

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:  
BIOQUÍMICA

Reykla Ramon Bittencourt

**PAPEL DOS RECEPTORES RAGE E TLR4 NA TOXICIDADE INDUZIDA POR 6-  
HIDROXIDOPAMINA EM LINHAGEM SH-SY5Y DIFERENCIADA**

Porto Alegre

2023

Reykla Ramon Bittencourt

**PAPEL DOS RECEPTORES RAGE E TLR4 NA TOXICIDADE INDUZIDA POR 6-HIDROXIDOPAMINA EM LINHAGEM SH-SY5Y DIFERENCIADA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestra em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Pens Gelain  
Coorientador: Prof. Dr. José Claudio Fonseca  
Moreira

Porto Alegre

2023

### CIP - Catalogação na Publicação

Bittencourt, Reykla Ramon  
PAPEL DOS RECEPTORES RAGE E TLR4 NA TOXICIDADE  
INDUZIDA POR 6-HIDROXIDOPAMINA EM LINHAGEM SH-SY5Y  
DIFERENCIADA / Reykla Ramon Bittencourt. -- 2023.  
59 f.  
Orientador: Daniel Pens Gelain.

Coorientador: José Cláudio Fonseca Moreira.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da  
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2023.

1. RAGE. 2. TLR4. 3. Doença de Parkinson. 4.  
Neurodegeneração. 5. 6-OHDA. I. Gelain, Daniel Pens,  
orient. II. Moreira, José Cláudio Fonseca, coorient.  
III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, mesmo com a controvérsia que possa existir em: crer em Deus e ser cientista. “Na ciência, cada certeza traz mais uma dúvida. Na fé, cada dúvida vira uma certeza.”

Agradeço as minhas duas mulheres preferidas no mundo: mãe, Nadia, e minha avó, Neusa. As bases da minha vida, meus maiores amores e de onde vem um apoio incondicional. Sem vocês eu não seria quem sou hoje. Eu amo vocês incondicionalmente.

Aos presentes que a jornada “vida” me concedeu o prazer de conhecer e manter por perto. João Luiz, Janis, Mariana e Daniel. Obrigada por todo incentivo, por toda palavra amiga, por todo apoio e suporte durante os anos. Eu amo demais cada um de vocês!

Aos meus sogros, Marilene e Luiz (*in memoriam*). Eu não tenho nem palavras para agradecer o tanto que vocês fizeram (e fazem) por mim durante todos esses anos em que estou na família, em especial durante o ano de 2022. Nunca irei esquecer! Amo vocês e levo sempre em meu coração.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Daniel Gelain. Obrigada por todos esses anos de orientação, desde a graduação até o mestrado, foram anos de muito conhecimento e ensinamentos. Sempre serei grata pela oportunidade de me deixar conduzir nossas pesquisas no Lab. 32.

A todos colegas do Laboratório 32 no Departamento de Bioquímica da UFRGS. Estar em um lugar e se sentir “família” é fundamental. Um agradecimento mais que especial a ti, Carol, obrigada por todos esses anos de troca, confiança e dedicação comigo. O teu apoio, ensinamentos, conselhos, foram fundamentais em todas as etapas, não só do mestrado, mas na vida também. Ainda sobre pessoas especiais, Marlene, Flávio, Lucas, Luíza, Luiz, Fernanda, Débora, Danielle e Julia, obrigada por todo o suporte e discussões, sempre e sempre. Família 32 no coração!

Aos órgãos de fomento: PROPESQ-UFRGS, CNPq e CAPES por permitirem que a pesquisa brasileira continue.

E por fim, à ciência e aos cientistas: Que a curiosidade e o conhecimento se transformem em solução para os mais diversos tipos de problemas e que o saber de vocês chegue a todos os lugares do mundo!

*" Science knows no country,  
because knowledge belongs to humanity,  
and is the torch which illuminates the world. "*

***Louis Pasteur***

# Sumário

<b>AGRADECIMENTOS</b>	<b>4</b>
<b>PARTE I</b>	<b>7</b>
<b>RESUMO</b>	<b>8</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>9</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	<b>10</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>12</b>
1.1 DOENÇA DE PARKINSON	12
1.1.1 <i>Neuroinflamação e Neurodegeneração</i>	13
1.2 RECEPTOR PARA PRODUTOS FINAIS DE GLICAÇÃO AVANÇADA (RAGE)	14
1.2.1 <i>RAGE – Neuroinflamação e DP</i>	16
1.2.2 <i>Inibição do RAGE – FPS-ZM1</i>	19
1.3 TOLL-LIKE RECEPTOR (TLR4)	20
1.3.1 <i>TLR4 - Neuroinflamação e DP</i>	21
1.3.2 <i>Inibição do TLR4 – TAK-242</i>	22
1.4 CROSS-TALK DE RECEPTORES: RAGE E TLR4	23
1.5 MODELOS EXPERIMENTAIS <i>IN VITRO</i> – DOENÇA DE PARKINSON	25
1.5.1 <i>Linhagem celular – SH-SY5Y</i>	25
1.5.2 <i>Neurotoxina – 6-OHDA</i>	26
<b>2. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA</b>	<b>27</b>
<b>PARTE II</b>	<b>28</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>29</b>
3.1 CULTURA DE CÉLULAS	29
3.2 DIFERENCIAÇÃO NEURONAL E TRATAMENTOS	29
3.3 TESTES DE VIABILIDADE CELULAR	30
3.4 IMUNOFLOURESCÊNCIA	31
3.5 RT-qPCR	32
3.6 MITOSOX RED E MITOTRACKER RED FM	32
3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	33
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>34</b>
4.1 MODELO <i>IN VITRO</i> PARA DOENÇA DE PARKINSON	34
4.1.1 <i>Diferenciação neuronal dopaminérgica</i>	34
4.1.2 <i>Curva de sensibilidade à neurotoxina – 6-OHDA</i>	35
4.2 O PAPEL DA INIBIÇÃO DO RAGE NA VIABILIDADE NEURONAL <i>IN VITRO</i>	36
4.3 MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DOS RECEPTORES: <i>AGER</i> E <i>TLR4</i>	37
4.4 MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PARÂMETROS PRO-INFLAMATORIOS	38
4.5 PAPEL DOS RECEPTORES FRENTE A ALTERAÇÕES MITOCONDRIAIS	39
<b>PARTE III</b>	<b>43</b>
<b>5. DISCUSSÃO</b>	<b>44</b>
<b>6. CONCLUSÃO</b>	<b>48</b>
<b>7. PERSPECTIVAS</b>	<b>49</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>50</b>

## **PARTE I**

## RESUMO

A Doença de Parkinson (DP) é uma doença neurodegenerativa progressiva, e sua incidência aumenta proporcionalmente em relação ao aumento da expectativa de vida populacional. Disfunção mitocondrial, estresse oxidativo, excitotoxicidade e neuroinflamação crônica são alguns dos mecanismos que levam à degeneração progressiva dos neurônios dopaminérgicos da substância nigra *pars compacta*, uma das características fisiopatológicas da DP. O RAGE é um receptor transmembrana, com capacidade de reconhecimento multiligante e a indução da sua expressão nas células, ativa importantes vias de sinalização associadas ao estresse oxidativo e neuroinflamação. O TLR4, um receptor de membrana, possui um desempenho crucial durante processos inflamatórios. Sua estimulação excessiva está associada a produção mediadores pró-inflamatórios estando implicado em diversos estudos sobre progressão da neurodegeneração. A cooperação RAGE e TLR4 resulta na perpetuação de suas expressões, aumentando a sua atividade e promovendo uma sustentação da inflamação, devido a ativação sinérgica de suas vias de sinalização. Até o momento, a cooperação entre RAGE e TLR4 no neurônio é menos explorada, criando uma importante lacuna sobre o potencial terapêutico do bloqueio dos receptores para abordagens na DP. Portanto, o objetivo desse estudo foi verificar o papel do RAGE e de TLR4 em um modelo *in vitro* da DP, bloqueando os receptores através da administração dos inibidores FPS-ZM1 e TAK-242, respectivamente, na linhagem celular SH-SY5Y diferenciada por ácido retinóico exposta a 6-hidroxidopamina (6-OHDA). Os resultados mostram que houve uma interdependência entre RAGE e TLR4 em um contexto neuronal. Ainda, a 6-OHDA induziu o aumento da expressão do RAGE e de TLR4, bem como das citocinas TNF $\alpha$  e IL6. Além disso, a inibição do RAGE e TLR4 atenuou a neuroinflamação no modelo e foi capaz de suprimir a disfunção da atividade mitocondrial induzida pela 6-OHDA. Tais resultados sugerem que o *crosstalk* da sinalização de RAGE e de TLR4 controla eventos críticos para a manutenção da viabilidade neuronal em um contexto de toxicidade dopaminérgica, através do controle da expressão de citocinas pró-inflamatórias que acontece provavelmente em respostas as disfunções mitocondriais.

**Palavras-chave:** RAGE; TLR4; Doença de Parkinson; Neuroinflamação; Neurodegeneração; 6-OHDA;



## ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is a progressive neurodegenerative disease, and its incidence increases proportionally with the increase in population life expectancy. Mitochondrial dysfunction, oxidative stress, excitotoxicity and chronic neuroinflammation are some of the mechanisms that lead to the progressive degeneration of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta, one of the pathophysiological characteristics of PD. RAGE is a transmembrane receptor, capable of multiligand recognition and the induction of its expression in cells, activates important signaling pathways associated with oxidative stress and neuroinflammation. TLR4, a membrane receptor, plays a crucial role during inflammatory processes. Its excessive stimulation is associated with the production of pro-inflammatory mediators, being implicated in several studies on the progression of neurodegeneration. The cooperation of RAGE and TLR4 results in the perpetuation of their expressions, increasing their activity and promoting inflammation sustenance due to the synergistic activation of their signaling pathways. To date, the cooperation between RAGE and TLR4 in the neuron is less explored, creating an important gap on the therapeutic potential of receptor blockade for approaches in PD. Therefore, the aim of this study was to verify the role of RAGE and TLR4 in an in vitro model of PD, blocking the receptors through the administration of FPS-ZM1 and TAK-242 inhibitors, respectively, in the retinoic acid differentiated SH-SY5Y cell line exposed to 6-hydroxydopamine (6-OHDA). The results show that there was an interdependence between RAGE and TLR4 in a neuronal context. Furthermore, 6-OHDA induced an increase in the expression of RAGE and TLR4, as well as the cytokines TNF $\alpha$  and IL6. Moreover, inhibition of RAGE and TLR4 attenuated neuroinflammation in the model and was able to suppress the dysfunction of mitochondrial activity induced by 6-OHDA. These results suggest that the crosstalk of RAGE and TLR4 signaling controls critical events for the maintenance of neuronal viability in a context of dopaminergic toxicity, through the control of the expression of pro-inflammatory cytokines, which probably occurs in response to mitochondrial dysfunction.

**Keywords:** RAGE; TLR4 Parkinson's disease; Neuroinflammation; Neurodegeneration; 6-OHDA.

## LISTA DE ABREVIATURAS

**6-OHDA** 6-Hidroxi-dopamina

**A $\beta$**  peptídeo  $\beta$ -amilóide

**AR** Ácido Retinóico

**AGER** gene humano do RAGE

**AGEs** Produtos Finais de Glicação Avançada

**BHE** Barreira Hematoencefálica

**DA** Doença de Alzheimer

**DAMPs** Padrão Molecular Associado a Dano

**DAT** Transportador de Dopamina (*Dopamine Transporter*)

**DBS** Estimulação Cerebral Profunda (*Deep Brain Stimulation*)

**DMSO** Dimetilsulfóxido

**DP** Doença de Parkinson

**ERK1/2** *Extracellular signal-regulated kinases 1/2*

**FPS-ZM1** *N-benzil-4-cloro-N-ciclohexylbenzamide*

**HMGB1** *High mobility group box 1 protein*

**HSP70** Proteína de choque térmico 70kDa

**IL1 $\beta$**  Interleucina 1 *beta*

**IL6** Interleucina 6

**IL8** Interleucina 8

**IL10** Interleucina 10

**JNK** *c-Jun N-terminal kinases*

**LCR** Líquido Cefalorraquidiano

**LDH** Lactato Desidrogenase

**LPS** Lipopolissacarídeo de parede celular bacteriana

**MAPK** *Mitogen-activated protein kinase*

**MPTP** 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina

**MTT** *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide*

**NADPH** Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina

**NF- $\kappa$ B** Fator Nuclear *kappa* B

**PAMPs** Padrão Molecular Associado a Patógenos

**PI3K** *Phosphoinositide 3-kinase*

**RAGE** Receptor para Produtos Finais de Glicação Avançada

**EROs** Espécies Reativas de Oxigênio

**RRP** Receptor de Reconhecimento de Padrões

**S100B** S100/calgranulina tipo B

**SFB** Soro Fetal Bovino

**SNC** Sistema Nervoso Central

**SNpc** Substância Nigra *pars compacta*

**SRB** *Sulforhodamine B*

**TAK-242** *ethyl (6R)-6-[N-(2-chloro-4-fluorophenyl)sulfamoyl]cyclohex-1-ene-1-carboxylate*

**TH** Tirosina Hidroxilase

**TLR** Receptor do Tipo Toll (*Toll Like Receptor*)

**TLR4** Receptor do Tipo Toll 4 (*Toll Like Receptor 4*)

**TNF $\alpha$**  Fator de Necrose Tumoral *alpha*

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 DOENÇA DE PARKINSON

A Doença de Parkinson (DP) é uma doença neurodegenerativa de caráter progressivo, caracterizada por quatro principais sintomas motores: tremores de repouso, rigidez muscular, bradicinesia e instabilidade postural. O surgimento dos distúrbios motores na DP resulta da morte seletiva de neurônios dopaminérgicos na substância nigra *pars compacta* (SN<sub>pc</sub>), bem como da redução acentuada dos níveis de dopamina no estriado. Em muitos casos, a morte neuronal é precedida pela presença dos corpos de Lewy - inclusões citoplasmáticas compostas por  $\alpha$ -sinucleína fibrilar, ubiquitina, proteína tau associada à mielina e outras proteínas (Hirsch et al., 2021). É possível que essas inclusões possam se formar nos estágios iniciais do processo patológico, em diversas áreas do sistema nervoso, expandindo gradualmente para outras regiões cerebrais, contribuindo para a evolução contínua da doença. Em seus estágios iniciais, esse processo não afeta o sistema dopaminérgico da SN<sub>pc</sub> e do estriado, nem compromete o comportamento motor (Del Tredici et al., 2016).

Quanto à frequência em relação a outras doenças neurodegenerativas, a DP ocupa a segunda posição, ficando atrás apenas da Doença de Alzheimer (DA). A incidência da DP, bem como de outras doenças neurodegenerativas, aumenta proporcionalmente em relação ao aumento da expectativa de vida populacional; e sua faixa etária de prevalência situa-se acima dos 60 anos (Tysnes e Storstein, 2017). Em indivíduos com mais de 80 anos, os sintomas são observados em cerca de 4% da população global (Bandres-Ciga et al., 2019). As terapias atuais permanecem predominantemente sintomáticas, focando em atenuar a disfunção nigroestriatal, por meio de intervenções farmacológicas - que aumentam a disponibilidade de dopamina; ou intervenções cirúrgicas - como a estimulação cerebral profunda (DBS) (Mahlknecht et al., 2020; Poewe e Espay, 2020). É importante ressaltar que estas medidas não abordam as causas subjacentes da neurodegeneração.

Através dos anos, têm sido amplamente explorados vários mecanismos celulares e moleculares que possam contribuir para o desencadeamento da morte neuronal. Estes incluem não apenas a disfunção mitocondrial, estresse oxidativo, excitotoxicidade, perda de proteostase, mas também, perturbações no processo autofágico e neuroinflamação (Michel et al., 2016; Portz et al., 2021; Hirsch et al., 2021). Contudo, apesar dos esforços em investigação, questões relacionadas à raiz da morte neuronal continuam sem solução definitiva.

### 1.1.1 Neuroinflamação e Neurodegeneração

A neuroinflamação, refere-se a um processo complexo de resposta imunológica e inflamatória que ocorre no sistema nervoso central (SNC), em virtude de lesões, infecções, disfunções neurodegenerativas e outros estímulos patológicos. Essa resposta é gerada via ativação de várias células do sistema imunológico inato, como micróglia, astrócitos, monócitos e neurônios, e induz a produção de mediadores inflamatórios, incluindo citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento (Kempuraj et al, 2016).

