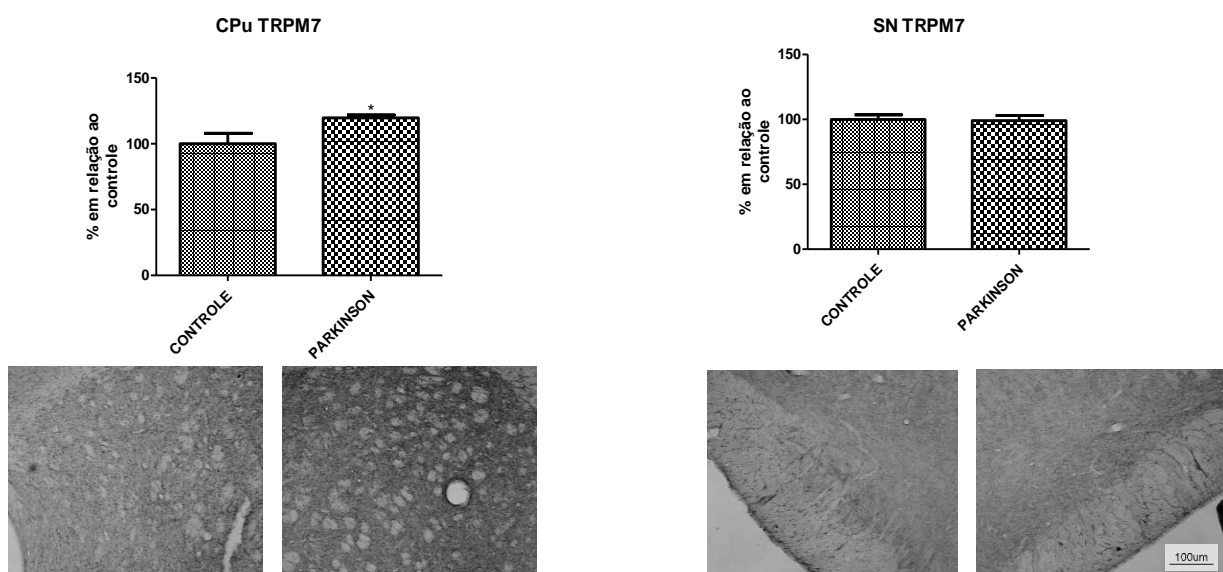


Figura 30 - Representação gráfica do experimento de imuno-histoquímica, utilizando o anticorpo para TRPM7, na concentração de 1:500. Foi comparado o grupo controle com o grupo de animais com DP. Foram analisadas duas estruturas, substância negra (SN) e o estriado (CPu). As imagens foram capturadas na objetiva de 10 X. N=5 e  $*p < 0,05$ .

#### 6.4.2 CARVACROL

Os animais foram pré-tratados com carvacrol na concentração de 40 mg/kg; a injeção foi realizada intraperitonealmente, e após 30 minutos da injeção os animais foram operados utilizando 6-OHDA; no lado contralateral foi utilizado veículo, no caso salina.



Após o período da lesão, os animais foram sacrificados e inicialmente foi realizado o teste de *Western Blotting*. Para avaliar a lesão foi utilizado o anticorpo para tirosina hidroxilase. Com o intuito de criar um controle dos animais que receberam carvacrol, foi utilizado salina em alguns animais para formarem o grupo controle dos animais tratados com carvacrol, sendo que foram utilizados os mesmos parâmetros de tempo e técnica para os animais tratados com carvacrol.

De acordo com os dados encontrados (Figura 31), foi observado que os animais que foram pré-tratados com carvacrol não apresentaram uma diminuição de tirosina hidroxilase no CPu. As médias e o erro padrão estão apresentados no apêndice 3.

Os mesmos parâmetros foram utilizados para avaliar a SN dos animais; novamente os grupos foram comparados entre controle com salina com os animais tratados com carvacrol. Foi observado que não houve alteração entre os grupos. Esses dados mostram uma proteção dos animais quando injetado carvacrol anteriormente a cirurgia, para o modelo da DP. Estes resultados podem ser observados na figura 31. As médias e o erro padrão estão apresentados no apêndice 3.

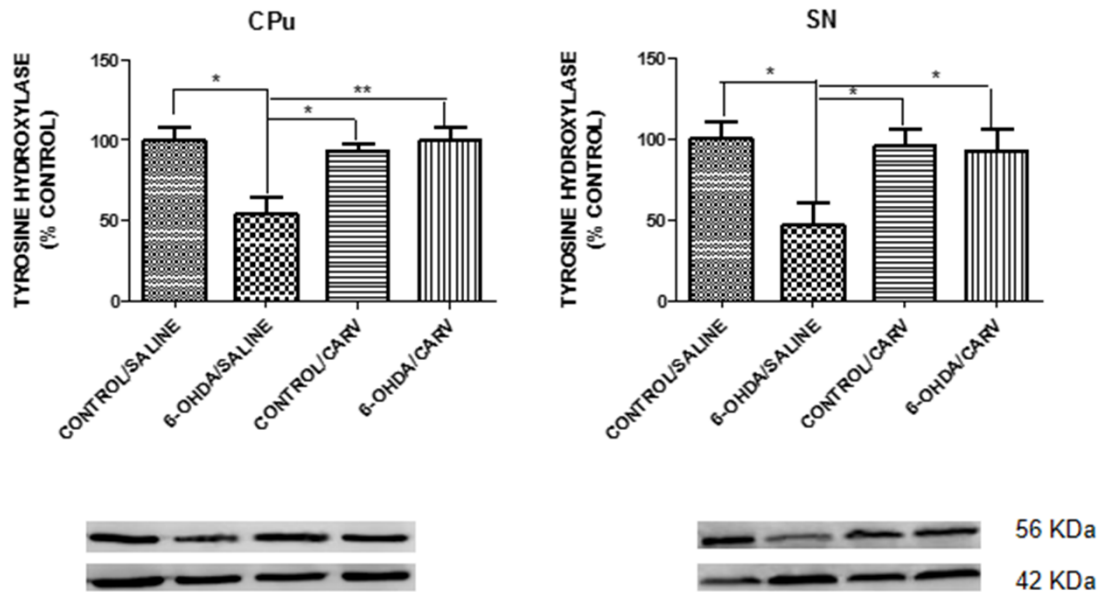


Figura 31 - Representação gráfica da expressão da tirosina hidroxilase na técnica de Western Blotting, na concentração 1:1000, em animais pré-tratados com carvacrol. Peso molecular 56KDa, analisando o estriado (CPu) e substância negra (SN). N= 5.

A partir destes resultados, foi realizada a técnica de imuno-histoquímica. Os animais foram tratados como descrito anteriormente, e foi avaliado o anticorpo tirosina hidroxilase. A análise dos resultados foi feita utilizando como controle os animais injetados com salina, mas do mesmo grupo. As médias e o erro padrão estão apresentados no apêndice 3.

Os resultados mostram que os animais que receberam salina intraperitonealmente, apresentaram uma diminuição da tirosina hidroxilase de aproximadamente 40 % ( $p < 0,05$ ) do grupo tratado com 6-OHDA em relação ao controle. Já quando os animais foram pré-tratados com carvacrol intraperitonealmente, não houve essa diferença, como mostrado na Figura 32.