Em condições de homeostase celular, essas respostas inflamatórias são neuroprotetoras e buscam atenuar os efeitos prejudiciais das condições patológicas no SNC, como a remoção de células mortas ou danificadas e reparação de tecidos. No entanto, em cenários crônicos, essa resposta pode se tornar exacerbada e contribuir para a progressão de doenças neurodegenerativas, incluindo a DP (Hunter et al., 2007; Pajares et al., 2020). O efeito da inflamação na sobrevivência de neurônios da via nigroestriatal tem sido investigado através da utilização de lipopolissacarídeo de parede celular bacteriana (LPS), bem como de toxinas indutoras de degeneração dopaminérgica, como a 6-hidroxidopamina (6-OHDA) e MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina), utilizadas tanto em modelos animais da DP, quanto em modelos *in vitro* (Chia et al., 2020).

Juntamente a outros transtornos neurodegenerativos, a neuroinflamação tem sido fortemente vinculada à patogênese da DP. No entanto, seriam os eventos neuroinflamatórios, causa ou consequência, da degeneração neuronal progressiva na DP? Esta e várias outras questões-chave relacionadas a complexa ligação entre os processos neuroinflamatórios e a degeneração neuronal, ainda precisam ser abordadas (Gelders et al., 2018). Entretanto, alguns processos chave tem sido amplamente estudados:

**Agregação de  $\alpha$ -sinucleína:** A agregação anormal da proteína  $\alpha$ -sinucleína constitui uma das premissas centrais para elucidar os mecanismos subjacentes à degeneração dos neurônios nigroestriatais na DP (Kazantsev et al., 2008). Pode tornar-se neurotóxica, quando seus monômeros solúveis são levados à oligomerização e fibrilação (insolúveis). Além disso, a queda da proteostase, possivelmente devido a idade, exerce uma função proeminente no acúmulo da  $\alpha$ -sinucleína. Esse quadro pode ativar respostas inflamatórias e contribuir para a morte neuronal (Paleologou et al., 2009).

**Liberação de citocinas pró-inflamatórias:** Células em senescência ou danificadas podem liberar DAMPs (Padrões Moleculares Associados a Danos), interleucinas e/ou EROs (espécies reativas de oxigênio) mitocondriais que desencadeiam uma resposta imune inata após a interação com receptores de reconhecimento de padrões (RRPs) (Hirsch et al., 2009). A ativação sustentada de NLRP3, e fatores de transcrição - NF-kB e AP-1 por exemplo; eleva a síntese de citocinas, como IL1 $\beta$ , IL6, IL10 e TNF $\alpha$  (King e Thomas, 2017), perpetuando as respostas inflamatórias, corroborando para a degeneração neuronal.

**Estresse oxidativo:** Sob condições fisiológicas, EROs são importantes para a defesa do hospedeiro e diversos processos celulares (Shukla et al., 2011). Entretanto, quando há um acúmulo, a atividade antioxidante celular é sobrecarregada e a neuroinflamação pode ser um fator chave para o desencadeamento do estresse oxidativo. Compostos citotóxicos se acumulam e causam colapso proteico, degradação lipídica e morte celular. Essas disfunções podem contribuir para a patogênese da DP (Miller et al., 2009; Jenner P., 2007; Tsang e Chung, 2007).

**Disfunção mitocondrial:** Na DP, a disfunção mitocondrial abrange anormalidades nos processos metabólicos e energéticos mitocondriais. Acredita-se que as mitocôndrias contribuam para o envelhecimento e neurodegeneração, através do acúmulo de mutações no DNA mitocondrial (mtDNA) e da produção de EROs (Büeler H., 2009; Lin e Beal, 2006). Além disso, a disfunção mitocondrial pode perturbar a homeostase do cálcio intracelular, influenciando na sobrevivência dos neurônios. Também, a interação entre agregados de  $\alpha$ -sinucleína e mitocôndrias mostrou ter o um impacto adverso na função mitocondrial (Picca et al., 2021).

## 1.2 RECEPTOR PARA PRODUTOS FINAIS DE GLICAÇÃO AVANÇADA (RAGE)

O RAGE foi descrito, inicialmente, como um receptor da sinalização para produtos finais de glicação avançada (AGEs) (Neeper et al., 1992). Atualmente, o RAGE está associado ao reconhecimento de DAMPs e padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e, portanto, pode ser considerado um RRP. Além disso, é membro da superfamília das imunoglobulinas, possui característica multiligante, bem como expressão de múltiplas isoformas oriundas de splicing alternativo ou clivagem proteolítica (Kierdorf e Fritz, 2013). A expressão do receptor depende do tipo de célula e do estágio de desenvolvimento. Em geral, o RAGE é constitutivamente expresso durante o desenvolvimento embrionário e diminuído na vida adulta, exceto na pele e nos pulmões, onde o RAGE é altamente expresso ao longo da vida. Por outro

lado, RAGE apresenta uma expressão baixa em células endoteliais, cardiomiócitos, neutrófilos, macrófagos, linfócitos e células dendríticas, fisiologicamente (Gasparotto et al., 2023). No SNC, a presença do RAGE também é registrada, na glia e nos neurônios (Huttunen et al., 2000; Schmidt et al., 2007; Ott et al., 2014).

Em condições patológicas crônicas, como doenças cardiovasculares, diabetes, câncer, doenças neurodegenerativas (Litwinoff et al., 2015; Malik et al., 2015; Derk et al., 2018) ou até mesmo devido ao avanço da idade, a expressão do RAGE é aumentada e, em certos casos, de maneira exacerbada (Simm A et al, 2004). Portanto, seu papel pode convergir com doenças neurodegenerativas ou relacionadas à idade, assim como a DP. Além disso, o RAGE desempenha papéis como transportador através da barreira hematoencefálica (BHE) (Deane et al., 2003; Yamamoto e Higashida, 2020) e possui função de adesão celular (Sessa et al., 2014). A interação com ligantes, perpetua sua expressão na célula, através do desencadeamento de diferentes vias de sinalização intracelular - dependendo da célula ou tecido, ligantes e concentração destes ligantes envolvidos (Xie et al., 2013; Kierdorf e Fritz, 2013).

Sobre sua estrutura, a isoforma fRAGE (comprimento total) possui três domínios: um domínio extracelular (peptídeo de sinal N-terminal, domínio do tipo V e domínio do tipo C1, interconectados no domínio do tipo C2), um domínio transmembrana e uma cauda citoplasmática curta. A atividade multiligante de RAGE, se dá através da sua capacidade de reconhecer múltiplos padrões em seus domínios extracelulares. Produtos finais de glicação avançada (AGEs), proteína box-1 do grupo de alta mobilidade (HMGB1), peptídeo  $\beta$ -amilóide (A $\beta$ ), proteína de choque térmico 70kDa (HSP70), S100/calgranulina tipo B (S100B) e Lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), são alguns de seus ligantes mais conhecidos (Gasparotto et al., 2023). Na sua forma N-truncada (sem o peptídeo N-terminal e o domínio do tipo V), NRAGE perde a capacidade de reconhecer alguns ligantes (Yonekura et al., 2003).

Tanto a isoforma solúvel extracelular (esRAGE) quanto a isoforma clivada (cRAGE), possuem o domínio C-terminal truncado, podendo ser secretados extracelularmente, mas resultando na perda da sinalização mediada por RAGE (Zong et al., 2010). Entretanto, as isoformas ainda podem reconhecer seus ligantes na porção extracelular (Ding e Keller, 2005) e atuarem como bloqueadores, impedindo a ligação de fRAGE a ligantes. Nesse contexto, as isoformas atuam como chamarizes para esses ligantes (Bierhaus et al., 2005). Além disso, o RAGE solúvel (sRAGE) também pode interferir na função da isoforma completa e, conseqüentemente, na transdução do sinal, bloqueando diretamente sua dimerização (Figura 1).

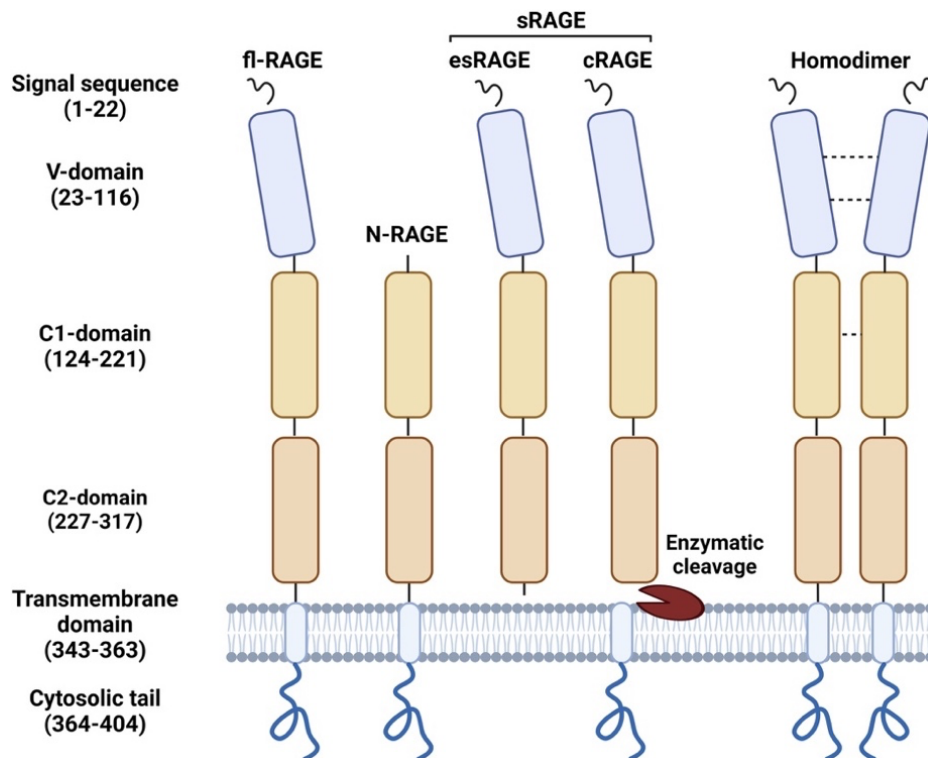


Figura 1. RAGE: Estrutura molecular. Reproduzido de (Gasparotto et al., 2023).

### 1.2.1 RAGE – Neuroinflamação e DP

A presença de neuroinflamação é uma característica intrínseca às patologias neurodegenerativas, e um conjunto significativo de estudos tem estabelecido a associação do RAGE na conexão entre a neuroinflamação e a neurodegeneração. Dentre os elementos que podem contribuir para a instauração da inflamação crônica, observa-se que o RAGE desempenha um papel relevante na indução da resposta inflamatória em células do SNC, sob condições diversas (Ray et al., 2016; Gasparotto et al., 2017; Gasparotto et al., 2018; Shen et al., 2021). A relevância do RAGE na regulação de cascatas inflamatórias parece estar conectada com dois importantes fatores: a hiperativação de vias específicas e a indução da sua expressão nas células.

É sabido que, em contextos fisiológicos e em baixas concentrações, a presença do RAGE nos neurônios pode estar associada à proteção, reparação e regeneração de neuritos. Um dos principais mecanismos de sobrevivência induzida pelo RAGE é, possivelmente, mediado por baixos níveis de EROs, que são gerados pela ativação da enzima NADPH oxidase (Piras et al., 2016). Evidências experimentais delineiam a influência das vias HMGB1/S100-RAGE-NF-κB, as quais demonstram plasticidade funcional condicionada pelo tipo celular e pela intensidade da ativação (Hori et al., 1995; Huttunen et al., 2000; Leclerc et al., 2007; Sorci et al., 2013). Todavia, em cenários caracterizados por concentrações elevadas de ligantes (como na lesão tecidual ou no



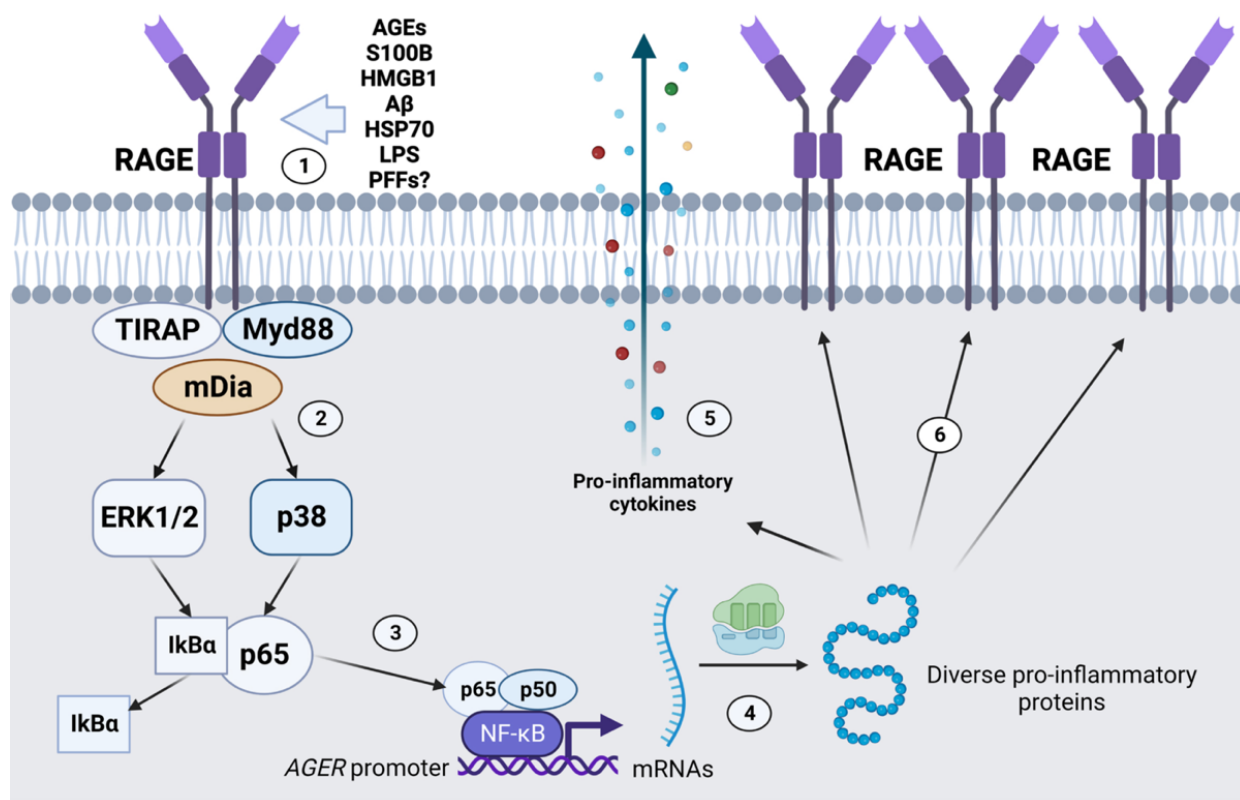
início do processo inflamatório), observa-se um expressivo aumento da expressão de RAGE no tecido cerebral e elevando níveis de EROs intracelulares, promovendo o desequilíbrio do estado redox (Piras et al., 2016). Essas descobertas corroboram a perspectiva de que a hiperativação das vias de sinalização governadas pelo RAGE e sua expressão acentuada podem estar ligadas a eventos deletérios, tais como a amplificação da sinalização inflamatória e a consequente degeneração neuronal (Taguchi et al., 2000; Takuma et al., 2009; Chuah et al., 2013; Piras et al., 2016).

Portanto, além do tipo celular ter importância no desfecho da sinalização, a concentração de ligantes também é um fator chave na predição do efeito do RAGE na homeostase celular. Esses efeitos contraditórios parecem não estar relacionados aos tipos de ligantes do RAGE, visto que diferentes ligantes são capazes de induzir ambos os tipos de resposta celular. Provavelmente, o que diferencia de um caso para outro, é a intensidade e a duração do estímulo, e fundamentalmente, as características específicas das células (Huttunen et al., 2000; Piras et al., 2016). Como dito anteriormente, altos níveis do RAGE, estão correlacionados com o envelhecimento, onde há o aumento da sua expressão em diversos tecidos (Simm et al., 2004). Este aumento durante o envelhecimento, pode ser devido ao acúmulo de ligantes em células senescentes, que por sua vez elevam a expressão do receptor através da retroalimentação positiva de sua expressão (Li e Schmidt, 1997).

Reconhecendo alguns ligantes e sendo capaz de transduzir sinalização, o RAGE desencadeia importantes vias de sinalização. Ao ativar a proteína NADPH oxidase, que gera rapidamente EROs, a expressão de citocinas pró-inflamatórias é aumentada, bem como o aumento da formação de ligantes de RAGE (visto que o acúmulo de EROs propicia esse quadro), potencializando ainda mais sua ativação (Rouhiainen et al., 2013). Essas respostas são seguidas pela ativação de fatores de transcrição conhecidos, como NF- $\kappa$ B por exemplo. Um fato importante, é que o gene do RAGE (*AGER*) possui um elemento responsivo ao NF- $\kappa$ B, e a ativação do receptor é capaz de aumentar sua própria expressão, induzindo a transcrição de diversos genes pró-inflamatórios - citocinas e quimiocinas por exemplo (Li e Schmidt, 1997; Bopp et al., 2008). Esse *looping de feedback positivo* (Figura 2), tem sido associado a manutenção de estados crônicos pró-inflamatórios (Lukic et al., 2008).

Em muitos casos, é difícil prever o caminho - autofagia, inflamação, crescimento de neurite, proliferação ou apoptose (Huttunen et al., 2000; Schmidt et al., 2001; Hou et al. 2014) a ser impulsionado pela ativação de RAGE. Essas cascatas de sinalização podem ser ativadas tanto sozinhas, quanto simultaneamente, como resultado da estimulação do receptor. Em suma, RAGE

desencadeia uma complexa cascata de sinalização, cujos novos esclarecimentos sobre seus mecanismos ainda estão em constante estudo.



**Figura 2.** A ativação do RAGE favorece respostas inflamatórias, além de estimular sua própria expressão por meio de um *looping de feedback positivo*. Reproduzido de (Gelain et al., 2023)

Estudos recentes sugerem um potencial papel do RAGE e seus ligantes, para a progressão da patogênese da DP. Um estudo *in vitro*, utilizou o modelo de dano celular por Paraquat, e pode observar que o *knockdown* de um conhecido ligante de RAGE, HMGB1, inibiu a ativação da via de sinalização RAGE-P38-NF-κB e a expressão de TNFα e IL6. Esse resultado sugere que o HMGB1 está envolvido na morte neuronal induzida pela neurotoxina, através da ativação das vias de sinalização de RAGE - que promoveram respostas neuroinflamatórias nas células (Min Huang et al., 2020). De mesmo modo, em um modelo *in vivo* utilizando MPTP, o aumento da expressão de RAGE em neurônios dopaminérgicos e células gliais ativou a sinalização NF-κB (Teismann et al., 2012). Adicionalmente neste estudo, em camundongos RAGE *knockout*, observou-se uma mitigação na neurodegeneração induzida por MPTP. Esses animais exibiram uma diminuição na ativação da microglia, juntamente com um aumento na contagem de neurônios dopaminérgicos.

Em nosso grupo de pesquisa, o papel do RAGE vem sendo explorado durante os anos. A inibição farmacológica do receptor - através do seu antagonista, FPS-ZM1, foi utilizada em dois

modelos animais: um modelo de dano via 6-OHDA (Gasparotto et al., 2017) e um modelo de dano via LPS (Peixoto et al., 2023). Gasparotto e colegas, conseguiram observar que a inibição do RAGE, reduziu a ativação de astrócitos e micróglia, diminuiu a perda de neurônios dopaminérgicos e a atenuou os déficits locomotores em ratos. De mesmo modo, Peixoto e colegas, puderam observar que a ablação do RAGE protegeu contra a gliose, reduziu a carga de  $\alpha$ -sinucleína na SNpc, diminuiu o aumento dos níveis de S100B no LCR e aliviou os déficits cognitivo-comportamentais. Portanto, independente da estratégia utilizada, a ablação do RAGE anula uma variedade de mecanismos prejudiciais, observados em modelos semelhantes a DP. Embora vários desses achados tenham sido de natureza parcial, é provável que investigações futuras, apoiadas na compreensão da função do RAGE na DP, especificamente em um contexto neuronal, possam abrir vias significativas para a utilização do receptor como abordagem terapêutica.

### 1.2.2 Inibição do RAGE – FPS-ZM1

O FPS-ZM1, é um bloqueador de alta afinidade para o RAGE, que se liga ao domínio do tipo V do receptor, impedindo a interação do RAGE com seus ligantes (Deane et al, 2012). Diferente dos anticorpos anti-RAGE, bem como de sRAGE (Yan et al, 2010), que apenas bloqueiam flRAGE, porém não cruzam a BHE, o FPS- ZM1 é capaz de atravessar a barreira. É importante ressaltar também, que mesmo em altas doses, o inibidor não exibiu toxicidade em camundongos (Deane et al., 2012). Uma pesquisa recente, demonstrou que o tratamento com FPS-ZM1 atenuou os déficits neurológicos induzidos pela oclusão da artéria cerebral média distal (MCAO), inibiu a ativação astrocítica e a microgliose induzida por isquemia, bem como diminuiu os níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias. Além disso, níveis diminuídos de RAGE, inibiram a sinalização de NF- $\kappa$ B, indicando que o FPS-ZM1 foi capaz de produzir um efeito neuroprotetor em um modelo *in vivo*, bem como a reversão da morte neuronal (Shen et al, 2021).

Como citado anteriormente, em nosso laboratório os papeis da inibição do RAGE, através da utilização do FPS-ZM1, vem sendo estudado durante os anos. A reversão da morte neuronal dopaminérgica e a supressão da ativação de vias de sinalização inflamatórias após a utilização do FPS-ZM1, puderam ser observadas, sugerindo que a inibição do RAGE atenuou a neuroinflamação no modelo animal utilizando 6-OHDA como dano (Gasparotto et al., 2017). De mesmo modo, agora com a utilização do FPS-ZM1 via intranasal em ratos, a inibição atenuou a neuroinflamação crônica induzida por LPS em diferentes regiões cerebrais (Peixoto et al., 2023). Em resumo, possíveis abordagens terapêuticas baseadas na inibição do RAGE e seus mecanismos,

podem ser a chave para tratar condições nas quais a neuroinflamação e consequente morte neuronal desempenham um papel importante.

### 1.3 *TOLL-LIKE RECEPTOR (TLR4)*

Os Receptores do Tipo Toll (TLR) são uma família de proteínas localizadas na membrana celular com estruturas divididas em três partes: o domínio extracelular com repetições ricas em leucina - que é responsável por reconhecer PAMPs e DAMPs; o domínio transmembrana e o domínio intracelular - chamado de domínio Toll-interleucina 1 (TIR), que desempenha um papel crucial na transmissão de sinais para o interior da célula (Takeda e Akira, 2004). Esses sinais são importantes para iniciar respostas imunológicas e de defesa, contra infecções ou danos. Nas células, uma variedade de TLRs está presente, ocupando localizações distintas intracelulares.

O TLR4, um receptor de membrana celular, vem sendo amplamente estudado pelo desempenho crucial durante processos inflamatórios. Além de possuir a capacidade de reconhecer endotoxinas, como o LPS, TLR4 também reconhece proteínas como HMGB1 e família HSPs (Lucas e Maes, 2013). Importante notar, que essas proteínas podem estar presentes no ambiente extracelular, não apenas em situações de lesão, mas também em circunstâncias de estresse celular e tecidual, sem associação direta com microrganismos invasores. Portanto, sugerindo a possibilidade de ativar respostas inflamatórias e imunológicas mesmo na ausência de infecções microbianas.

O papel funcional do TLR4 está vinculado à sua capacidade de formar dímeros, permitindo um reconhecimento específico de ligantes. Ao ocorrer a ligação, a ativação do TLR4 desencadeia uma série de eventos de sinalização, recrutando adaptadores intracelulares contendo o domínio TIR, como MyD88, TIRAP, TRIF e TRAM, por exemplo (Arroyo et al., 2011). Esses adaptadores, por sua vez, iniciam vias de sinalização no citoplasma, ativando NF- $\kappa$ B e AP1, que orquestram a expressão de genes ligados à imunidade e inflamação. Dentre esses genes, há uma variedade de citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF $\alpha$  e várias interleucinas, como IL1 $\beta$ , IL6, IL10 por exemplo (Takeda e Akira, 2004; Arroyo et al., 2011). O processo de ativação do NF- $\kappa$ B, dependente do adaptador TRIF, é conhecido como a "fase tardia" de ativação, contrastando com a ativação mais rápida do TLR4 através do adaptador MyD88, denominada "fase inicial". Esta coordenação entre a sinalização "precoce" e "tardia" é uma característica essencial do TLR4, e pode explicar o desdobramento dos processos inflamatórios crônicos na neurodegeneração (Buchanan et al., 2010).

### 1.3.1 TLR4 - Neuroinflamação e DP

Em doenças neurodegenerativas, o TLR4 parece desempenhar um papel tanto neuroinflamatório, quanto neuroprotetor. Em condições saudáveis, a presença de TLR4 foi identificada em neurônios e células da glia (Tang et al., 2007; Tang et al., 2008) embora sua expressão seja mais proeminente na micróglia, em comparação com outros tipos de células no SNC (Lehnardt et al., 2003). Neurônios expressam diversas variantes de TLR, incluindo os TLRs de 1 a 9, os quais desempenham papéis na regulação da homeostase neuronal (van Noort et al., 2009). Entretanto, diversas pesquisas estão sendo conduzidas, visando elucidar especificamente, a expressão e a ativação do TLR4 em neurônios em condições patológicas do SNC. Amostras cerebrais humanas *post mortem* de pacientes com DP, demonstraram um aumento na expressão de TLR4 e MyD88 em várias regiões, com destaque para a SNpc e o putâmen (Shin et al., 2015; Kouli et al., 2019; Hughes et al., 2019). De mesmo modo, em outra análise de amostras de cérebros *post mortem* de pacientes com DP, os pesquisadores observaram um aumento simultâneo na expressão da IL1 $\beta$  e do TLR4 em regiões como o córtex frontal e a SNpc (Kouli et al., 2020).

Além das investigações em amostras humanas, estudos utilizando modelos animais, também tem contribuído para a compreensão do papel do TLR4 na DP. No entanto, o papel do TLR4 na DP é conflitante quando estes modelos foram usados. Por exemplo, um estudo demonstrou que camundongos TLR4 *knockout* após exposição a MPTP, mostraram um acúmulo maciço da proteína  $\alpha$ -sinucleína no mesencéfalo, em comparação com camundongos controle, também expostos a neurotoxina; um possível papel que o TLR4 pode ter na depuração da  $\alpha$ -sinucleína (Mariucci et al., 2018). Os resultados de um estudo onde o dano em camundongos TLR4 *knockout* e camundongos controle, foi através da neurotoxina Rotenona, indicaram que a ablação de TLR4 melhorou a perda neuronal na SNpc e os déficits motores gerados pela neurotoxina (Perez-Pardo et al., 2019). Em consonância, outro modelo animal utilizando MPTP, também demonstrou que a ausência de TLR4 está associada a uma menor depleção de dopamina, menos neurônios contendo  $\alpha$ -sinucleína, e redução das alterações de neuroinflamação típicas da DP (Campolo et al., 2019). Entretanto, camundongos TLR4 *knockout* quando comparados aos camundongos controle também expostos ao MPTP, exibiram maior propensão à neurodegeneração dopaminérgica induzida pela neurotoxina, indicando que o TLR4 pode exercer um papel protetor quando ativo (Conte et al., 2017).

Em uma análise de dados transcriptômicos do cérebro humano, de todas as regiões do cérebro analisadas, a SNpc mostrou os mais altos níveis de expressão de TLR4. Neste mesmo estudo, concentrações fisiológicas de oligômeros de  $\alpha$ -sinucleína sensibilizaram a produção de

citocinas pró-inflamatórias, EROs, morte celular em culturas neuronais primárias, que foram significativamente reduzidos por antagonistas do TLR4 (Hughes et al., 2019). Além disso, em nosso grupo de pesquisa, os pesquisadores conseguiram demonstrar que a ablação de TLR4 (via *knockout*) impediu a denervação dopaminérgica induzida por 6-OHDA e a microgliose na SNpc, seletivamente em camundongos fêmeas (Somensi et al., 2021). Em conjunto, esses resultados mostram o TLR4 como um alvo terapêutico promissor para os sintomas motores e não motores da doença, neutralizando os processos neuroinflamatórios e neurodegenerativos.

Em resumo, propõe-se que o TLR4 tenha efeitos tanto neuroprotetores, quanto prejudiciais na patogênese da DP, dependendo do momento investigado da doença. Nas fases agudas da DP, pode contribuir para o reconhecimento da  $\alpha$ -sinucleína, levando à depuração da proteína e atraso da progressão da doença. Por outro lado, nas fases crônicas da DP, a estimulação excessiva da produção de citocinas pró-inflamatórias mediadas por TLR4, pode resultar em neuroinflamação, resultando na progressão da neurodegeneração. Portanto, os estudos com amostras humanas, modelos animais e *in vitro*, têm lançado luz sobre a complexa relação entre o TLR4 e a DP, porém estes resultados contrastantes destacam a importância de novos estudos, visando estabelecer o papel desempenhado pelo TLR4 na DP.

### 1.3.2 Inibição do TLR4 – TAK-242

TAK-242, foi originalmente descoberto como um inibidor da produção de mediadores inflamatórios na sepse, como óxido nítrico, IL6, IL1 $\beta$  e TNF $\alpha$  (Yamada et al., 2005). Em 2008, um grupo de pesquisadores descobriu que o agente era um inibidor seletivo da sinalização do TLR4, ligando-se ao domínio intracelular do receptor e inibindo a produção de vários mediadores inflamatórios, bem como a ativação de NF- $\kappa$ B mediada por TLR4 (Kawamoto et al., 2008). TAK-242 se liga seletivamente ao TLR4 e, posteriormente, interrompe a interação do TLR4 com as moléculas adaptadoras, inibindo assim a transdução do sinal do TLR4 e seus eventos de sinalização a jusante (Matsunaga et al., 2011). Devido à sua alta lipossolubilidade e baixo peso molecular, o TAK-242 tem a capacidade de passar pela BHE (Hua et al., 2015) e verificou-se que o inibidor é seguro em humanos no tratamento da sepse (Yang et al., 2018).

Pesquisas recentes vêm demonstrando os benefícios do bloqueio da sinalização de TLR4 a partir da utilização de TAK-242. Em um modelo com camundongos expostos ao LPS, TAK-242 foi capaz de suprimir a expressão de citocinas inflamatórias, como TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL6 e IL8, que estavam aumentadas após o dano por *P.gingivalis*-LPS no córtex dos animais. Além disso, a via de sinalização TLR4/CD14/IRAK1/p-p65-NF- $\kappa$ B foi ativada e efetivamente suprimida pelo

TAK-242, aliviando o quadro de neuroinflamação instaurado no modelo (Zhang et al., 2018). Em um modelo para DA, os camundongos transgênicos APP/PS1 possuíam alta expressão de TLR4, bem como maior expressão de micróglia M1 em comparação com camundongos controle. Além disso, a inibição do TLR4 melhorou a função neurológica, diminuiu o nível de Bax e citocinas inflamatórias, e causou uma redução nos níveis de marcadores M1 - iNOS e TNF $\alpha$  (Cui et al., 2020). Em conjunto, esses achados demonstram que a inibição do TLR4 pode fornecer neuroproteção para os modelos estudados. No entanto, mais pesquisas se tornam necessárias a fim de elucidar melhor os papéis da inibição de TLR4 com TAK-242, no cérebro, na DP.

#### 1.4 *CROSS-TALK* DE RECEPTORES: RAGE E TLR4

RAGE e TLRs são conhecidos como RRP, desempenhando papéis cruciais no reconhecimento de PAMPs e DAMPs. Pesquisas sugerem um compartilhamento de ligantes entre os receptores, incluindo: HMGB1, a família de proteínas S100, LPS, A $\beta$  (Ibrahim et al., 2013) e recentemente, a  $\alpha$ -sinucleína (Hughes et al., 2019; Long et al., 2022). RAGE e TLR4 são conhecidos por desencadear diversas vias de sinalização intracelular quando se ligam aos seus ligantes. Notavelmente, muitas dessas vias compartilham componentes *downstream*, o que sugere que uma cooperação entre esses receptores poderia resultar na amplificação das respostas inflamatórias mediadas por essas vias em comum (Ibrahim et al., 2013). Evidências recentes têm sugerido a existência de sinergismo e interdependência entre RAGE e TLR4 (Gąsiorowski et al., 2018). Até o momento, a literatura concentra-se, principalmente, nas vias de sinalização *downstream*, resultante da cooperação entre RAGE e TLRs.