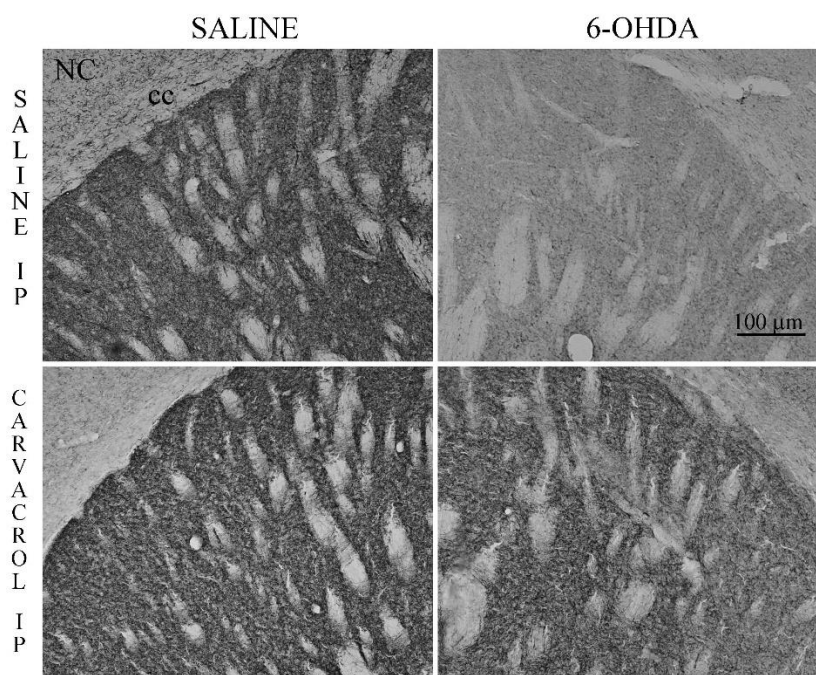
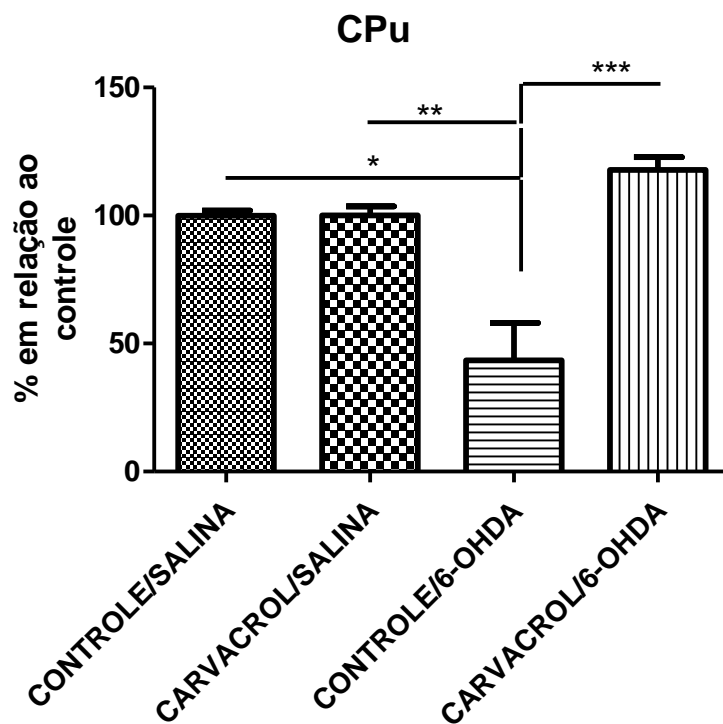


Figura 32 - Representação gráfica do experimento de imuno-histoquímica, dos animais pré-tratados com carvacrol, utilizando o anticorpo para tirosina hidroxilase, na concentração de 1:1000. Foi comparado o grupo controle com o grupo de animais com modelo para DP. Foi analisado o estriado (CPu); sendo (A) animal controle, lado salina; (B) animal carvacrol, lado salina; (C) animal controle, lado 6-OHDA; (D) animal carvacrol, lado 6-OHDA. As imagens foram capturadas na objetiva de 10 X. N=5 e \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

O mesmo experimento foi realizado para avaliar a SN destes animais. Foi observado que nos animais injetados com salina, e que na cirurgia para indução do modelo da DP foi injetado 6-OHDA, teve expressão de tirosina hidroxilase menor, de aproximadamente 70 % ( $p < 0,001$ ). Quando avaliados os animais injetados com carvacrol, o animal controle em que foi injetado salina não foi diferente dos animais que foram injetados com 6-OHDA. As médias e o erro padrão estão apresentados no apêndice 3. Um resultado em que ficou muito evidente a ação protetora do carvacrol quando foram comparados os animais que foram submetidos ao modelo da DP, como mostrado na figura 33.

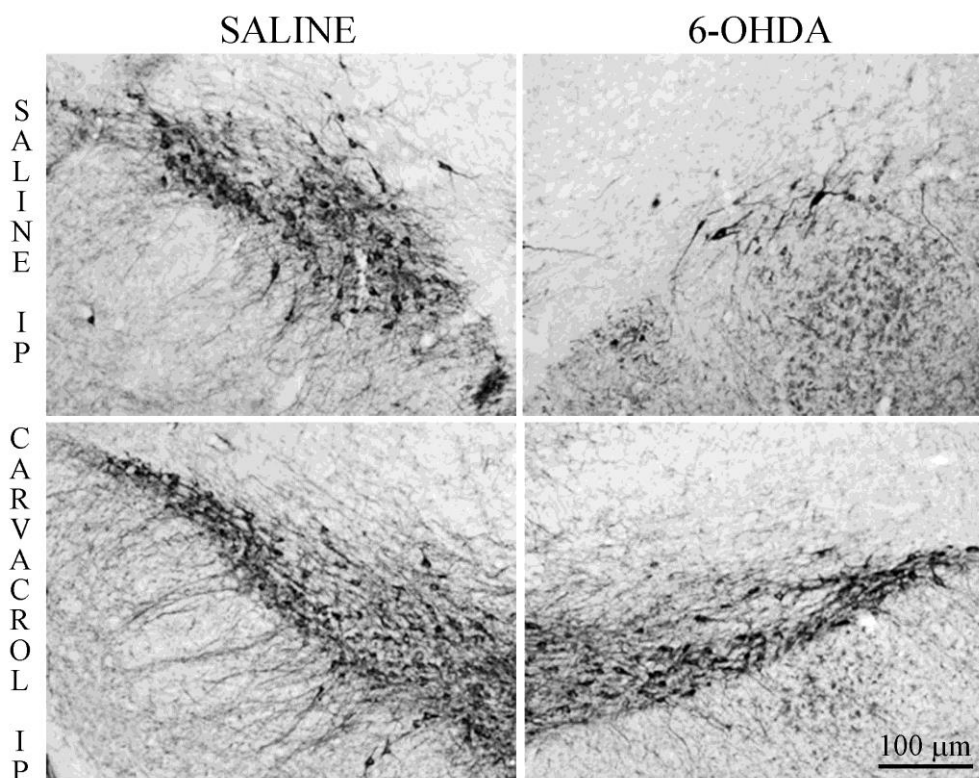
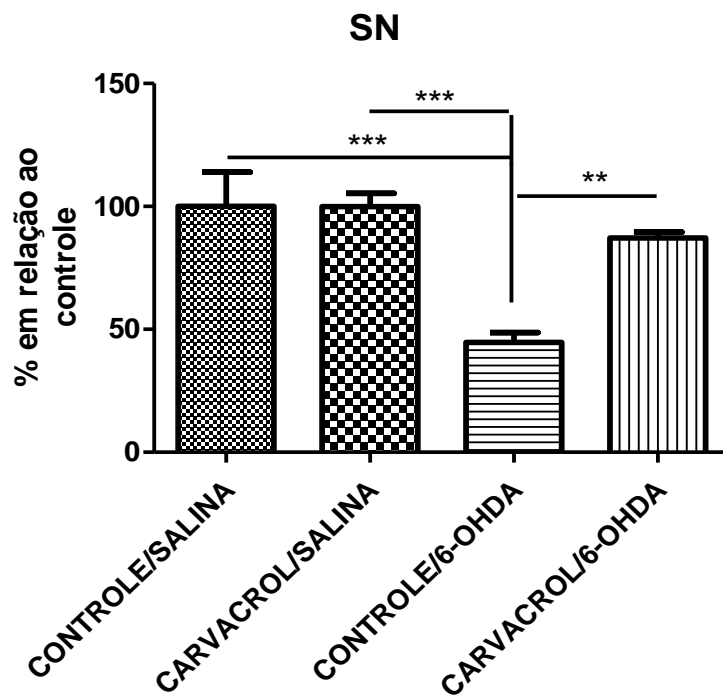


Figura 33 - Representação gráfica do experimento de imuno-histoquímica, dos animais pré-tratados com carvacrol, utilizando o anticorpo para tirosina hidroxilase, na concentração de 1:1000. Foi comparado o grupo controle com o grupo de animais com modelo para DP, sendo (A) animal controle, lado salina; (B) animal carvacrol, lado salina; (C) animal controle, lado 6-OHDA; (D) animal carvacrol, lado 6-OHDA.. Foi analisado a substância negra (SN). As imagens foram capturadas na objetiva de 10 X. N=5 e \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

### 6.4.3 CASPASE 3

Para avaliar a possível via de sinalização de morte celular, foi avaliada a caspase 3, uma proteína envolvida no processo de morte celular por apoptose. Para isso foi utilizado o método de *Western Blotting*. Foi observado que no CPu o grupo tratado com carvacrol e injetado salina, houve um aumento de aproximadamente 40 % ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo que foi injetado com salina tanto intraperitoneal quanto intracraniano. O mesmo foi observado quando comparado com o grupo que recebeu carvacrol e salina. Já em relação ao grupo que recebeu carvacrol e 6-OHDA o aumento de caspase 3 do grupo salina e 6-OHDA foi de aproximadamente 90 % ( $p < 0,001$ ) (Figura 34). As médias e o erro padrão estão apresentados no apêndice 3.