A sinalização de TLRs envolve dois pontos-chaves para uma transdução de sinal mais eficiente: a necessidade de adaptadores intracelulares e de homodimerização ou heterodimerização, formando agregados proteicos do receptor (Vogel et al., 2003). De maneira similar, o RAGE demonstrou ter uma atividade aumentada quando ocorre a interação com outras moléculas, resultando na formação de homodímeros (Zong et al., 2010). Essa oligomerização pode expandir para mais de duas moléculas, criando uma ampla área de interação, favorável ao engajamento com proteínas de maior tamanho, como a HSP70 (Grunwald et al., 2016), que desempenha um papel vital na transdução de sinal intracelular (Somensi et al., 2017). Descobriu-se que os principais adaptadores de sinalização de TLR4, as proteínas MyD88 e TIRAP, interagem com um conhecido adaptador de RAGE, a proteína mDia1 (Lee e Kim, 2007; Sakaguchi et al., 2011). Essa estimulação conjunta dos receptores, é capaz de ativar AP-1 e NF- $\kappa$ B, que desempenham um papel fundamental na propagação da inflamação (Karin et al., 2001). Ainda,

considera-se que importantes estimuladores desses fatores de transcrição são: EROs mitocondriais, bem como os produzidos pela atividade da NADPH oxidase, sendo capazes de ativar inúmeras proteínas nestas vias convergentes (West et al., 2011; Piras et al., 2016).

Nesse cenário, torna-se evidente que tanto a estimulação do TLR4, quanto do RAGE, regula vias de sinalização compartilhadas. No caso dos TLRs, a sinalização pode ocorrer via MyD88, IRAK, TRAF e TIRAP para ativar o NF- $\kappa$ B, via Rac1 e PI3K, e via ERK1/2 e p38 MAPK. O RAGE, por sua vez, tem a capacidade de ativar Rac1 e CDC42, além do Ras, ERK1/2 e p38 MAPK; além disso, quando fosforilado, o RAGE também se liga às proteínas adaptadoras TIRAP e MyD88, iniciando cascatas de sinalização (Lee e Kim, 2007; Sakaguchi et al., 2011). Consequentemente, além do ciclo de *feedback* positivo que surge através da expressão do RAGE, a ativação do TLR4 também influencia sua própria expressão (Zhong et al., 2020). Esse mecanismo desencadeia uma resposta inflamatória intensa e duradoura, capaz de causar danos em células e tecidos, contribuindo para o desenvolvimento de doenças (Schmidt et al., 2001).

*Crosstalk* é uma direção importante para estudar a correlação entre diferentes vias de sinalização. Estudos recentes relataram que, quando RAGE e TLR4 foram ativados, ocorreu um fenômeno de interdependência entre os receptores, amplificando respostas inflamatórias. Quando os macrófagos derivados de medula óssea murina (BMDMs) foram estimulados com HMGB1, a ativação da sinalização MAPK levou ao aumento da expressão do RAGE na superfície celular. Ademais, a interrupção da ativação da MAPK induzida por HMGB1/RAGE inibiu a expressão do TLR4 na superfície celular. Além disso, o *knockout* do TLR4 nos BMDMs resultou na redução da expressão do RAGE, bem como, o *knockout* do RAGE resultou em uma diminuição na presença do TLR4 na membrana (Zhong et al., 2020). Porém, ainda não está claro o que medeia essa interdependência de expressão entre TLR4 e RAGE, e os mecanismos precisos dessa interação requerem uma exploração mais aprofundada.

Outro relevante estudo, mostrou que RAGE e TLR4 afetaram a expressão um do outro, durante o uso de LPS, e ativaram sinergicamente a via de sinalização MyD88/NF- $\kappa$ B, promovendo a liberação de citocinas pró-inflamatórias em macrófagos alveolares bovinos (BAMs), quando ativados simultaneamente. Outro ponto importante, é que a inibição do RAGE regulou os níveis de expressão de TLR4, e a inibição da TLR4 também regulou os níveis de expressão de RAGE. Além disso, TAK-242 e FPS-ZM1 reverteram a liberação de IL1 $\beta$ , IL6 e TNF $\alpha$  em BAMs. Indicando que o *crosstalk* RAGE e TLR4 desempenha um papel importante na ativação da via de sinalização inflamatória dos receptores (Longfei et al., 2023). De mesmo modo, estudos anteriores, também demonstraram que diferentes ligantes, como S100A8/A9 e LPS, ativaram RAGE e TLR4 juntos, regulando ainda mais a expressão de NF- $\kappa$ B, bem como a



liberação de citocinas pró-inflamatórias, podendo gerar um quadro de cronicidade (Paudel et al., 2020; Prantner et al., 2020).

Coletivamente, as pesquisas demonstram a capacidade da cooperação RAGE e TLR4 em perpetuar sua expressão, aumentando a possibilidade de ligação a seus ligantes na superfície celular (após tráfico extracelular) e consequente propagação da inflamação, devido a ativação sinérgica das vias de sinalização inflamatória a jusante. Contudo, várias lacunas persistem acerca deste tema, demandando investigações mais aprofundadas, especialmente em um contexto neuronal. Até o momento, a maioria das pesquisas se concentrou em macrófagos, deixando a cooperação entre RAGE e TLR4 no neurônio, relativamente menos explorado. No entanto, essa interação assume relevância significativa, considerando seu potencial como alvo terapêutico para abordagens na DP.

## 1.5 MODELOS EXPERIMENTAIS *IN VITRO* – DOENÇA DE PARKINSON

O avanço no desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes para a DP requer uma compreensão mais aprofundada dos mecanismos moleculares subjacentes à patologia. No contexto de estudos clínicos envolvendo pacientes, inúmeras limitações complicam a elucidação dessas questões. A heterogeneidade das amostras clínicas e a natureza gradual da progressão da doença *in vivo* representam desafios significativos. Além disso, questões éticas também surgem nesse contexto de pesquisa clínica.

Por outro lado, os modelos *in vitro* apresentam uma série de vantagens, principalmente devido ao ambiente altamente controlado em que podem ser manipulados. Esses modelos oferecem um meio mais rápido e eficaz de investigação em comparação com os modelos tradicionais *in vivo*. Portanto, tornando os resultados mais consistentes e replicáveis, sendo amplamente empregados para a pesquisa na área. Por exemplo, o modelo *in vitro* de neurotoxicidade que envolve a linhagem celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y desafiada com a neurotoxina 6-OHDA tem sido frequentemente utilizado em estudos relacionados à DP (Simola et al., 2007; Xie et al., 2010).

### 1.5.1 Linhagem celular – SH-SY5Y

A linhagem celular SH-SY5Y deriva do neuroblastoma humano e representa um subclone da linhagem SK-N-SH (Kovalevich e Langford, 2013). Essa linhagem tem sido amplamente utilizada em pesquisas de neurociência devido a várias vantagens intrínsecas. Isso inclui sua

notável capacidade de expansão celular, que ocorre de maneira simples e rápida, bem como o baixo custo associado à sua manutenção. Além disso, a linhagem SH-SY5Y tem a capacidade de se diferenciar em células semelhantes a neuronais quando exposta a agentes adequados (Forster et al., 2016).

Em sua fase proliferativa em cultura, as células SH-SY5Y exibem uma morfologia semelhante à de células epiteliais. No entanto, quando induzidas à diferenciação, essas células assumem uma forma estrelada, caracterizada por longas projeções neuríticas. A diferenciação das células SH-SY5Y é frequentemente induzida pelo AR, que atua suprimindo a divisão celular e promovendo a diferenciação catecolaminérgica. Esse processo de diferenciação resulta em um aumento do conteúdo de marcadores dopaminérgicos, como a tirosina hidroxilase (TH) e o transportador de dopamina (DAT) (Edsjö et al., 2007).

A diferenciação celular da linhagem SH-SY5Y é um passo crucial, pois permite a transição das células de um fenótipo semelhante ao de células epiteliais para um fenótipo com características neuronais. Essa capacidade de diferenciação, combinada com sua origem em células humanas, confere a essa linhagem uma relevância notável como modelo de estudo, aproximando-se das características de células neuronais humanas.

### **1.5.2 Neurotoxina – 6-OHDA**

A neurotoxina 6-OHDA é extensamente empregada em modelos tanto *in vivo* quanto *in vitro* para o estudo da DP (Simola et al., 2007). É uma análoga da dopamina, que causa degeneração específica dos neurônios da SN<sub>pc</sub>. A toxicidade da 6-OHDA está intrinsecamente ligada à modulação do estado redox celular (Fergner et al., 2001). Ao sofrer rápida oxidação no citoplasma, seus metabólitos auto-oxidativos se acumulam nas mitocôndrias, determinando a perda de permeabilidade da membrana mitocondrial, levando assim à geração de estresse oxidativo (Guo et al., 2018).

Adicionalmente, as EROs geradas pela ação da 6-OHDA podem interagir com proteínas de membrana, incluindo o RAGE e o TLR4, exacerbando suas funções biológicas prejudiciais às células (Blum et al., 2000; Simola et al., 2007; Elfawy et al., 2019). Além disso, níveis elevados de EROs têm a capacidade de induzir neuroinflamação e apoptose celular. Visto que o comprometimento mitocondrial provoca a liberação do citocromo c e outras proteínas pró-apoptóticas que ativam efetores a jusante, como a caspase-3, que causa morte celular neuronal (Redza-Dutordoir et al., 2016).

## 2. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA

Considerando: (i) a progressão de doenças neurodegenerativas, especificamente a DP, estar associada com modulações pró-inflamatórias resultando na perda progressiva de neurônios dopaminérgicos; (ii) a crescente associação do RAGE e de TLR4 com processos neuroinflamatórios e neurodegeneração; (iii) o potencial terapêutico do bloqueio dos receptores através de seus inibidores farmacológicos frente à modelos neuroinflamatórios *in vivo*; e (iv) a falta de estudos que abordem os mecanismos pelos quais estes receptores atuam em um contexto neuronal, na DP; este trabalho tem como objetivo *investigar a associação de RAGE e TLR4 com o dano neuronal dopaminérgico, em um modelo celular da DP, auxiliando na compreensão do papel dos receptores em processos neurodegenerativos.*

Como objetivos específicos, este trabalho visa:

- i. Caracterizar a diferenciação neuronal dopaminérgica das células, a partir da análise de marcadores neuronais e estabelecer o modelo de toxicidade induzida por 6-OHDA em uma curva de concentração da neurotoxina.
- ii. Investigar o perfil de resposta celular ao dano dopaminérgico causado pela 6-OHDA, através da análise da expressão dos receptores RAGE e TLR4, de parâmetros neuroinflamatórios, dos danos mitocondriais e da produção de superóxidos mitocondriais.
- iii. Avaliar se o bloqueio do RAGE, com FPS-ZM1, e o bloqueio do TLR4, com TAK-242, atenuam os danos causados pela 6-OHDA no modelo celular.

## **PARTE II**

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 CULTURA DE CÉLULAS

A linhagem celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y obtida da *European Collection of Authenticated Cell Cultures* (ECACC) foi utilizada em todos os experimentos. As células foram cultivadas em meio DMEM/F12 (Sigma-Aldrich) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) inativado, juntamente com a adição de Penicilina 100 Unidades/ml e Estreptomicina 100 µg/ml e, mantidas em incubadora com temperatura a 37°C e CO<sub>2</sub> à 5%. As passagens celulares foram realizadas quando atingida cerca de 90% de confluência, e as trocas de meio foram realizadas a cada dois dias. Células entre 17 e 25 passagens foram utilizadas para todos os experimentos.

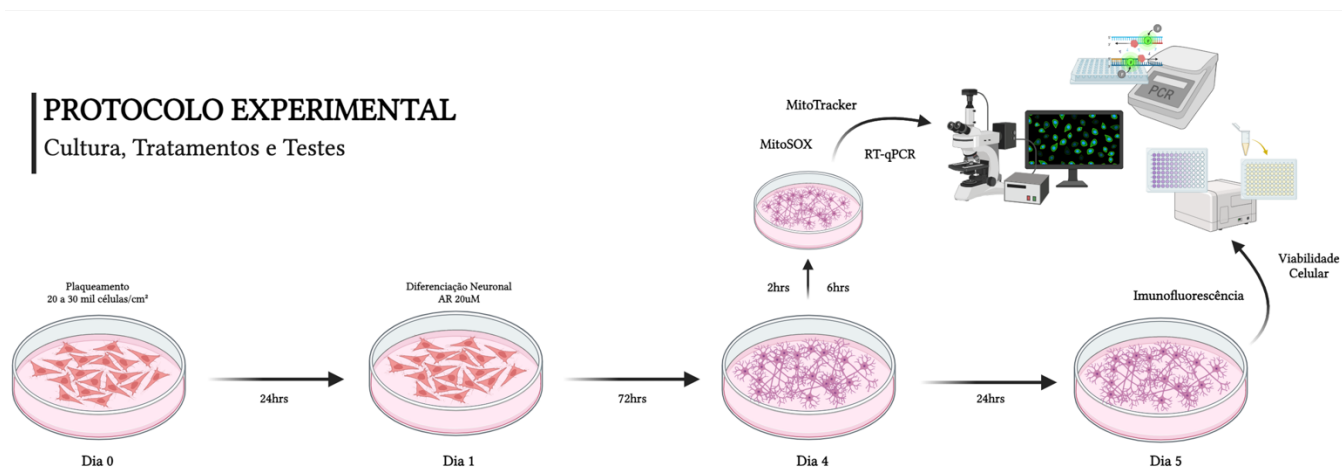
#### 3.2 DIFERENCIAÇÃO NEURONAL E TRATAMENTOS

Preparo e administração do AR: a solução de estoque de AR foi preparada à uma concentração de 20nM. Para isso, o composto foi dissolvido no solvente orgânico dimetilsulfóxido (DMSO) e posteriormente diluído no meio de cultura celular, a fim de se obter a concentração final desejada de 20µM. Para o protocolo de diferenciação neuronal, as etapas foram seguidas conforme previamente detalhado na literatura (Lopes et al, 2010; Kunzler et al, 2017), com modificações pontuais a fim de caracterizar a diferenciação rápida das células. As células foram semeadas em DMEM/F12 10% SFB, em placas de 12, 24 ou 48 poços, com uma densidade celular de 20 a 30 mil células/cm<sup>2</sup>. Após um período de 24 horas, ocorreu a substituição do meio de cultura pelo DMEM/F12 1% de SFB, juntamente com a adição de AR 20µM, com a finalidade de induzir a diferenciação rápida ao longo de 3 dias consecutivos.

Preparo e administração do FPS-ZM1 e de TAK-242: foram preparadas soluções estoque de FPS-ZM1 (Sigma-Aldrich) e TAK-242 (Sigma-Aldrich) nas concentrações de 1ng/mL dissolvendo os compostos em DMSO. No dia 4, os compostos foram diluídos no meio de cultura, a fim de se atingir a concentração final desejada de 1µg/mL. Os tratamentos seguiram os tempos de incubação prévia (para ambos os inibidores) por 1 hora, seguido da adição da 6-OHDA por 2, 6 e 24 horas.

Preparo e administração da 6-OHDA: 6-OHDA (Sigma-Aldrich) foi pesada e preparada no momento de sua utilização, devido a grande instabilidade e auto-oxidação rápida do composto. O preparo da solução de trabalho consiste na dissolução de 10mg de 6-OHDA em uma solução salina (NaCl 0,9%) contendo 0,01% de ácido ascórbico. Após, a neurotoxina foi diluída no meio de cultura celular, nas concentrações finais de 50 e 100 $\mu$ M, nos tempos específicos para cada experimento. A solução salina contendo ácido ascórbico 0,01%, foi utilizada como veículo em todos os procedimentos, sendo diluída ao meio de cultura no momento dos experimentos.

Todos os reagentes utilizados foram filtrados antes da administração na cultura celular, a fim de evitar possíveis contaminações. Além disso, foram administrados em meio DMEM/F12 1% SFB.