Quando avaliada a SN, foi observado que o grupo salina e 6-OHDA teve um aumento de caspase 3 de aproximadamente 60 % ( $p < 0,01$ ) em relação aos demais grupos, sendo eles salina intraperitoneal e intracraniana, carvacrol e salina e carvacrol e 6-OHDA, como está mostrado na Figura 34, abaixo. As médias e o erro padrão estão apresentados no apêndice 3.

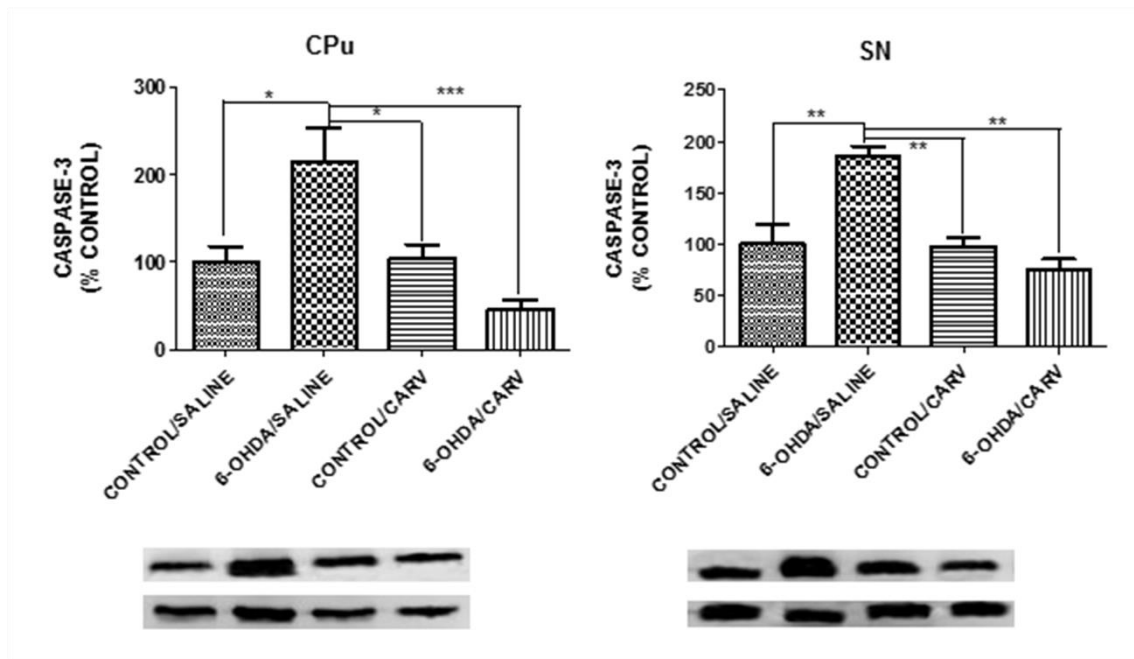


Figura 34 - Caspase-3 imunoblotting no caudate-putamen (CPu) e substância negra (SN) após a solução salina e carvacrol ip injeções. Os gráficos representam a razão da média dos níveis de caspase-3 /  $\beta$ -actina nas condições de controle e após 6-OHDA e tratamento ip com carvacrol ou solução salina (em% do controle). As imunotransferências típicas são também mostradas. Carv, carvacrol; \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ;  $N = 6$ .

#### 6.4.4 Teste do cilindro

Confirmando os resultados das outras técnicas, os resultados do ensaio em cilindro mostraram que os animais injetados com 6-OHDA e tratados com solução salina i.p., utilizou mais o antebraço direito aos 7 e 14 dias ( $p < 0,0001$ ) após a injeção de toxina. Por outro lado, os animais injetados com 6-OHDA e tratados com carvacrol i.p. exibiu uma diminuição da assimetria no uso da perna. Estes animais comportaram-se de um modo semelhante ao da linha de base, pelo menos após 14 dias da injeção de 6-OHDA. Mesmo aos 7 dias após a injeção de toxina, no entanto, houve uma diferença estatisticamente significativa entre os animais tratados com carvacrol e solução salina, como mostra na figura 35. As médias e o erro padrão estão apresentados no apêndice 3.

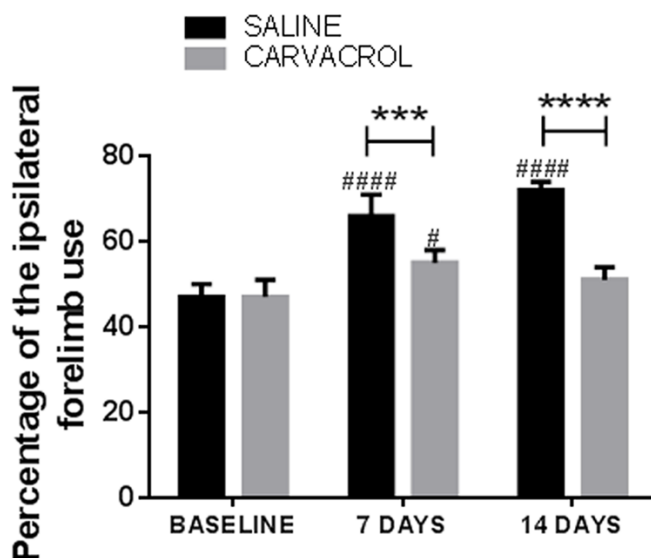


Figura 35 - Resultados do teste do cilindro. As análises foram realizadas três vezes, antes da injeção de 6-OHDA, 7 e 14 dias após a injeção. Os gráficos representam a porcentagem média de utilização da perna anterior ipsilateral (direita) em relação ao número total de contatos com a parede; \*\*\* p < 0,001, \*\*\*\* p < 0,0001 para comparação de grupo. As comparações com a linha de base são indicadas por # p < 0,05; #### p < 0,0001; N = 5.

#### 6.4.5 Discussão

Os resultados anatômicos, bioquímicos e comportamentais desse estudo sugerem que o canal TRPM7 está envolvido na patogênese da neurodegeneração produzida por 6-OHDA. Após 15 dias dessa lesão, existe originalmente um aumento da geração de espécies reativas de oxigênio induzida pelo modelo de 6-OHDA (SCHOBER, 2004; HERNANDES et al., 2013) e essas espécies reativas são conhecidas por regular a expressão e atividade do canal TRPM7 (FLEIG; PENNER, 2004; DADON; MINKE, 2010; MILLER; ZHANG, 2011).

Estes resultados sugerem aumento dessa proteína nos neurônios após a indução da DP com o modelo da injeção de 6-OHDA. De acordo com o trabalho de Aarts e colaboradores (2003), que mostra o envolvimento deste canal no



metabolismo celular, em alteração dos íons cálcio e magnésio, quando o receptor TRPM7 está ativo. Nesse sentido, com as alterações de cálcio, pode-se haver a morte celular.

No mesmo sentido, o trabalho de Hanano et al., (2004) mostrou que o aumento da atividade do TRPM7 prejudica a adesão celular, que pode ocasionar o desbalanço celular e conseqüentemente a morte da célula. Isso sugere que o canal TRPM7 pode ser um possível fator que influencia na morte celular na DP.

O TRPM7 pode ativar vias de sinalização pro-apoptótica e participar na neurodegeneração de neurônios e terminais dopaminérgicos; também é possível que o fluxo de cálcio relacionado ao canal TRPM7 aumente a degeneração nessas condições (TAKADA et al, 2013; SUN et al., 2015). Vale ressaltar que uma redução do mRNA de TRPM7 foi relatada em pacientes parkinsonianos (COOK et al., 2009), o que de alguma forma contradiz os resultados atuais. Esta diferença pode ser devida aos diferentes métodos utilizados para detectar TRPM7, ao fato de que o modelo de doença de Parkinson utilizando 6-OHDA é apenas uma aproximação à condição humana ou ao fato de que apenas examinamos a proteína TRPM7 em um ponto de tempo da neurodegeneração.

Os dados do presente estudo, por outro lado, estão de acordo com os resultados de modelos de lesões cerebrais hipóxico-isquêmicas, que também sugerem uma participação de TRPM7 no processo e efeitos neuroprotetores do carvacrol (CHEN et al., 2015). Além disso, esses dados concordam com vários trabalhos encontrados na literatura, indicando uma possível participação de canais de TRPM7 em processos neurodegenerativos (VERMA et al., 2012; TAKADA et al., 2013; SUN et al., 2015,). As ações de TRPM7 na autofagia (OH et al., 2015, SUKUMARAN et al., 2016) também apoiam o envolvimento desse

canal na neurodegeneração, por meio de um processo que poderia ser mediado pela sua regulação do influxo de cálcio (SUKUMARAN et al., 2016). Os dados sobre autofagia também estão de acordo com os dados presentes.

Os resultados encontrados nesse trabalho quando foi utilizado o carvacrol mostraram que esse composto exerceu uma ação neuroprotetora quando injetado intraperitonealmente antes da injeção da toxina indutora do modelo de DP. Esse efeito é provavelmente devido à ação inibidora do carvacrol, que foi demonstrada anteriormente (CHEN et al., 2015). Esses dados também sugerem que os canais TRPM7 podem representar um alvo terapêutico importante para a DP. Uma vantagem importante do uso potencial do carvacrol como neuroprotetor está relacionado a sua natureza lipofílica, sugerindo facilidade de atravessar membranas e a camada hematoencefálica.

É interessante comentar que o carvacrol também mostrou um efeito protetor em modelo de hipóxia-isquemia, o que sugere que o efeito de bloquear a neurodegeneração pode ser um efeito genérico do produto bloqueador do TRPM7 (CHEN et al., 2015). Além disso, esse produto também mostrou efeitos neuroprotetores quando administrados em regime de pós-tratamento (ZHANG et al., 2012).

Em termos de mecanismos de ação, deve-se comentar a ação do carvacrol na regulação positiva do sistema Bcl-2/Bax e de p-Akt, com redução da ativação de caspase 3 (CHEN et al., 2015), o que representa uma possibilidade importante para o mecanismo de ação do produto como neuroprotetor.

No presente estudo, demonstrou-se uma marcada atenuação da expressão positiva da caspase-3 pelo carvacrol, o que indicou que as ações desta substância podem envolver as mesmas vias pró-apoptóticas de sinalização no modelo 6-OHDA da doença de Parkinson. No entanto, não podemos excluir uma possível ação antioxidante e anti-inflamatória do carvacrol (YU et al., 2012) causando os efeitos aqui mostrados. Do mesmo modo, não existem dados disponíveis sobre um possível mecanismo de ligação da atividade de TRPM7 e da sua inibição pelo carvacrol às vias intracelulares por meio da sua quinase associada (SUN et al., 2015). Estudos futuros são necessários para avaliar esses aspectos e os possíveis efeitos do pós-tratamento com carvacrol no modelo de doença de Parkinson 6-OHDA.

## 7 CONCLUSÃO GERAL

Esse estudo mostrou que alguns receptores parecem estar envolvidos no desenvolvimento da doença de Parkinson, quando induzida pelo modelo da 6-OHDA. Apesar da literatura descrever o receptor B2 de bradicinina como neuroprotetor, neste trabalho esse efeito não foi observado quando utilizado o modelo de 6-OHDA. Além disso, não se deve excluir a possibilidade do envolvimento do receptor B1 no desenvolvimento da DP, uma vez que esse receptor é estimulado quando existe um processo inflamatório.

Em relação aos receptores purinérgicos, foi observado que os receptores P2X2, P2X4, P2X7 e P2Y4, que tem como função a sinalização intracelular quando há alteração de ions, este trabalho sugere que esses receptores tem expressão aumentada quando ocorreu a lesão por 6-OHDA no encéfalo dos animais, sugerindo que os receptores purinérgicos também são receptores que estão envolvidos no modelo de DP.

Já quando avaliado o potencial do canal de TRPM7, foi observada uma alteração positiva desse receptor no modelo, podendo sugerir o envolvimento desse receptor no desenvolvimento da DP, sendo que quando utilizado o antagonista específico desse receptor os animais apresentaram os mesmos padrões de animais controle. Assim, a inibição do TRPM7 produziu marcante neuroproteção no modelo da 6-OHDA.

Levando em consideração os efeitos encontrados ao avaliar os receptores de bradicinina, purinérgicos e TRPM7 que estes receptores estão envolvidos no desenvolvimento da DP quando utilizado o modelo com 6-OHDA, com isso pode-se sugerir um potencial terapêutico para a DP uma vez que foi encontrado certas

alterações na evolução da DP quando utilizado antagonista do receptor, como o caso do TRPM7. Em relação aos demais receptores precisa aumentar os estudos, uma vez que foi observado alteração da DP quando avaliado no modelo em estudo.

## REFERÊNCIAS\*

- AARTS M, IIHARA K, WEI WL, XIONG ZG, ARUNDINE M, CERWINSKI W, et al. (2003) **A key role for TRPM7 channels in anoxic neuronal death.** *Cell*; 115: 863-877.
- ABBRACCHIO MP, BURNSTOCK G (1998) **Purinergic signaling: pathophysiological roles.** *Jpn J pharmacol* 78:113–145.
- APELOUS J, BARDIER E. (1909). **Les substances hypotensives de l'urine humaine normale.** *CR Soc Biol.* 66: 511–512.
- ALEXI T, BORLONGAN CV, FAULL RL, WILLIAMS CE, CLARK RG, GLUCKMAN PD, HUGHES PE, (2000). **Neuroprotective strategies for basal ganglia degeneration: Parkinson's and Huntington's diseases.** *P. Neurobiology.* 60: 409-470.
- ALVAREZ-FISCHER D, HENZE C, STRENZKE C, WESTRICH J, FERGER B, HOGLINGER GU, OERTEL WH, HARTMANN A (2008). **Characterization of the striatal 6-OHDA model of Parkinson's disease in wild type and alpha-synuclein-deleted mice.** *Exp. Neurology.* 210: 182-193.
- APPELL KC; BAREFOOT DS (1989) **Neurotransmitter release from bradykinin-stimulated PC12 cells Stimulation of cytosolic calcium and neurotransmitter release.** *Biochem. J.* 263: 11-18.
- AUSTINAT M, BRAEUNINGER S, PESQUERO JB, BREDE M, BADER M, STOLL G, RENNÉ T, KLEINSCHNITZ C. (2009) **Blockade of bradykinin receptor B1 but not bradykinin receptor B2 provides protection from cerebral infarction and brain edema.** *Stroke*, 40 (1):285-293.
- BALZER M, LINTSCHINGER B, GROSCHNER K (1999) **Evidence for a role of Trp proteins in the oxidative stress-induced membrane conductances of porcine aortic endothelial cells.** *Cardiovasc Res*; 42: 543-549.
- BATASSINI C, BROETTO N, TORTORELLI LS, BORSOI M, ZANOTTO C, GALLAND F, SOUZA TM, LEITE MC, GONÇALVES CA. (2015). **Striatal Injury with 6-OHDA Transiently Increases Cerebrospinal GFAP and S100B.** *Hindawi Pub. Corp. Neural Plasticity.* ID 387028, 9 pages.
- BASCANDS JL, PECHER C, ROUAUD S, EMOND C, TACK JL, BASTIE MJ, BURCH R, REGOLI D, GIROLAMI JP. (1993) **Evidence for existence of two distinct bradykinin receptors on rat mesangial cells.** *Am J Physiol.* 264: 548-556.
- BEN-SHMUEL S, DANON A, FLEISHER-BERKOVICH S. (2013). **Bradykinin decreases nitric oxide release from microglia via inhibition of cyclic adenosine monophosphate signaling.** *Peptides.* 40:133-140.
- BEZPROZVANNY I. (2009) **Calcium signaling and neurodegenerative diseases.** *Trends Mol Med*; 15: 89-100.
- BHOOLA KD, FIGUEROA CD; WORTHY K. (1992) **Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases.** *Pharmac. Rev.* 44:1-80.
- BHOOLA KD, ELSON CJ, DIEPPE PA. (1992). **Kinins-key mediators in inflammatory arthritis?** *Br J Rheumatol.* 31: 509-518.
- BIANCO F, FUMAGALLI M, PRAVETTONI E, D'AMBROSI N, VOLONTE C, MATTEOLI M, ABBRACCHIO MP, VERDERIO C. (2005). **Pathophysiological roles of extracellular**

\*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR6023:** informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

**nucleotides in glial cells: differential expression of purinergic receptors in resting and activated microglia.** Brain Res. Rev.144-156.