**Figura 3. Protocolo experimental para os tratamentos com 6-OHDA, FPS-ZM1, TAK-242 e diferenciação neuronal induzida por ácido retinóico na linhagem celular SH-SY5Y.** No dia 0, as células proliferativas foram plaqueadas em DMEM/F12 10% SFB por 24 horas. No dia 1, o protocolo de diferenciação ocorreu com a substituição do meio 10% por DMEM/F12 1% SFB + adição de 20uM de AR, por 72 horas consecutivas. No dia 4, o meio foi substituído por DMEM/F12 1% SFB novo + adição de 1 $\mu$ g/mL dos inibidores, FPS-ZM1 e TAK-242, em um pré-tratamento de 1 hora, seguido da adição de 100 e/ou 50uM de 6OHDA, pelo tempo de 2, 6 ou 24 horas a depender do teste. Após respectivos tempos de tratamentos, as células foram preparadas para os experimentos.

### 3.3 TESTES DE VIABILIDADE CELULAR

Para a análise de viabilidade e citotoxicidade celular foram utilizados os métodos de incorporação de sulforrodamina B (SRB), a redução do brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio (MTT) e o ensaio da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) no meio de incubação. As análises foram realizadas após 24 horas de tratamento.

O ensaio da incorporação de SRB consiste na ligação de grande afinidade da SRB a componentes proteicos de células aderentes quando em meio ácido. Para isso, as células foram

fixadas com uma solução de 10% de ácido tricloroacético (TCA), secas a temperatura ambiente e incubadas com uma solução de SRB 0,4% em ácido acético por 30 minutos à temperatura ambiente. O excesso foi removido por 3 lavagens de ácido acético e o corante aderido às células foi ressolubilizado em uma solução de 10 mM de Tris base. O resultado foi observado por espectrofotometria no comprimento de onda de 515 nm e expressos em porcentagem (%) do controle (Vichai e Kirtikara, 2006).

O ensaio da quantificação da enzima LDH - responsável pela conversão de piruvato a lactato com a oxidação de NADH, quando liberada no meio extracelular por lise da membrana celular (Korzeniewski e Callewaert, 1983; Decker e Lohmann-Matthes, 1988); foi realizado através da remoção do sobrenadante das placas de cultura, que foi misturado aos reagentes do kit comercial LDH Liquiform (Labtest SA) conforme indicações do fabricante. A atividade cinética do decaimento de NADH foi mensurada por espectrofotometria no comprimento de onda de 340nm e o resultado expresso em porcentagem (%) do controle.

Para o ensaio da redução do brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio (MTT), um sal amarelo solúvel em água, o efeito da atividade metabólica celular pelo efeito de redutases mitocondriais, forma cristais de formazan de coloração azul ou roxa que são insolúveis em água, a partir dessa coloração a quantificação da viabilidade das células é feita (Kumar P, 2018). Para isso, as células foram incubadas com MTT a uma concentração final de 0,5 mg/mL por 1 hora a 37 °C, sendo a reação encerrada pela adição de 200µL de DMSO a cada poço. A quantidade de produto MTT formazan foi determinada medindo a absorbância à 560 nm usando um leitor de microplaca e o resultado expresso em porcentagem (%) do controle.

### 3.4 IMUNOFLUORESCÊNCIA

Após 24 horas de tratamentos, as células foram fixadas com solução de paraformaldeído 4% durante 20 min, lavadas com PBS e incubadas com 0,2% Triton-PBS contendo 5% de albumina, durante 1 hora a temperatura ambiente. Em seguida foi realizada incubação do anticorpo primário contra  $\beta$ III-tubulina (480011, Invitrogen), preparado em 0,2% Triton-PBS 1% albumina durante 15 horas a 4°C de acordo com as instruções do fabricante. Após três lavagens com tampão, as células foram incubadas com o anticorpo secundário conjugado a Alexa Fluor® durante 1 hora a temperatura ambiente. Após três lavagens foi realizada incubação com solução de DAPI durante 5 minutos, para marcação nuclear. As imagens foram obtidas com microscópio de fluorescência EVOS® FLoid® Cell Imaging Station (Life Technologies) e analisadas utilizando o software ImageJ, para posterior medição quantitativa da intensidade de fluorescência.

### 3.5 RT-qPCR

Após 6 horas de tratamentos, as células foram lavadas com PBS e o RNA total foi isolado seguindo o protocolo conforme instruções do reagente TRIzol® (Invitrogen). A síntese de cDNA foi realizada com kit comercial High-Capacity cDNA Reverse Transcription (ThermoFisher Scientific) e após, as reações de PCR em tempo real foram feitas no termociclador StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems), utilizando 150ng de cDNA, 100nM, 200nM e 500nM a depender do primer e kit comercial Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Para a amplificação do cDNA de *AGER* foram utilizados os *primers* direto 5'GTGAAGGAACAGACCAGGAG3' e reverso 5'GAAGGTACAGGAGAAGGTGG3'; para *TLR4* foram utilizados os *primers* direto 5'TCTACAAAATCCCCGAAACC3' e reverso 5'GCTCTGATATGCCCATCTTC3'; para *TNF $\alpha$*  foram utilizados os *primers* direto 5'GATCCCTGACATCTGGAATCTG3' e reverso 5'GAAACATCTGGAGAGAGAGGAAGG3'; para *IL6* foram utilizados os *primers* direto 5'AATGAGGAGACTTGCCTGGTG3' e reverso 5'GCAGGAACTGGATCAGGACTTT3'; para *TH* foram utilizados os *primers* direto 5'CACCCAGTATATCCGCCAC3' e reverso 5'CCACCGTGAACCAGTACAC3'. O gene endógeno utilizado foi o *GNB2L*, amplificado com os *primers* direto 5' GCTTGCAGTTAGCCAGGTTTC e reverso 5' GAGTGTGGCCTTCTCCTCTG. Os resultados foram expressos em relação ao gene constitutivo normalizador ( $\Delta$ Ct) e ao grupo controle ( $\Delta\Delta$ Ct).

### 3.6 MitoSOX Red e MitoTracker Red FM

De acordo com as informações do fabricante, MitoSOX é capaz de rastrear níveis intracelulares de superóxido mitocondrial e produzir fluorescência vermelha em células vivas (não fixadas). Em resumo, no dia 4 após 2 horas de tratamentos, as células foram incubadas com MitoSOX Red (500nM) por 15 minutos, a 37°C, administrado em tampão HBSS aquecido. Após, 2 lavagens foram realizadas e as imagens foram obtidas com microscópio de fluorescência EVOS® FLoid® *Cell Imaging Station* (Life Technologies) e analisadas utilizando o software ImageJ, para posterior medição quantitativa da intensidade de fluorescência.

A marcação do Mitotracker Red FM depende do potencial da membrana e segundo o fabricante, a série FM é baseada em carbocianeto, podendo atravessar pela membrana celular e, portanto, podendo ser usada para marcação de mitocôndrias viáveis. Idem ao MitoSOX, no dia 4 após 2 horas de tratamentos, as células foram incubadas com MitoTracker Red (200 nM) por 15



minutos, a 37°C, administrado em tampão HBSS aquecido. Após, 2 lavagens foram realizadas e as imagens foram obtidas com microscópio de fluorescência EVOS® FLoid® *Cell Imaging Station* (Life Technologies) e analisadas utilizando o software ImageJ, para posterior medição quantitativa da intensidade de fluorescência.

### 3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 8, e os testes estatísticos foram determinados por ANOVA de uma via seguido pelo teste post-hoc de Tukey para comparação de grupos múltiplos ou teste post-hoc de Bonferroni para comparar grupos selecionados quando aplicável. Um valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo. Os resultados foram expressos como valores médios  $\pm$  desvio padrão (DP).

## 4. RESULTADOS

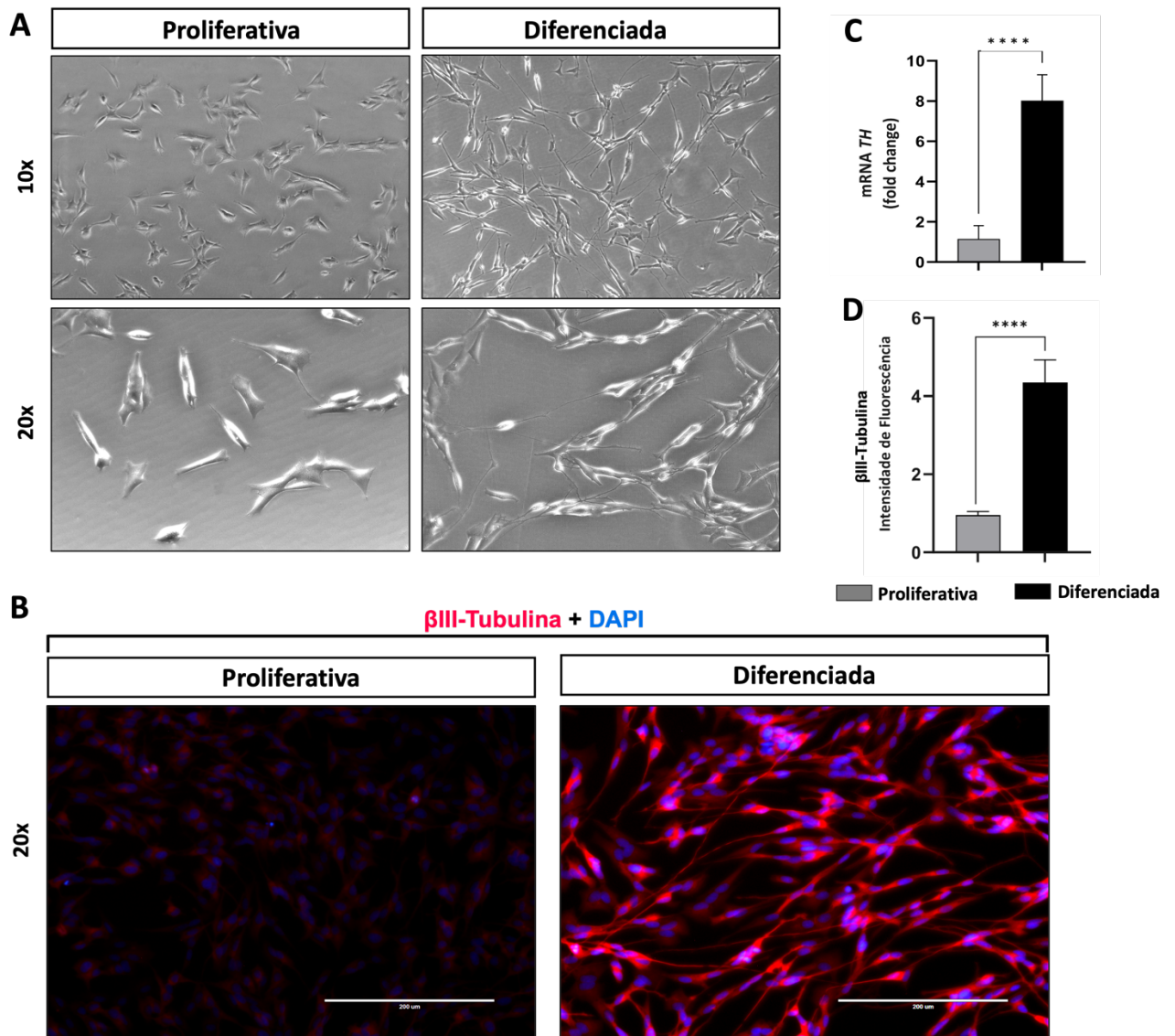
### 4.1 MODELO *IN VITRO* PARA DOENÇA DE PARKINSON

#### 4.1.1 Diferenciação neuronal dopaminérgica

Para demonstrar que as células SH-SY5Y podem ser diferenciadas para um fenótipo semelhante ao neuronal com a combinação da redução do soro bovino fetal (SFB) e tratamento com 20 $\mu$ M de AR, em um protocolo de diferenciação rápida de 3 dias, analisamos: alterações na morfologia celular, expressão do mRNA de TH – considerada um marcador da diferenciação celular SH-SY5Y em um fenótipo dopaminérgico, bem como a análise imunocitoquímica para a proteína  $\beta$ III-Tubulina – considerada um marcador neuronal específico.

Após a indução da diferenciação rápida das células, os neuritos se alongaram visivelmente, e houve um aumento da expansão celular, em comparação com as células proliferativas, que pode ser observado por meio de microscopia de contraste de fase (Figura 4A direita). As células proliferativas apresentaram morfologia típica da linhagem SH-SY5Y, que se assemelha à de células epiteliais (Figura 4A esquerda).

Além disso, as células mostraram aumento na expressão de marcadores neuronais. A marcação de  $\beta$ III-Tubulina, mostrou um aumento visível no citoplasma e nos neuritos após a diferenciação (Figura 4B), obtendo significativamente mais intensidade de fluorescência nas células diferenciadas em comparação com as células proliferativas (Figura 4D). Por fim, a expressão de *TH* mostrou um aumento significativo nas células diferenciadas em comparação com as células proliferativas (Figura 4C), confirmando um fenótipo dopaminérgico adquirido após o protocolo de diferenciação rápida.

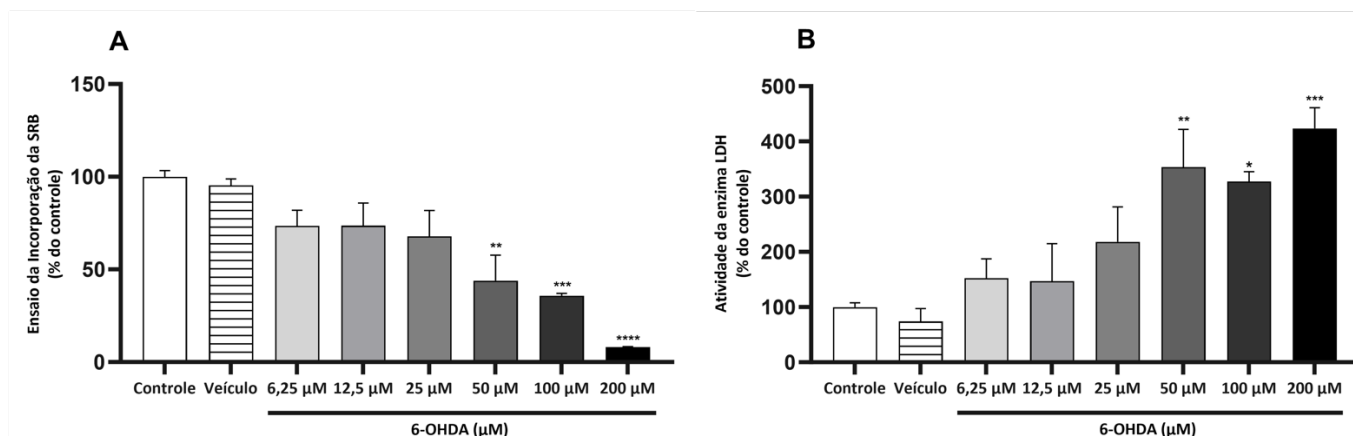


**Figura 4. Diferenciação neuronal mediada por ácido retinóico na linhagem SH-SY5Y.** **A** Morfologia das células no seu estado proliferativo (esquerda) e diferenciado (direita), após o protocolo de diferenciação rápida com AR 20 $\mu$ M, registrada por meio do uso de microscopia de contraste de fase. **B** Microscopia de imunofluorescência das células no dia 3 da diferenciação com AR, comparadas com as células proliferativas do dia 1, marcadas contra  $\beta$ III-tubulina (em vermelho) e com o núcleo corado com DAPI (em azul). **C** Expressão de mRNA (2- $\Delta\Delta$ Ct) do gene TH, nas células no estado proliferativo (em cinza) e diferenciado (em preto). O gene GNB2L foi utilizado como controle interno e os resultados são relativos à média da expressão nas células proliferativas. **D** Intensidade de fluorescência da proteína  $\beta$ III-Tubulina, nas células no estado proliferativo (em cinza) e diferenciado (em preto). As células proliferativas foram fotografadas e colhidas no Dia 1 do Protocolo Experimental, ou seja, 24 horas após o plaqueamento com DMEM/F12 10% SFB mantendo seu estado proliferativo. Barras indicam a média  $\pm$ DP de três experimentos independentes analisados por ANOVA de uma via com post-hoc de Tukey. \*\*\*\* indica  $p < 0,0001$ .