BJÖRKGREN I, LISHKO PV. (2016) **Purinergic signaling in testes revealed.** JGP. 148: 207-211.

BLANDINI F, NAPPI G, TASSORELLI C, MARTIGNONI E. (2000). **Functional changes of the basal ganglia circuitry in Parkinson's disease.** P. Neurobiology. 62: 63-88.

BLUM DTS, LAMBENG N, NISSOU M, BENABID AL, SADOUL R, VERNA JM. (2001). **Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease.** P. Neurobiology. 65: 135-172.

BOARDER MR; HOURANI SMO. (1998). **The regulation of vascular function by P2 receptors: multiple sites and multiple receptors.** Trends Pharmacol. Sci. 19: 99–107.

BOVENZI V, SAVARD M, MORIN J, CUERRIER CM, GRANDBOIS M, GOBEIL FJR (2010) **Bradykinin protects against brain microvascular endothelial cell death induced by pathophysiological stimuli.** J Cell Physiol 222:168-176.

BREESE GR; TRAYLOR TD. (1971). **Depletion of brain noradrenaline and dopamine by 6-hydroxydopamine.** British journal of pharmacology. 42: 88-99.

BURNSTOCK G. (1986). **The changing face of autonomic neurotransmission.** Acta Physiol Scand. 126, 67-91.

BURNSTOCK G, CAMPBELL G, SACHELL D, SMYTHE A. (1970). **Evidence that adenosine triphosphate or related nucleotide is the transmitter substance release by non-adrenergic inhibitory nerves in the gut.** Br J Pharmacol. 40: 668-688.

BURNSTOCK G; KNIGHT GE. (2004). **Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems.** Int. Rev. Cytol. 240: 301–304.

BURNSTOCK G. (2006). **Historical review: ATP as a neurotransmitter.** Trends Pharmacol. Sci. 27: 166–176.

BURNSTOCK, G. (2007) **Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission.** Physiol. Rev. 87: 659–797.

CAETANO AL, DONG-CRESTE KE, AMARAL FA, MMONTEIRO-SILVA KC, PESQUEIRO JB, ARAUJO MS, MONTOR WR, VIEL TA, BUCK HS (2015). **Kinin B2 receptor can play a neuroprotective role in Alzheimer's disease.** Neuropeptides. 53: 51-62.

CHEN J, XU K, PETZER J, STAAL R, XU Y, BEILSTEIN M, SONSALLA P, CASTAGNOLI K, CASTAGNOLI N, SCHWARZSCHILD M (2001) **Neuroprotection by caffeine and A2A adenosine receptor inactivation in a model of Parkinson's disease.** J Neuroscience 21:1–6.

CHEN W, XU B, XIAO A, LIU L, FANG X, LIU R, TURLOVA E, BARSZCZYK A, ZHONG X, SUN CLF, BRITTO LRG, FENG Z-P, SUN H-S. (2015). **TRPM7 inhibitor carvacrol protects brain from neonatal hypoxic-ischemic injury.** Mol. Brain. 8:11, 1-13.

CHEN WL, BARSZCZYK A, TURVOVA E, DEURLOO M, LIU B, YANG BB, RUTKA JT, FENG ZP, SUN HS (2015b). **Inhibition of TRPM7 by carvacrol suppresses glioblastoma cell proliferation, migration and invasion.** Oncotarget 6:16321-16340.

CLAPHAM DE. (2003). **TRP channels as cellular sensors.** Nature 426: 517-524.

- CODDOU C, YAN Z, OBSIL T, HUIDOBRO-TORO JP, STOJILKOVIC SS. (2011). **Activation and regulation of purinergic P2X receptor channels.** *Pharmacol Rev.* 1;63:641–683.
- COMPAN V, ULMANN L, STELMASHENKO O, CHEMIN J, CHAUMONT S, RASSENDREN F. (2012). **P2X2 and P2X5 subunits define a new heteromeric receptor with P2X7-like properties.** *J Neurosci* 32: 4284–4296.
- COOK NL, HEUVEL CVD, VINK R (2009), **Characterisation of TRPM channel mRNA levels in Parkinson disease.** In: The 12th Int .Magnesium Symp. *Magnesium Res.* 22:188-189.
- COTRINA ML, LIN JH, LOPEZ-GARCIA JC et al (2000) **ATP-mediated glia signaling.** *J Neurosci* 20:2835–2844.
- COULL J. (2005). **BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain.** *Nature.* 1017-1021.
- DADON D, MINKE B (2010), **Cellular functions of transient receptor potential channels.** *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 42: 1430-1445.
- DECKER AR, McNEILL MS, LAMBERT AM, OVERTON JD, CHEN YC, LORCA RA, JOHNSON NA, BROCKERHOFF SE, MOHAPATRA DP, MACARTHUR H, PANULA P, MASINO MA, RUNNELS LW, CORNELL RA (2014), **Abnormal differentiation of dopaminergic neurons in zebrafish trpm7 mutant larvae impairs development of the motor pattern.** *Dev. Biol.* 386: 428-439.
- DELMAS P, WANAVERBECQ N, ABOGADIE FC, MISTRY M, BROWN DA (2002). **Signaling microdomains define the specificity of receptor-mediated InsP3 pathways in neurons.** *Neuron* 14: 209-220.
- DEUMENS R, BLOKLAND A, PRICKAERTS J. (2002). **Modeling Parkinson's disease in rats: an evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway.** *Exp. Neurology.* 175, 303-317.
- DEMEUSE P, PENNER R, FLEIG A (2006), **TRPM7 channel is regulated by magnesium nucleotides via its kinase domain.** *J. Gen. Physiol.* 127: 421-434.
- DESAI BN, KRAPIVINSKY G, NAVARRO B, KRAPIVINSKY L, CARTER BC, FEBVAY S, DELLING M, SEVESTRE H, RAMSEY IS, MANASIAN Y, CLAPHAM DE. (2012). **Cleavage of TRPM7 releases the kinase domain from the ion channel and regulates its participation in Fas-induced apoptosis.** *Dev. Cell* 22, 6: 1149-1162.
- DRURY AN, SZENT-GYORGYI A. (1929). **The physiological activity of adenine compounds with special reference to their action upon the mammalian heart.** *J Physiol.* 68:213-237.
- FERRARI D, PIZZIRANI C, ADINOLFI E, FORCHAP S, SITTA B, TURCHET L, et al. (2004). **The antibiotic polymyxin B modulates P2X7 receptor function.** *J Immunol* 173:4652–4660.
- FERRARI D, PIZZIRANI C, ADINOLFI E, LEMOLI RM, CURTI A, IDZKO M, et al. (2006). **The P2X7 receptor: a key player in IL-1 processing and release.** *J Immunol* 176:3877–3883.
- FERRER I. (2009). **Early involvement of the cerebral cortex in Parkinson's disease: convergence of multiple metabolic defects.** *P.Neurobiology* 88: 89-103.
- FERREIRA APO, RODRIGUES FS, DELLA-PACE ID, MOTA BC, OLIVEIRA SM, GEWEHR CCV, BOBONSKI F, OLIVEIRA CV, BRUM JS, OLIVEIRA MS, FURIAN AF, BARROS CSL, SANTOS ARS, FERREIRA J, FIGHERA MR, ROYES LFF. (2013). **HOE-140, an antagonist of**



**B2 receptor, protects against memory deficits and brain damage induced by moderate lateral fluid percussion injury in mice.** *Psychopharmacology*. 1-14.

FIELDS RD, BURNSTOCK G (2006) **Purinergic signalling in neuroglia interactions.** *Nat Rev Neurosci* 7:423–436.

FLEIG A, CHUBANOV V (2014). **TRPM7.** *Handb. Exp. Pharmacol.* 222: 521-546.

FLEIG A, PENNER R (2004), **The TRPM ion channel subfamily: molecular, biophysical and functional features.** *Trends. Pharmacol. Sci.* 25: 633-639.

FONFRIA E, MURDOCK PR, CUSDION FS, BENHAM CD, KELSELL RE, McNULTY S. (2006). **Tissue distribution profiles of the human TRPM cation channel family.** *J Receptors and Signal Transduction*, 26:159-178.

FRANKE H, ILLES P. (2006). **Involvement of P2 receptors in the growth and survival of neurons in the CNS.** *Pharmacol Ther.* 109, 297- 324.

GESSI S, MERIGHI S, SACCHETTO V, SIMIONI C, BOREA PA. (2011). **Adenosine receptors and cancer.** *Biochim Biophys Acta.* 1808:1400- 1412.

GIBB WR; LEES AJ. (1988). **The relevance of the Lewy body to the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease.** *J. neurology, neurosurgery, and psychiatry* 51: 745-752.

GLAJCHA EK, FLEMING SM, SURMEIER J, OSTENA P. (2012). **Sensorimotor assessment of the unilateral 6-hydroxydopamine mouse model of Parkinson's disease.** *Behavioural Brain Res.* 230: 309–316.

GROSCHNER K, ROSKER C, LUKAS M. (2004). **Role of TRP channels in oxidative stress.** *Nov. Found Symp.* 258: 222-230.

HERNANDES MS, SANTOS GD, CAFÉ-MENDES CC, LIMA LS, SCAVONE C, MUNHOZ CD, BRITTO LR. (2013). **Microglial cells are involved in the susceptibility of NADPHoxidase knockout mice to 6-hydroxy-dopamine-induced neurodegeneration.** *PLoS One* 8: e75532.

HERNANDES MS, CAFÉ-MENDES CC, BRITTO LRG. (2014). **NAPH oxidase and the degeneration of dopaminergic neurons in Parkinson mice.** *Oxid. Med. and Cell. Longev.* 1-13.

HOLTON P. (1959). **The liberation of adenosine triphosphate on antidromic stimulation of sensory nerves.** *J Physiol.* 145, 494-504.

JEON BS, JACKSON-LEWIS V, BURKE RE. (1995). **6-Hydroxydopamine lesion of the rat substantia nigra: time course and morphology of cell death.** *Neurodegeneration: J. neurodegen. Disor., neuroprotection, and neuroregeneration.* 4, 131-137.

JEONG SY, SHIN SY, KIM HS, BAE CD, UHM DY, PARK MK, CHUNG S. (2006). **Regulation of magnesium-inhibited cation current by action cytoskeleton rearrangement.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 339 (3), 810-815.

KARIYA K, YAMAUCHI A, SASAKI T. (1985) **Regional distribution and characterization of kinin in the CNS of the rat.** *J. Neurochem.* 44, 1892-1897.

KARIYA K, YAMAUCHI A, HATTORI S, TSUDA Y, OKADA Y. (1982b) **The disappearance rate of intraventricular bradykinin in the brain of the conscious rat.** *Biophys. Res. Commun.* 107, 1461-1466.

KHAKH BS, GITTERMANN D, COCKAYNE DA, JONES A. (2003). **A ATP modulation os excitatory synapses onto interneurons.** J Neurosci. 7425-7437.

KHOJA S, SHAH V, GARCIA D, ASATRYAN L, JAKOWEC MW, DAVIES DL (2016). **Role of purinergic P2X4 receptors in regulating striatal dopamine homeostasis and dependent behaviors.** J. Neurochemistry. 139: 134-148.

KÜGELGEN I & HARDEN TK. (2011). **Molecular pharmacology, physiology, and structure of the P2Y receptors.** Adv Pharmacol 61: 373–415.

LANGESLAG M, CLARK K, MOOLENAAR WH, VAN, LEEUWEN FN, JALINK K. (2007). **Activation of TRPM7 channels by phospholipase C-coupled receptor agonists.** J Biol. Chrm, 282 (1), 232-239.

LAMOTTE G, MORELLO R, LEBASNIER A, AGOSTINI D, BOUVARD G, SAYETTE VDL, DEFER GL. (2016). **Influence of educaton on cognitive performance and dopamine transporter binding in dementia with Lewy bodies.** Clinic. Neurol Neurosurgery; 146: 138-143.

LEONELLI M, BRITTO LR, CHAVES GP, TORRAO AS. (2005). **Developmental expression of cannabinoid receptors in the chick retinotectal system.** Brain Res Dev Brain Res; 156: 176-182.

LEONELLI M, MARTINS DO, KIHARA AH, BRITTO LR. (2009). **Ontogenetic expression of the vanilloid receptors TRPV1 and TRPV2 in the rat retina.** Int J Dev Neurosci; 27: 709-718.

LEONELLI M, MARTINS DO, BRITTO LR. (2010). **TRPV1 receptors are involved in protein nitration and Muller cell reaction in the acutely axotomized rat retina.** Exp Eye Res; 91: 755-768.

LEONELLI M, MARTINS DO, BRITTO LR. (2011). **TRPV1 receptors modulate retinal development.** Int J Dev Neurosci; 29: 405-413.

LI W-T, ZHANG S-Y, ZHOU Y-F, ZHANG B-F, LIANG Z-Q, LIU Y-H, WEI Y, LI C-K, MENG X-J, XIA M, DAN Y, SONG J-N. (2015). **Carvacrol Attenuates traumaic neuronal injury through store-operated Ca<sup>2+</sup> entry-independent regulation of intracelular Ca<sup>2+</sup> homeostasis.** Neurochemistry International. Not yet published.

LUMENTA DB, PLESNILA N, KLÄSNER B, BAETHMANN A, PRUNEAU D, SCHMID-ELSAESSER R, ZAUSINGER S. (2006) **Neuroprotective effects of a postischemic treatment with a bradykinin B2 receptor antagonist in a rat model of temporary focal cerebral ischemia.** Brain Res; 1069(1):227-234.

MATHIS SA, CRISCIMAGNA NL, LEEB-LUNDBERG LMF. (1996). **B1 and B2 kinin receptors mediate distinct patterns of intracelular Ca<sup>2+</sup> signaling in single cultured vascular smooth muscle cells.** Mol. Pharmacol. 50: 128-139.

MARTINS AH, ALVES JM, TRUJILLO CA, SCHWINDT TT, BAMABÉ GF, MOTTA FL, GUIMARAES AO, CASARINI DE, MELLO LE, PESQUERO JB, ULRICH H. (2008) **Kinin-B2 receptor expression and activity during differentiation of embryonic rat neurospheres.** Cytometry A. 73:361- 368.

MARTINS AH, ALVES JM, PEREZ D, CARRASCO M, TORRES-RIVERA W, ETEROVIC VA, FERCHMIN PA, ULRICH H. (2012) **Kinin-B2 receptor mediated neuroprotection after NMDA excitotoxicity is reversed in the presence of kinin-B1 receptor agonists.** Plos One. (7): 1-6.

- MEREDITH GE, SONSALLA PK, CHESSELET MF. (2008). **Animal models of Parkinson's disease progression.** Acta neuropathologica. 115, 385-398.
- MILLER BA, ZHANG W. (2011). **TRP channels as mediators of oxidative stress.** Adv. Exp. Med. Biol. 704: 531-544.
- MINKE B. (2006). **TRP channels and Ca<sup>2+</sup> signaling.** Cell Calcium; 40: 261-275.
- MONTELL C, BIMBAUMER L, FLOCKERZI V, BINDELS RJ, BRUFORD EA, CATERINA MJ, et al. (2002). **A unified nomenclature for the superfamily of TRP cation channels.** Mol Cell; 9: 229-231.
- MONTELLI C. (2005). **The TRP Superfamily of Cation Channels.** Sci. STKE 2005 (272), re3. Cell Signaling Technology.
- MOREAU ME, GARBACKI N, MOLINARO G, et al. (2005). **The kallikrein-kinin system: current and future pharmacological targets.** J Pharmacol Sci. 99: 36-38.
- NEARY JT, RATHBONE MP, CATTABENI F, et al. (1996). **Trophic actions of extracellular nucleotides and nucleosides on glial and neuronal cells.** Trends Neurosci. 19, 13-18.
- NICOLETTI NF, SÉNÉCAL J, SILVA VD, ROXO MR, FERREIRA NP, MORAIS RLT, PESQUERO JB, CAMPOS MM, COUTURE R, MORRONE FB (2016). **Primary Role for Kinin B1 and B2 Receptors in Glioma Proliferation.** Mol Neurobiol. DOI 10.1007/s12035-016-0265-9.
- NORTH RA. (2002). **Molecular physiology of P2X receptors.** Physiol Rev.; 82: 1013–1067.
- NORTH, R.A. and VERKHRATSKY, A. (2006) **Purinergic transmission in the central nervous system.** Pflugers Arch. 452, 479–485.
- NUNEZ-VILLENA F, BECERRA A, ECHEVERRIA C, BRICENO N, PORRAS O, ARMISEN R, VARELA D, MONTORFANO I, SARMIENTO D, SIMON F. (2011). **Increased expression of the transient receptor potential melastatin 7 channel is critically involved in lipopolysaccharide-induced reactive oxygen species-mediated neuronal death.** Antioxid. Redox Signal. 15 (9), 2425-2438.
- OBESO JA, RODRIGUEZ-OROZ MC, RODRIGUEZ M, LANCIEGO JL, ARTIEDA J, GONZALO N, OLANOW CW. (2000). **Pathophysiology of the basal ganglia in Parkinson's disease.** Trends in neurosciences 23: S8-19.
- OBESO JA, RODRIGUEZ-OROZ MC, LANCIEGO JL, RODRIGUEZ DM. (2004). **How does Parkinson's disease begin? The role of compensatory mechanisms.** Trends in neurosciences 27; 125-127; author reply 127-128.
- OH HG, CHUM YS, PARK CS, KIM TW, PARK MK, CHUNG S. (2015). **Regulation of basal autophagy by transient receptor potential melastatin 7 (TRPM7) channel.** Biochem. Biophys. Res. Commun. 463: 7-12.
- OOSTEN RV; COOLS AR. (2002). **Differential effects of a small, unilateral, 6-hydroxydopamine-induced nigral lesion on behavior in high and low responders to novelty.** Exp. Neurology 173; 245-255.
- PAXINOS G; FRANKLIN KBJ. (2001). **The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates 2nd edn** (San Diego, CA: Academic).