#### 4.1.2 Curva de sensibilidade à neurotoxina – 6-OHDA

A curva de dano da 6-OHDA foi realizada utilizando as concentrações de 6,25 a 200 $\mu$ M por 24 horas, nas células SH-SY5Y sob o protocolo de diferenciação rápida previamente caracterizado (Figura 5). Dessa forma, foi possível observar a sensibilidade e a relação dose-dependente do

modelo exposto à neurotoxina por meio do ensaio da incorporação de SRB (Figuras 5A), e da atividade da enzima LDH (Figuras 5B). Em 24 horas, em ambos os testes, as doses de 50, 100 e 200 $\mu$ M mostraram níveis altos de toxicidade celular, enquanto as concentrações mais baixas de 6,25, 12,5 e 25 $\mu$ M não obtiveram diferença estatística no modelo. Diante desses resultados, as doses escolhidas para todos os tratamentos seguintes foram 100 $\mu$ M e 50 $\mu$ M de 6-OHDA.

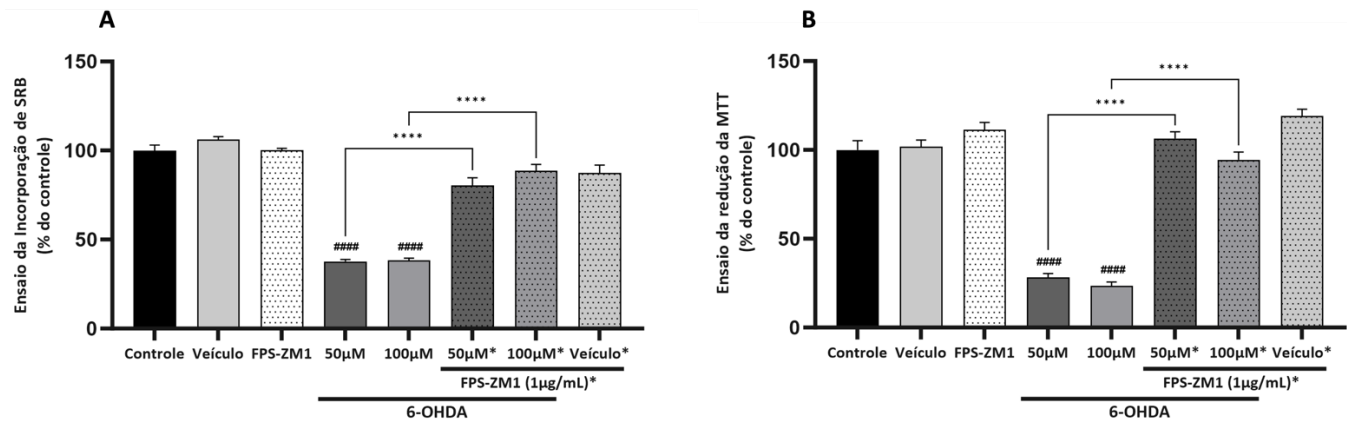


**Figura 5. Curva de toxicidade da 6-OHDA nas células SH-SY5Y diferenciadas.** A curva de dano da 6-OHDA foi realizada com concentrações de 6,25 a 200  $\mu$ M por 24 horas (A e B) nas células SH-SY5Y diferenciadas. A viabilidade celular foi verificada pelos ensaios da incorporação de SRB (A) e atividade da enzima LDH (B). Os dados são apresentados pela média  $\pm$  DP. O grupo veículo não apresentou significância estatística com o grupo controle. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  em comparação ao grupo controle.

#### 4.2 O PAPEL DA INIBIÇÃO DO RAGE NA VIABILIDADE NEURONAL *IN VITRO*

Visando compreender se a inibição do RAGE possui um papel protetor em um contexto neuronal, um tratamento com FPS-ZM1 foi realizado previamente a adição de 50 e 100 $\mu$ M de 6-OHDA, por 24 horas. A viabilidade das células, nos diferentes grupos, foi determinada pelo ensaio da redução da MTT e da incorporação da SRB, e foi representada através da porcentagem de viabilidade do grupo controle. Os dados são baseados em 3 experimentos independentes.

Após 24 horas, em ambos os ensaios, a viabilidade das células foi significativamente reduzida, tanto com a adição de 100 $\mu$ M, quanto com 50 $\mu$ M de 6-OHDA. O pré-tratamento por 1 hora com o antagonista, demonstrou efeitos positivos na viabilidade celular, tanto no ensaio da SRB, quanto da MTT (Figura 9A e B), sendo capaz de atenuar significativamente o dano realizado pela 6-OHDA, mostrando um possível papel neuroprotetor do FPS-ZM1, no modelo *in vitro* aqui empregado.



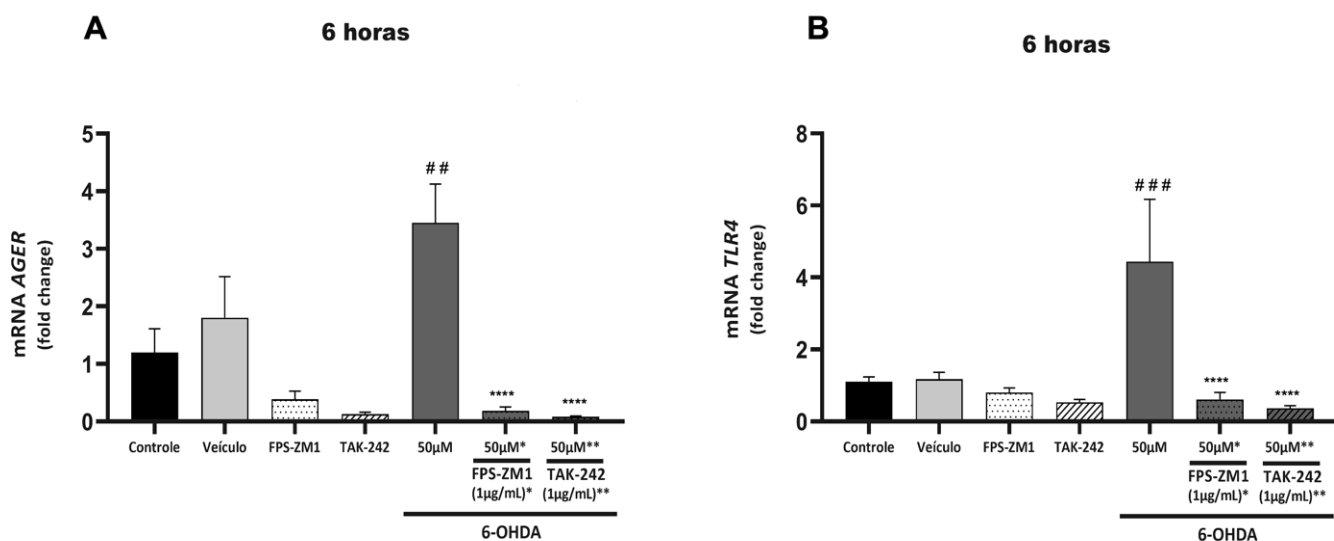
**Figura 9. Redução da citotoxicidade da 6-OHDA frente à inibição do RAGE: pré-tratamento com o antagonista, FPS-ZM1.** As células diferenciadas foram pré-tratadas com o FPS-ZM1\* na concentração de 1µg/µL por 1 hora, previamente ao dano realizado pela 6-OHDA nas concentrações de 50µM e 100 µM por 24 horas (A e B). (A) Ensaio da redução da MTT. (B) Ensaio da incorporação de SRB. Os dados são apresentados pela média ± DP. O grupo veículo não apresentou significância estatística com o grupo controle. #####p < 0,0001 em comparação ao grupo controle; \*\*\*\*p < 0,0001 em comparação ao respectivo grupo 6-OHDA.

#### 4.3 MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DOS RECEPTORES: *AGER* E *TLR4*

A fim de compreender se a 6-OHDA poderia modular a expressão do RAGE e do TLR4, a indução da expressão dos receptores foi avaliada após o tratamento com 6-OHDA, bem como após o tratamento com FPS-ZM1 e TAK-242, previamente à adição da 6-OHDA (Figura 6).

*AGER* e *TLR4* demonstraram aumento de expressão diante do dano causado pelo tratamento com 50µM de 6-OHDA; *AGER* (Figura 6A) foi expresso cerca de aproximadamente 3,5 vezes mais diante do tratamento quando comparado ao grupo controle, já a expressão de *TLR4* (Figura 6B) sofreu um aumento de aproximadamente 4,2 vezes diante do dano. Ainda, de acordo com a Figura 6A e 6B, no grupo FPS-ZM1 + 6-OHDA, não apenas o nível de expressão de *RAGE* reduziu drasticamente, mas o nível de expressão de *TLR4* também diminuiu significativamente. Da mesma forma, no grupo TAK-242 + 6-OHDA, os níveis de expressão de *TLR4* e *RAGE* diminuíram significativamente.

Em suma, os níveis de mRNA de RAGE diminuíram quando a expressão de TLR4 foi inibida com TAK-242, e os níveis de mRNA de TLR4 diminuíram quando a expressão de RAGE foi inibida com FPS-ZM1, sugerindo uma possível interdependência entre os receptores, em um contexto neuronal.



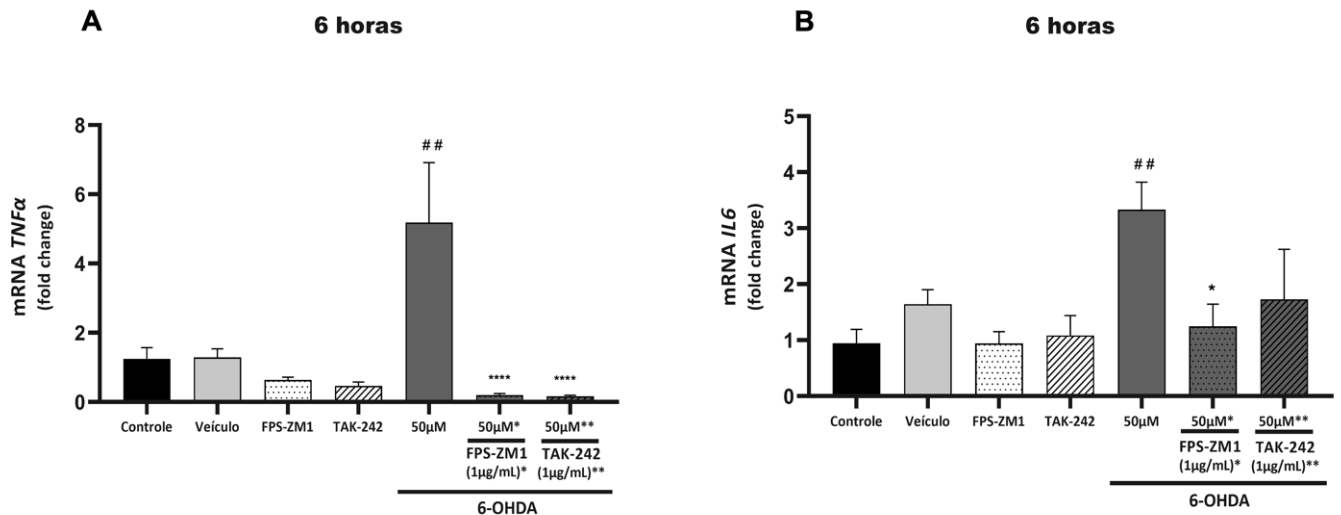
**Figura 6.** *AGER* e *TLR4* tem expressão aumentada em resposta a 6-OHDA, e seus inibidores, FPS-ZM1 e TAK-242 previnem esse aumento de maneira interdependente. RT-PCR quantitativo de *AGER* (A), e de *TLR4* (B), expresso em termos de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Valores de expressão normalizados por *GNB2L*, relativos ao grupo controle do respectivo tempo de tratamento. O grupo veículo não apresentou significância estatística com o grupo controle.  $##p < 0,01$ ;  $###p < 0,001$ ; em comparação ao grupo controle.  $****p < 0,0001$  em comparação ao respectivo grupo 6-OHDA.

#### 4.4 MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PARÂMETROS PRÓ-INFLAMATÓRIOS

Sobre o perfil de resposta causado pelo dano dopaminérgico às células, a modulação da expressão dos genes que codificam para as citocinas pró-inflamatórias *IL6* e *TNF $\alpha$* , foi avaliada após a administração da 6-OHDA. Além disso, os mesmos genes foram avaliados após o tratamento com FPS-ZM1 e TAK-242, previamente à adição da 6-OHDA, visando elucidar o perfil de resposta dos receptores frente ao dano dopaminérgico.

Os dados mostram que a exposição das células à 50µM de 6-OHDA, aumentou significativamente a expressão de *TNF $\alpha$*  (Figura 7A) quanto de *IL6* (Figura 7B) em comparação ao grupo controle. O pré-tratamento com os inibidores, foi capaz de diminuir significativamente os níveis de mRNA de *TNF $\alpha$* , nos grupos FPS-ZM1 + 6-OHDA e TAK-242 + 6-OHDA. Porém, no caso dos níveis de mRNA de *IL6*, apenas o grupo FPS-ZM1 + 6-OHDA apresentou diminuição em relação ao grupo 6-OHDA.

Os resultados indicam que a modulação da expressão de *TNF $\alpha$* , nas células expostas à 6-OHDA, foi afetada tanto pela inibição do RAGE, quanto pela inibição do TLR4. Entretanto, a modulação da expressão de *IL6*, nas células expostas à 6-OHDA, foi afetada apenas pela inibição do RAGE.



**Figura 7. Indução da expressão de parâmetros inflamatórios frente ao dano com 6-OHDA, e reversão através da administração de FPS- ZM1 e TAK-242.** RT-PCR quantitativo dos parâmetros inflamatórios *TNFα* (A) e *IL6* (B), expresso em termos de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Valores de expressão normalizados por *GNB2L*, relativos ao grupo controle do respectivo tempo de tratamento. O grupo veículo não apresentou significância estatística com o grupo controle.; ## $p < 0,01$ ; ##### $p < 0,0001$  em comparação ao grupo controle. \* $p < 0,05$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$  em comparação ao respectivo grupo 6-OHDA.

#### 4.5 PAPEL DOS RECEPTORES FRENTE A ALTERAÇÕES MITOCONDRIAIS

Em seguida, investigamos o papel dos receptores RAGE e TLR4, nos principais mecanismos de toxicidade da 6-OHDA: dano mitocondrial e a produção excessiva de superóxidos nas mitocôndrias. Na figura 8 (A – H), a exposição das células à 50μM de 6-OHDA, por 2 horas, induziu um acúmulo intracelular de superóxidos mitocondriais 15 vezes maior quando comparado ao controle, que pode ser evidenciado pela análise da intensidade de fluorescência do corante MitoSOX Red, um corante indicador de superóxidos que pode reconhecer, especificamente, superóxidos mitocondriais e produzir fluorescência vermelha em células vivas. Além disso, o pré-tratamento com FPS-ZM1 e TAK-242, neutralizou significativamente a geração de superóxidos mitocondriais que foi induzida por 6-OHDA.

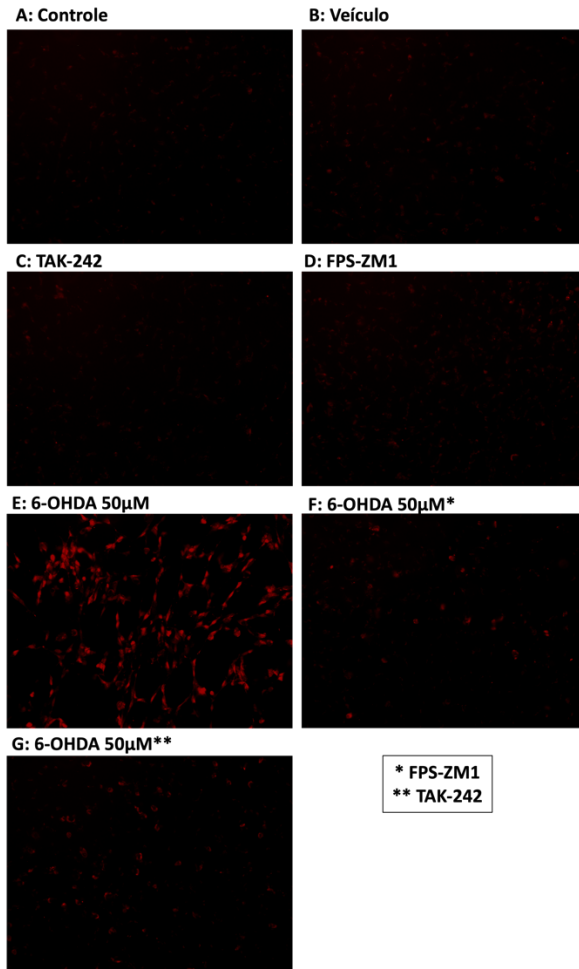
Na figura 8 (I – P), visando avaliar o efeito da 6-OHDA sobre o conteúdo mitocondrial funcional das células, foi utilizada a sonda MitoTracker Red FM, que se acumula nas mitocôndrias com potencial de membrana viável. As células que foram expostas à 50μM de 6-OHDA, por 2 horas, apresentaram uma pequena redução significativa da intensidade do sinal do MitoTracker em comparação com o controle. Ainda, os grupos que receberam o pré-tratamento com FPS-ZM1 e TAK-242, em conjunto à 50μM de 6-OHDA, também mostraram uma pequena redução na viabilidade mitocondrial em comparação ao controle.