- PEDERSEN SF, OWSIANIK G, NILIUS B. (2005). **TRP channels: an overview.** Cell Calcium; 38: 233-252.
- PERRY DC; SNYDER SH. (1984). **Identification of bradykinin in mammalian brain.** J. Neurochem. 43, 1072- 1080.
- PESQUERO JB, BADER M. (1998) **Molecular biology of the kallikrein-kinin system: from structure to function.** Braz J Med Biol Res. 31:1197-1203.
- PURISAI MG, McCORMACK AL, CUMINE S, LI J, ISLA MZ, DI MONTE DA. (2007). **Microglial activation as a priming event leading to paraquat-induced dopaminergic cell degeneration.** Neurobiol. Dis. 25, 392-400.
- RAMSEY IS, DELLING M, CLAPHAM DE. (2006). **An introduction to TRP channels.** Annu Rev Physiol; 68: 619-647.
- RAO G, FISCH L, SRINIVASAN S, D'AMICO F, OKADA T, EATON C, ROBBINS C. (2003). **Does this patient have Parkinson disease?** Jama 289: 347-353.
- REAL CC, FERREIRA AFB, CHAVES-KIRSTEN GP, TORRÃO AS, PIRES RS, BRITTO LRG. (2013). **BDNF Receptor blockade hinders the beneficial effects of exercise in a rat model of parkinson's disease.** In press.
- RODI D, COUTURE R, ONGALI B, SIMONATO M. (2005). **Targeting kinin receptors for the treatment of neurological diseases.** Current Pharmaceutical Design. 11: 1313-1326.
- RODRIGUES RJ, ALMEIDA T, RICHARDSON PJ, OLIVEIRA CR, CUNHA RA. (2005). **Dual presynaptic control by ATP of glutamate release via facilitatory P2X1, P2X2/3, and P2X3 and inhibitory P2Y1, P2Y2, and/or P2Y4 receptors in the rat hippocampus.** J. Neurosci. 6286-6295.
- RUBERG M, SCHERMAN D, JAVOY-AGID F. (1995). **Agid, Dopamine denervation, age of onset, and Parkinson's disease.** Neurology 45: 392.
- RUBIO ME; SOTO F. (2001). **Distinct localisation of P2X receptors at excitatory postsynaptic specializations.** J Neurosci. 641-653.
- SANTANGELO G, PISCOPO F, BARONE P, VITALE C. (2017). **Personality in Parkinson's disease: Clinical, behavioural and cognitive correlates.** J Neurological Sciences. 374: 17-25.
- SAYRE LM, PERRY G, SMITH MA. (2008). **Oxidative stress and neurotoxicity.** Chemical research in toxicology 21:172-188.
- SHELL MJ; IRVINE RF. (2006). **Calcium-triggered exit of F-actin and IP3 3-kinase A from dendritic spines is rapid and reversible.** European J. Neuroscience. V. 24: 2491-2503.
- SCHENK U, FRASCOLI M, PROIETTI M, GEFFERS R, TRAGGIAI E, BUER J, et al. (2011). **ATP inhibits the generation and function of regulatory T cells through the activation of purinergic P2X receptors.** Sci Signal 4: ra12.
- SCHOBER A. (2004). **Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP.** Cell Tissue Res. 318: 215-224.
- SMITH JAM, WEBB C, HOLFORD J, BURGESS GM. (1995). **Signal transduction pathways for B1 and B2 bradykinin receptors in bovine pulmonary artery endothelial cell.** Mol. Pharmacol. 47: 525-534.

- SMITH GA, HEUER A, DUNNETT SB, LANE EL. (2012). **Unilateral nigrostriatal 6-hydroxydopamine lesions in mice II: predicting L-dopa-induced dyskinesia.** *Behav Brain Res.* 1: 281-92.
- STOTT SRW; BARKER RA. (2013). **Time course of dopamine neuron loss and glial response i the 6-OHDA striatal mouse model of Parkinson's disease.** *European J. of Neuroscience.* 1-15.
- SPITZER NC, ROOT CM, BORODINSKY LN. (2004). **Orchestrating neuronal differentiation: patterns of Ca<sup>2+</sup> spikes specify transmitter choice.** *Trends Neurosci* 27:415–421.
- SU J, CUI M, TANG Y, ZHOU H, LIU L, DONG Q. (2009). **Blockade of bradykinin B2 receptor more effectively reduces postischemic blood-brain barrier disruption and cytokines reléase tan B1 receptor inhibition.** *Bioch. Biophys Research Communicat.* 388: 205-211.
- SUKUMARAN P, SCHAAR A, SUN Y, SINGH BB. (2016). **Functional role of TRP channels in modulating ER stress and autophagy.** *Cell Calcium S* 0143-4160: 30015-X.
- SUN HS, JACKSON MF, MARTIN LJ, JANSEN K, TEVES L, CUI H, KIYONAKA S, MORI Y, JONES M, FORDER JP, GOLDE TE, ORSER BA, MACDONALD JF, TYMIANSKI M. (2009). **Supression of hippocampal TRPM7 protein prevents delayed neuronal death in brain ischemia.** *Nat. Neurosci.* 12 : 1300-1307.
- SUN Y, SUKUMARAN P, SCHAAR A, SINGH BB. (2015). **TRPM7 and its role in neurodegenerative diseases.** *Channels* 9: 253-261.
- SURPRENANT A; NORTH RA. (2009). **Signaling at purinergic P2X receptor.** *Annu Rev Physiol.* 333-359.
- TAKADA Y, NUMATA T, MORI Y. (2013). **Targeting TRPs in neurodegenerative disorders.** *Curr. Top. Med. Chem.* 13: 332-334.
- TEIVE HA. (2006). **Neuroproteção: fatos, mitos e quimeras.** In: ANDRADE LAF, BARBOSA RE, CARDOSO F, TEIVE HAG. **Doença de Parkinson: estratégias atuais de tratamento.** 2. Ed. São Paulo: Segmento Farma, 17-35.
- TORRES-RIVERA W, PÉREZ D, PARK KY, CARRASCO M, PLATT MO, ETEROVIC VA, FERCHMIN PA, ULRICH H, MARTINS AH. (2013) **Kinin-B2 receptor exerted neuroprotection after diisopropyfluorophosphate-induced neuronal damage.** *Neuroscience,* 247: 273-279.
- TRUJILLO CA, NEGRAES PD, SCHWINDT TT, LAMEU C, CARROMEU C, MUOTRI AR, PESQUERO JB, CERQUEIRA DM, PILLAT MM, SOUZA HDN, TURAÇA LT, ABREU JG, ULRICH H. (2012). **Kinin-B2 Receptor Activity Determines the Differentiation Fate of Neural Stem Cells.** *J. Biol Chemistry V.* 287: 53. 44046–44061.
- ULRICH H, ABBRACCHIO MP, BURNSTOCK G. (2012). **Extrinsic Purinergic Regulation of Neural Stem/Progenitor Cells: Implications for CNS Development and Repair.** *Stem Cell Reviews and Reports.* 755-767.
- UNGERSTEDT U. (1968). **6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons.** *European J. pharmacology.* 5, 107-110.
- VENKATACHALAM K; MONTELLI C. (2007). **TRP channels.** *Annu Rev Biochem;* 76: 387-417.

VERMA S, QUILLINAN N, YANG YF, NAKAYAMA S, CHENG J, KELLEY MH, HERSON PS. (2012). **TRPM2 channel activation following in vitro ischemia contributes to male hippocampal cell death.** *Neurosci. Lett.* 530: 41-46.

VIEL TA; BUCK HS. (2011). **Kallikrein-kinin system mediated inflammation in Alzheimer's disease *in vivo*.** *Current Alzheimer Research.* 8: 59-66.

WEBB M, McINTRYRE P, PHILLIPS E. (1994). **B1 and B2 bradykinin receptors encoded by distinct mRNAs.** *J. Neurochem.* 62, 1247-1253.

YU H, ZHANG ZL, CHEN J, PEI A, HUA F, QIAN X, HE J, LIU CF, XU X. (2012). **Carvacrol, a food-additive, provides neuroprotection on focal cerebral ischemia/reperfusion injury in mice.** *PLoS One* 7: e33584.

YUAHASI KK, DEMASI MA, TAMAJUSUKU AS, LENZ G, SOGAYAR MC, FORNAZARI M, LAMEU C, NASCIMENTO IC, GLASER T, SCHIWINDT TT, et. al. (2012). **Regulation of neurogenesis and gliogenesis of retinoic acid-induced P19 embryonal carcinoma cell by P2X2 and P2X7 receptors studied by RNA interference.** *Int J Dev Neurosci.* 91-97.

ZIMMERMANN H. (1996). **Biochemistry, localization and functional roles of ectonucleotidases in the nervous system.** *Prog Neurobiol* 49:589-618.

ZHANG HQ, ZHOU L, ZHANG X, BAI J, SHI G. (2012). **Ginsenoside-Rd attenuates TRPM7 and ASIC1a but promotes ASIC2a expression in rats after focal cerebral ischemia.** *Neurol Sci: Off J Ital Neurol Soc Ital Soc Clin Neurophysiol.* 33: 1125-1131.

## APÊNDICES

### Apêndice 1 Média e erro padrão dos receptores.

Imuno-histoquímica														
	TH		B2		P2X2		P2X4		P2X7		P2Y4		TRPM7	
	Controle	DP	Controle	DP	Controle	DP	Controle	DP	Controle	DP	Controle	DP	Controle	DP
<b>Estriado</b>	100 ± 1,9	18,7 ± 11,3	100 ± 5,9	133,0 ± 8,0	100 ± 6,9	105,0 ± 6,7	100 ± 23,7	181,5 ± 17,6	100 ± 10,2	148,9 ± 12,1	100 ± 10,8	112,3 ± 5,3	100 ± 13,5	127,1 ± 4,3
<b>Substância Negra</b>	100 ± 13,9	44,7 ± 3,7	100 ± 2,8	98,0 ± 2,7	100 ± 9,7	140,4 ± 6,5	100 ± 30,5	234,0 ± 55,9	100 ± 7,6	131,0 ± 9,9	100 ± 11,6	137,1 ± 18,2	100 ± 5,5	125,8 ± 4,8
Western Blotting														
	TH		B2		P2X2		P2X4		P2X7		P2Y4		TRPM7	
	Controle	DP	Controle	DP	Controle	DP	Controle	DP	Controle	DP	Controle	DP	Controle	DP
<b>Estriado</b>	100 ± 7,5	51,5 ± 16,5	100 ± 3,7	176,6 ± 32,7	100 ± 17,4	96,7 ± 5,2	100 ± 8,2	132,6 ± 2,0	100 ± 7,6	95,5 ± 10,3	100 ± 10,1	126,9 ± 17,5	100 ± 12,9	180,1 ± 16,6
<b>Substância Negra</b>	100 ± 14,9	52,3 ± 2,2	100 ± 4,8	173,6 ± 44,3	100 ± 11,6	210,6 ± 20,9	100 ± 4,8	120,6 ± 4,5	100 ± 11,7	145,3 ± 13,4	100 ± 32,2	328,3 ± 17,6	100 ± 11,6	149,9 ± 8,4

**Apêndice 2. Média e erro padrão dos nocautes, antagonista e agonista do receptor B2 de bradicinina.**

NOCAUTE	Imuno-histoquímica		Western Blotting	
	CONTROLE	DP	TH	
			CONTROLE	DP
Estriado	100 ± 10,8	22,8 ± 2,3	100 ± 19,2	64,7 ± 1,5
Substância Negra	100 ± 10,4	64,1 ± 10,1	100 ± 3,8	80,2 ± 5,0

	Imuno-histoquímica		Western Blotting	
	CONTROLE	DP	GFAP	
			CONTROLE	DP
Estriado	100 ± 3,2	85,5 ± 4,3	100 ± 18,6	71,0 ± 7,7
Substância Negra	100 ± 5,5	82,2 ± 4,1	100 ± 6,8	97,3 ± 6,5

HOE-104	Imuno-histoquímica		Western Blotting	
	CONTROLE	DP	TH	
			CONTROLE	DP
Estriado	100 ± 5,1	84,3 ± 2,5	100 ± 23,5	45,2 ± 12,5
Substância Negra	100 ± 14,3	36,4 ± 3,1	100 ± 19,8	43,3 ± 2,8

	Imuno-histoquímica		Western Blotting	
	CONTROLE	DP	GFAP	
			CONTROLE	DP
Estriado	100 ± 1,3	107,4 ± 2,3	100 ± 11,1	127,5 ± 26,1
Substância Negra	100 ± 8,5	102,0 ± 8,5	100 ± 18,3	34,0 ± 7,7



BK	Imuno-histoquímica		Western Blotting	
	CONTROLE	DP	TH	DP
			CONTROLE	
<b>Estriado</b>	100 ± 4,7	98,7 ± 5,1	100 ± 36,7	91,8 ± 13,3
<b>Substância Negra</b>	100 ± 10,8	101,0 ± 5,9	100 ± 8,2	84,7 ± 12,8

	Imuno-histoquímica		Western Blotting	
	CONTROLE	DP	GFAP	DP
			CONTROLE	
<b>Estriado</b>	100 ± 3,8	103,9 ± 3,6	100 ± 13,0	69,2 ± 13,9
<b>Substância Negra</b>	100 ± 4,5	102,3 ± 3,7	100 ± 12,7	73,1 ± 24,7

**Apêndice 3. Média e erro padrão das análises realizadas com carvacrol.**

<b>CARVACROL</b>		<b>Imuno-histoquímica</b>			
		<b>TH</b>			
		<b>CONTROLE - Salina</b>	<b>DP - Salina</b>	<b>CONTROLE - Carvacrol</b>	<b>DP - Carvacrol</b>
<b>Estriado</b>		100 ± 1,2	43,4 ± 14,7	100 ± 3,6	117,8 ± 5,0
<b>Substância Negra</b>		100 ± 13,9	44,7 ± 3,9	100 ± 5,3	87,1 ± 2,5
		<b>Western-blotting</b>			
		<b>TH</b>			
		<b>CONTROLE - Salina</b>	<b>DP - Salina</b>	<b>CONTROLE - Carvacrol</b>	<b>DP - Carvacrol</b>
<b>Estriado</b>		100 ± 17,4	100 ± 6,7	99,4 ± 15,41	112,5 ± 9,3
<b>Substância Negra</b>		100 ± 11,1	45,9 ± 13,1	95,8 ± 10,7	92,9 ± 12,6
		<b>Western-blotting</b>			
		<b>Caspase-3</b>			
		<b>CONTROLE - Salina</b>	<b>DP - Salina</b>	<b>CONTROLE - Carvacrol</b>	<b>DP - Carvacrol</b>
<b>Estriado</b>		100 ± 17,3	213,3 ± 39,3	91,9 ± 10,4	45,7 ± 11,1
<b>Substância Negra</b>		100 ± 19,7	185,5 ± 10,1	97,6 ± 9,0	74,9 ± 10,0
		<b>Teste do cilindro</b>			
		<b>Salina</b>	<b>Carvacrol</b>		
<b>Baseline</b>		47,4 ± 1,3	46,6 ± 1,7		
<b>7 dias</b>		66,2 ± 2,2	54,8 ± 1,4		
<b>14 dias</b>		72,2 ± 0,9	51,0 ± 1,3		