Além disso, a razão entre MitoSOX e MitoTracker (Figura 8Q), que reflete a produção de

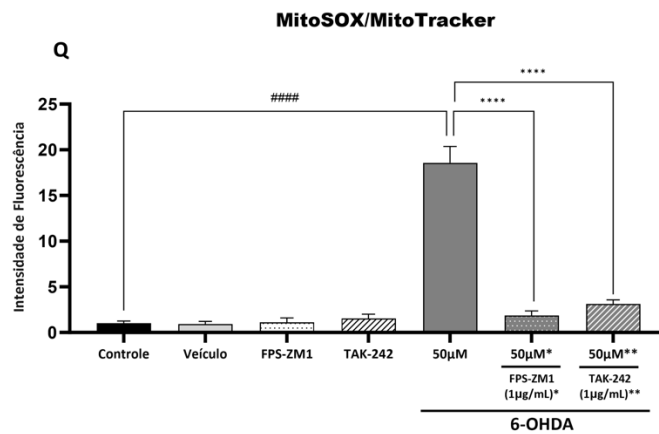
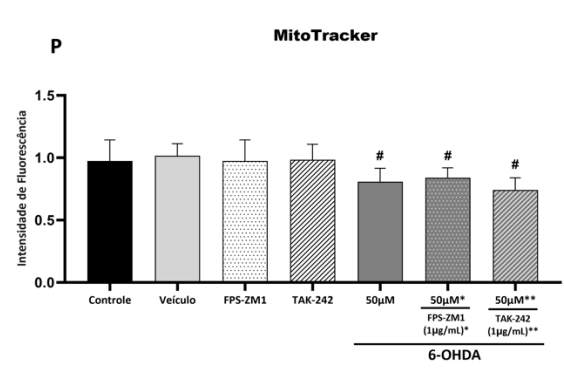
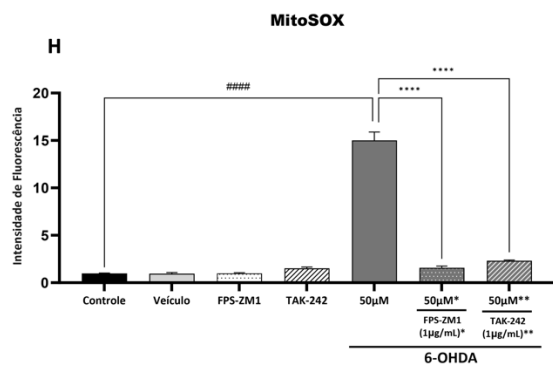
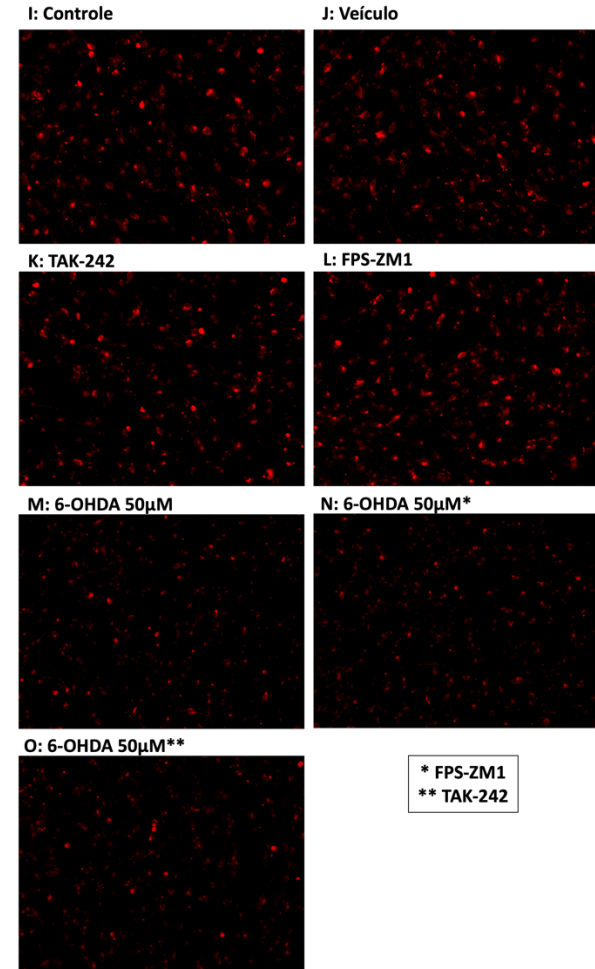
superóxidos por mitocôndrias viáveis nas células, confirmou o aumento expressivo de superóxidos mitocondriais no grupo 50uM de 6-OHDA, que pode ser prevenido pelo pré-tratamento com FPS-ZM1 e TAK-242. Esses resultados indicam que a 6-OHDA prejudica a função mitocondrial das células neuronais, produzindo altas taxas de superóxidos nas mitocôndrias. Entretanto, esse mecanismo de toxicidade clássico, pode ser prevenido pela inibição dos receptores no modelo estudado, sugerindo que RAGE e TLR4 ativam vias de sinalização que colaboram para o comprometimento do funcionamento mitocondrial.



## MitoSOX



## MitoTracker



**Figura 8. O bloqueio do RAGE e do TLR4, atuam sobre mecanismos clássicos de toxicidade da 6-OHDA.** Imagens de microscopia de células SH-SY5Y marcadas com MitoSOX Red após exposição a 6-OHDA e aos inibidores FPS-ZM1 e TAK-242 **(A-G)**. Imagens de microscopia de células SH-SY5Y marcadas com MitoTracker Red após exposição a 6-OHDA e aos inibidores FPS-ZM1 e TAK-242 **(I-O)**. Quantificação da intensidade de fluorescência do MitoSOX, utilizando o software ImageJ **(H)**. Quantificação da intensidade de fluorescência do MitoTracker, utilizando o software ImageJ **(P)**. Razão entre as fluorescências do MitoSOX e MitoTracker **(Q)**. O grupo veículo não apresentou significância estatística com o grupo controle. # $p < 0,05$ ; ##### $p < 0,0001$  em relação ao grupo controle. \*\*\*\* $p < 0,0001$  em relação ao respectivo grupo 6-OHDA.

### **PARTE III**

## 5. DISCUSSÃO

A DP é uma doença neurodegenerativa, tipicamente caracterizada pela perda progressiva de neurônios nigroestriatais dopaminérgicos (Hirsch et al., 2021). Evidências crescentes na pesquisa do RAGE e do TLR4, fornecem insights sobre o envolvimento desses receptores, em inúmeros processos moleculares que afetam a sobrevivência neuronal. Entretanto, até o momento, os mecanismos detalhados da contribuição do RAGE e TLR4 nesses processos, permanecem indefinidos. Relevantes investigações (Piras et al., 2016; Gasparotto et al., 2017; Gasparotto et al., 2018; Peixoto et al., 2023) têm indicado que a ativação do RAGE após a interação com seus ligantes contribui para o aumento da neuroinflamação, estresse oxidativo, degeneração neuronal e apoptose. Além disso, propõe-se que o TLR4 tenha efeitos tanto neuroprotetores, quanto prejudiciais na patogênese da DP (Conte et al., 2017; Hughes et al., 2019; Somensi et al., 2021). Aprofundar a compreensão dos papéis desempenhados pelo RAGE e TLR4 na neuroinflamação e neurodegeneração, estabelecendo conexões entre os mecanismos moleculares e as disfunções neuronais, representará um avanço significativo nos estudos sobre a DP. Assim, por meio dos dados obtidos nessa dissertação, poderá ser inicialmente compreendida a associação entre a ativação dos receptores e o dano neuronal induzido pela 6-OHDA, bem como a função de RAGE e TLR4 nos neurônios, em nos processos associados à neurodegeneração.

Para caracterizar o modelo celular empregado neste estudo, as células SH-SY5Y foram submetidas a um processo de diferenciação utilizando 20 $\mu$ M de AR durante um período de 3 dias. Durante esse processo, observou-se um notável alongamento dos neuritos e um aumento no tamanho das células em comparação com as células que estavam em estado de proliferação. Além disso, a marcação com  $\beta$ III-Tubulina, em conjunto com o aumento na expressão de TH, confirmou que as células adquiriram um fenótipo catecolaminérgico semelhante ao de neurônios adultos. Portanto, o protocolo de diferenciação rápida a partir do AR pode ser considerado, satisfatoriamente, um modelo para investigações de neurotoxicidade, de baixo custo e maior facilidade, em comparação a outros modelos de diferenciação de estudos anteriores (Xie et al., 2010; Simões et al., 2021). Uma forma amplamente utilizada para induzir a degeneração neuronal que ocorre na DP, é através da utilização da 6-OHDA, uma substância neurotóxica que afeta a sobrevivência dos neurônios dopaminérgicos (Simola et al., 2007; González et al., 2019). Neste estudo, após a diferenciação das células, às expusemos a diferentes concentrações de 6-OHDA por 24 horas. Em seguida, medimos a viabilidade celular para determinar o grau de dano neuronal causado pela 6-OHDA e com base nos resultados, selecionamos duas doses para os experimentos subsequentes: 100 $\mu$ M e 50 $\mu$ M.

FPS-ZM1 é um bloqueador multimodal do RAGE, sua ação se baseia no impedimento da interação entre o domínio extracelular do receptor com seus ligantes (Deane et al. em 2012). Pesquisas *in vivo*, têm ilustrado que a inibição do receptor pelo FPS-ZM1 (Shen et al., 2021; Peixoto et al., 2023), exerceu efeitos benéficos ao reverter processos de neuroinflamação e ao contribuir para a sobrevivência neuronal. Em 2017, os resultados do estudo de Gasparotto e colegas, indicaram que o FPS-ZM1 foi eficaz na prevenção da morte de neurônios dopaminérgicos que foi induzida pela ação da 6-OHDA, resultando na restauração dos níveis da proteína TH no cérebro dos animais. Em um esforço para aprofundar a compreensão das implicações do bloqueio do RAGE no modelo neuronal, em nosso trabalho, células neuronais foram expostas ao estresse induzido pela 6-OHDA, em combinação com pré-tratamento utilizando o antagonista FPS-ZM1, seguido por avaliações de viabilidade celular. Notavelmente, nossos resultados revelaram que o FPS-ZM1 foi capaz de proteger as células em duas concentrações distintas de 6-OHDA. Conseqüentemente, a inibição do RAGE se mostra um fator crucial na preservação da viabilidade neuronal, alinhando-se consistentemente com as evidências da literatura em modelos *in vivo*.

A neurotoxina 6-OHDA é um análogo da dopamina, altamente oxidável, que ao gerar uma alta quantidade de EROs, compromete o funcionamento mitocondrial, levando a danos ao DNA e apoptose celular. De forma consistente, estudos sugerem que além da neuroinflamação, o aumento de EROs e o comprometimento mitocondrial atuam na patogênese da DP (Guo et al., 2018). Além disso, em cenários caracterizados por concentrações elevadas de ligantes do RAGE (como no início do processo inflamatório), observa-se um expressivo aumento da expressão de RAGE no tecido cerebral, que acaba por elevar os níveis de EROs intracelulares, promovendo o desequilíbrio do estado redox celular (Piras et al., 2016). A partir disso, uma compreensão mais aprofundada sobre a modulação da expressão do RAGE e do TLR4 após a exposição a 6-OHDA em nosso modelo, foi analisada. Os genes *AGER* e *TLR4* demonstraram aumento de expressão diante do tratamento, mostrando que a neurotoxina é capaz de regular a expressão dos receptores. Portanto, nossos resultados corroboram com dados da literatura, onde o aumento da expressão dos receptores pode estar relacionado a natureza oxidativa da 6-OHDA.

Ao sofrer rápida oxidação no citoplasma e geração de espécies reativas, o mecanismo de dano da 6-OHDA pode induzir um aumento na formação de ligantes de RAGE e TLR4, ativando cascatas de sinalização intracelular, desencadeando um ciclo de *feedback* positivo do RAGE, perpetuando a expressão do receptor nas células (Rouhiainen et al., 2013; Gasparotto et al., 2017). Além disso, a ativação dessas vias pode induzir a expressão do TLR4 (Ibrahim et al., 2013; Gąsiorowski et al., 2018) que assim como RAGE, também consegue influenciar sua própria

expressão (Zhong et al., 2020). Ainda, a hiperativação das vias de sinalização do RAGE e do TLR4, e suas expressões elevadas, podem convergir com eventos deletérios, tais como a amplificação da sinalização inflamatória e influenciar na degeneração neuronal (Taguchi et al., 2000; Takuma et al., 2009; Chuah et al., 2013; Piras et al., 2016).

Com a finalidade de investigar o perfil de resposta das células ao dano dopaminérgico causado pela 6-OHDA, bem como a resposta diante do bloqueio dos receptores, a indução das citocinas pró-inflamatórias IL6 e TNF $\alpha$  foi avaliada. Em estudos onde camundongos foram expostos ao LPS, os animais apresentaram uma elevada expressão de citocinas inflamatórias diante do dano, como TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL6 e IL8, que foi prevenida pela administração de TAK-242 (Zhang et al., 2018). E, de mesmo modo, em ratos que foram injetados intracranialmente com 6-OHDA, o FPS-ZM1 também foi capaz de atenuar o aumento de TNF $\alpha$  e IL1 $\beta$  no LCR e no soro dos animais (Gasparotto et al., 2017). Portanto, em concordância com a literatura, o dano dopaminérgico causado pela 6-OHDA nas células, aumentou a expressão dos parâmetros inflamatórios, TNF $\alpha$  e de IL6, em comparação ao grupo controle. Satisfatoriamente, o pré-tratamento com os inibidores, FPS-ZM1 e TAK-242, atenuou o aumento das citocinas, indicando que a inibição do RAGE e do TLR4 pode exercer efeitos benéficos no neurônio, através da reversão do quadro neuroinflamatório instaurado pelo dano dopaminérgico.

O papel dos receptores RAGE e TLR4, também foi investigado nos principais mecanismos de toxicidade da 6-OHDA: dano mitocondrial e a produção excessiva de superóxido nas mitocôndrias. Nas células que foram expostas a 6-OHDA, foi possível verificar uma redução na quantidade de mitocôndrias marcadas com MitoTracker. Ainda, os grupos que receberam o pré-tratamento com os inibidores, também mostraram uma pequena redução na viabilidade mitocondrial em comparação com o controle. Esse marcador é sensível ao potencial transmembrana e reflete o funcionamento correto dos processos de transporte de elétrons e fosforilação oxidativa, essenciais para a função mitocondrial. Portanto, igualmente a literatura, este resultado mostra que a 6-OHDA causa danos à atividade mitocondrial que afetam o potencial de membrana celular (Guo et al., 2018). Em seguida, expusemos as células novamente a 6-OHDA, porém agora com a utilização da sonda MitoSOX Red, um corante indicador de superóxido mitocondrial. Foi possível verificar um aumento expressivo nos níveis de superóxidos mitocondriais através ação da 6-OHDA, que foi diminuído de maneira satisfatória pela ação do FPS-ZM1 e do TAK-242, sugerindo que RAGE e TLR4 podem ativar vias de sinalização que colaboram com o comprometimento do funcionamento mitocondrial neuronal. Nesse sentido, nossos resultados sugerem que a expressão do RAGE e do TLR4, pode exercer

efeitos diretos sobre a atividade mitocondrial de células neuronais, constituindo um mecanismo que pode contribuir para a progressão da DP. Estudos adicionais sobre o papel dos receptores e suas vias de sinalização na função mitocondrial devem ser realizados a fim de responder esta questão.

Estudos recentes relataram que quando RAGE e TLR4 foram ativados, ocorreu um fenômeno de interdependência entre os receptores, amplificando suas expressões e consequentes respostas inflamatórias. O *knockout* do TLR4 em BMDMs estimulados com HMGB1, resultou na redução da expressão do RAGE, bem como, o *knockout* do RAGE resultou em uma diminuição na presença do TLR4 na membrana (Zhong et al., 2020). De mesmo modo, a inibição do RAGE regulou os níveis de expressão de TLR4, e a inibição da TLR4 também regulou os níveis de expressão de RAGE em BMDMs estimulados com LPS (Longfei et al., 2023). Porém, até o momento, a maioria das pesquisas se concentrou em macrófagos, deixando a cooperação entre RAGE e TLR4 no neurônio, relativamente menos explorado. No entanto, essa interação assume relevância significativa, considerando o potencial do bloqueio dos receptores como alvo terapêutico para abordagens na DP. Em conjunto com os dados encontrados na literatura, porém agora em um contexto neuronal, nossos resultados mostraram que o FPS-ZM1 diminuiu os níveis de mRNA do RAGE e do TLR4. De mesmo modo, TAK-242 diminuiu os níveis de mRNA do TLR4 e do RAGE. Assim, sugerimos uma possível interdependência entre RAGE e TLR4, visto que o bloqueio isolado de cada uma das vias dos receptores, leva ao cessamento do sinal de ambos. Porém, ainda precisamos elucidar o que medeia essa interdependência de expressão entre RAGE e TLR4, e os mecanismos precisos dessa interação requerem uma exploração mais aprofundada. Ainda, é de suma importância confirmar a especificidade dos inibidores no modelo estudado, apesar de que não existam trabalhos publicados, até o momento, que indiquem uma especificidade cruzada destes inibidores por RAGE e TLR4.

Por fim, como possível limitação, esse trabalho investiga o papel dos receptores em um contexto neuronal, *in vitro*. Sabe-se que modelos *in vitro* viabilizam uma investigação preliminar rápida em comparação com os modelos *in vivo*, e que tais modelos são caracterizados por sua facilidade de manipulação e alto controle experimental. Entretanto, modelos *in vitro* não podem reproduzir integralmente a complexidade intrínseca das interações celulares, particularmente aquelas subjacentes às células do SNC. Não obstante, permanecem como ótimas alternativas para a exploração dos mecanismos moleculares e análises de neurotoxicidade.

## 6. CONCLUSÃO

Nossos resultados demonstraram que a inibição do RAGE através do seu antagonista FPS-ZM1, foi capaz de reverter os danos neuronais dopaminérgicos causados pela 6-OHDA. Ainda, os resultados indicam uma interdependência entre RAGE e TLR4 em um contexto neuronal, onde a inibição do TLR4 diminuiu a expressão do RAGE, e a inibição do RAGE diminuiu a expressão do TLR4. A 6-OHDA induziu um aumento de expressão do RAGE e TLR4, bem como dos parâmetros pró-inflamatórios TNF $\alpha$  e IL6 nas células. Além disso, o dano dopaminérgico causado pela 6-OHDA, causou danos nas mitocôndrias e aumento nos níveis de superóxidos mitocondriais. Notavelmente, a inibição do RAGE e do TLR4 foi capaz de atenuar o dano neuroinflamatório causado pela 6-OHDA, bem como suprimir a disfunção da atividade mitocondrial nas células. Juntos, nossos resultados sugerem que o *crosstalk* da sinalização de RAGE e de TLR4 controlou eventos críticos para a manutenção da viabilidade neuronal em um contexto de toxicidade dopaminérgica, através do controle da expressão de citocinas pró-inflamatórias, que ocorreu provavelmente em respostas as disfunções mitocondriais. Aqui, células SH-SY5Y submetidas a um processo de diferenciação rápida utilizando AR, demonstraram alongamento dos neuritos, aumento na marcação de  $\beta$ III-Tubulina e aumento da expressão de TH, confirmando um fenótipo catecolaminérgico semelhante ao de neurônios adultos no modelo.



## **7. PERSPECTIVAS**

Tendo em vista os resultados obtidos até o momento com esta pesquisa, é possível delinear algumas perspectivas para o aperfeiçoamento das evidências levantadas. Logo, ainda precisamos elucidar novos mecanismos moleculares sobre o bloqueio do RAGE e a proteção conferida as células. Para esse fim, novas análises envolvendo a ativação do fator de transcrição NF-kB no modelo de estudo serão realizadas. Além disso, as vias de sinalização do RAGE e as vias de cooperação entre RAGE e TLR4 deverão ser avaliadas, através da imunodeteção de ERK1/2, JNK/SAPK, MAPK, p38, Myd88, TIRAP, TRIF e TRAM. Ainda, novas análises com a adição do grupo 6-OHDA+FPS-ZM1+TAK-242 serão exploradas em diferentes testes no modelo celular, a fim de verificar sinergia entre os receptores. Por fim, uma questão interessante que resta investigar é o detalhamento da relação entre a expressão de RAGE e TLR4 com a disfunção mitocondrial causada pela 6-OHDA. Este resultado abre uma nova frente de questões sobre potenciais novas funções celulares para estes receptores.

## REFERÊNCIAS

- Akira S. Mammalian Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol.* 2003; doi: 10.1016/S0952-7915(02)00013-4
- Antony PM, Diederich NJ, Krüger R, Balling R. The hallmarks of Parkinson's disease. *FEBS J.* 2013; doi:10.1111/febs.12335
- Bandres-Ciga S, Ahmed S, Sabir MS, Blauwendraat C, Adarmes-Gómez AD, Bernal-Bernal I, Bonilla-Toribio M, Buiza-Rueda D, Carrillo F, Carrión-Claro M, Gómez-Garre P, Jesús S, Labrador-Espinosa MA, Macias D, Méndez-Del-Barrio C, Periñán-Tocino T, Tejera-Parrado C, Vargas-González L, Diez-Fairen M, Alvarez I, Tartari JP, Buongiorno M, Aguilar M, Gorostidi A, Bergareche JA, Mondragon E, Vinagre-Aragon A, Croitoru I, Ruiz-Martínez J, Dols-Icardo O, Kulisevsky J, Marín-Lahoz J, Pagonabarraga J, Pascual-Sedano B, Ezquerro M, Cámara A, Compta Y, Fernández M, Fernández-Santiago R, Muñoz E, Tolosa E, Valldeoriola F, Gonzalez-Aramburu I, Sanchez Rodriguez A, Sierra M, Menéndez-González M, Blazquez M, Garcia C, Suarez-San Martin E, García-Ruiz P, Martínez-Castrillo JC, Vela-Desojo L, Ruz C, Barrero FJ, Escamilla-Sevilla F, Mínguez-Castellanos A, Cerdan D, Tabernero C, Gomez Heredia MJ, Perez Errazquin F, Romero-Acebal M, Feliz C, Lopez-Sendon JL, Mata M, Martínez Torres I, Kim JJ, Dalgard CL; American Genome Center; Brooks J, Saez-Atienzar S, Gibbs JR, Jorda R, Botia JA, Bonet-Ponce L, Morrison KE, Clarke C, Tan M, Morris H, Edsall C, Hernandez D, Simon-Sanchez J, Nalls MA, Scholz SW, Jimenez-Escrig A, Duarte J, Vives F, Duran R, Hoenicka J, Alvarez V, Infante J, Marti MJ, Clarimón J, López de Munain A, Pastor P, Mir P, Singleton A; International Parkinson Disease Genomics Consortium. The Genetic Architecture of Parkinson Disease in Spain: Characterizing Population-Specific Risk, Differential Haplotype Structures, and Providing Etiologic Insight. *Mov Disord.* 2019; doi: 10.1002/mds.27864. PMID: 31660654; PMCID: PMC8393828.
- Bierhaus A, Humpert PM, Morcos M, Wendt T, Chavakis T, Arnold B, Stern DM, Nawroth PP. Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end products. *J Mol Med (Berl).* 2005; doi: 10.1007/s00109-005-0688-7. PMID: 16133426.
- Blum D, Torch S, Lambeng N, Nissou M, Benabid AL, Sadoul R, Verna JM. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol.* 2001 Oct;65(2):135-72. doi: 10.1016/s0301-0082(01)00003-x. PMID: 11403877.
- Bongarzone S, Savickas V, Luzi F, Gee AD. Targeting the Receptor for Advanced Glycation Endproducts (RAGE): A Medicinal Chemistry Perspective. *J Med Chem.* 2017 Sep 14;60(17):7213-7232. doi: 10.1021/acs.jmedchem.7b00058. Epub 2017 May 19. PMID: 28482155; PMCID: PMC5601361.
- Bopp C, Bierhaus A, Hofer S, Bouchon A, Nawroth PP, Martin E, Weigand MA. Bench-to-bedside review: The inflammation-perpetuating pattern-recognition receptor RAGE as a therapeutic target in sepsis. *Crit Care.* 2008;12(1):201. doi: 10.1186/cc6164. Epub 2008 Jan 9. PMID: 18226173; PMCID: PMC2374592.
- Brett J., Schmidt A. M., Yan S. D., et al. Survey of the distribution of a newly characterized receptor for advanced glycation end products in tissues. *American Journal of Pathology.* 1993; 143(6):1699–1712.
- Buchanan, M. M, Hutchinson, M., Watkins L. R.; Yin H. Toll-like Receptor 4 in CNS Pathologies. *J Neurochem.* 2010; doi:10.1111/j.1471-4159.2010.06736.x
- Büeler H. Impaired mitochondrial dynamics and function in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Exp Neurol.* 2009; doi: 10.1016/j.expneurol.2009.03.006. PMID: 19303005.

Campolo M, Paterniti I, Siracusa R, Filippone A, Esposito E, Cuzzocrea S. TLR4 absence reduces neuroinflammation and inflammasome activation in Parkinson's diseases in vivo model. *Brain Behav Immun*. 2019; doi: 10.1016/j.bbi.2018.12.003.

Chia SJ, Tan EK, Chao YX. Historical Perspective: Models of Parkinson's Disease. *Int J Mol Sci*. 2020; doi: 10.3390/ijms21072464. PMID: 32252301; PMCID: PMC7177377.

Chuah YK, Basir R, Talib H, Tie TH, Nordin N. Receptor for advanced glycation end products and its involvement in inflammatory diseases. *Int J Inflamm* 2013; doi:10.1155/2013/403460

Conte C, Roscini L, Sardella R, Mariucci G, Scorzoni S, Beccari T, et al. Toll like receptor 4 affects the cerebral biochemical changes induced by MPTP treatment. *Neurochem Res*. 2017; doi: 10.1007/s11064-016-2095-6.

Cui W, Sun C, Ma Y, Wang S, Wang X, Zhang Y. Inhibition of TLR4 Induces M2 Microglial Polarization and Provides Neuroprotection via the NLRP3 Inflammasome in Alzheimer's Disease. *Front Neurosci*. 2020; doi: 10.3389/fnins.2020.00444. PMID: 32508567; PMCID: PMC7251077.

Deane R, Du Yan S, Subramanian RK, LaRue B, Jovanovic S, Hogg E, Welch D, Manness L, Lin C, Yu J, Zhu H, Ghiso J, Frangione B, Stern A, Schmidt AM, Armstrong DL, Arnold B, Liliensiek B, Nawroth P, Hofman F, Kindy M, Stern D, Zlokovic B. RAGE mediates amyloid-beta peptide transport across the blood-brain barrier and accumulation in brain. *Nat Med*, 2003; doi: 10.1038/nm890

Del Tredici K, Braak H. Review: Sporadic Parkinson's disease: development and distribution of  $\alpha$ -synuclein pathology. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2016; doi: 10.1111/nan.12298. PMID: 26662475.

Derk J, MacLean M, Juranek J, Schmidt AM. The Receptor for Advanced Glycation Endproducts (RAGE) and Mediation of Inflammatory Neurodegeneration. *J Alzheimers Dis Parkinsonism*, 2018; doi: 10.4172/2161-0460.1000421

Ding Q, Keller JN. Evaluation of rage isoforms, ligands, and signaling in the brain. *Biochim Biophys Acta*. 2005; doi: 10.1016/j.bbamcr.2005.08.006. PMID: 16214242.

Elfawy HA, Das B. Crosstalk between mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and age-related neurodegenerative disease: Etiologies and therapeutic strategies. *Life Sci*. 2019; doi: 10.1016 / j.lfs.2018.12.029.

Fan H, Tang HB, Chen Z, et al. Inhibiting HMGB1-RAGE axis prevents pro-inflammatory macrophages/microglia polarization and affords neuroprotection after spinal cord injury. *J Neuroinflammation*. 2020; doi: 10.1186 / s12974-020-01973-4

Ferger B., Themann C., Rose S., Halliwell B., Jenner P. 6-hydroxydopamine increases the hydroxylation and nitration of phenylalanine in vivo: Implication of peroxynitrite formation. *J. Neurochem*. 2001; doi: 10.1046/j.1471-4159.2001.00429.x.

Forster JJ, Köglberger S, Trefois C, Boyd O, Baumuratov AS, Buck L, Balling R, Antony PMA. Characterization of Differentiated SH-SY5Y as Neuronal Screening Model Reveals Increased Oxidative Vulnerability. *Journal of Biomolecular Screening*. 2016; doi: 10.1177 / 1087057115625190

Friguet, B., Bulteau, A L., Chondrogianni, N., Conconi, M. e Petropoulos, I. Protein Degradation by the Proteasome and Its Implications in Aging. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2000; doi: 10.1111/j.1749-6632.2000.tb06643.x

Gąsiorowski, K., Brokos, B., Echeverria, V. et al. RAGE-TLR Crosstalk Sustains Chronic Inflammation in Neurodegeneration. *Mol Neurobiol.* 2018; doi:10.1007/s12035-017-0419-4

Gasparotto J, Girardi CS, Somensi N, Ribeiro CT, Moreira JCF, Michels M, Sonai B, Rocha M, Steckert AV, Barichello T, Quevedo J, Dal-Pizzol F, Gelain DP. Receptor for advanced glycation end products mediates sepsis-triggered amyloid- $\beta$  accumulation, Tau phosphorylation, and cognitive impairment. *J Biol Chem.* 2018; doi: 10.1074/jbc.M117.786756. PMID: 29127203; PMCID: PMC5766916.

Gasparotto J, Ribeiro CT, Bortolin RC, et al Targeted inhibition of RAGE in substantia nigra of rats blocks 6-OHDA-induced dopaminergic denervation. *Sci Rep.* 2017; doi: 10.1038/s41598-017-09257-3

Gasparotto J, Ribeiro CT, da Rosa-Silva HT, Bortolin RC, Rabelo TK, Peixoto DO, Moreira JCF, Gelain DP. Systemic Inflammation Changes the Site of RAGE Expression from Endothelial Cells to Neurons in Different Brain Areas. *Mol Neurobiol.* 2019; doi: 10.1007/s12035-018-1291-6. PMID: 30094805.

Gasparotto J, Somensi N, Girardi CS, Bittencourt RR, de Oliveira LM, Hoefel LP, Scheibel IM, Peixoto DO, Moreira JCF, Outeiro TF, Gelain DP. Is it all the RAGE? Defining the role of the receptor for advanced glycation end products in Parkinson's disease. *J Neurochem.* 2023; doi: 10.1111/jnc.15890. PMID: 37381043.

Gelders G., Baekelandt V., Van der Perren A. Linking Neuroinflammation and Neurodegeneration in Parkinson's Disease. *Journal of immunology research.* 2018; doi:10.1155/2018/4784268

Grunwald MS, Ligabue-Braun R, Souza CS, Heimfarth L, Verli H, Gelain DP, Moreira JC. Putative model for heat shock protein 70 complexation with receptor of advanced glycation end products through fluorescence proximity assays and normal mode analyses. *Cell Stress Chaperones.* 2017 Jan;22(1):99-111. doi: 10.1007/s12192-016-0746-9. Epub 2016 Nov 17. PMID: 27858225; PMCID: PMC5225064.

Guo J., Zhao X., Li Y., Li G., Liu X. Damage to dopaminergic neurons by oxidative stress in Parkinson's disease. *International Journal of Molecular Medicine.* 2018; doi: 10.3892/ijmm.2018.3406

Hirsch EC, Hunot S. Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? *Lancet Neurol.* 2009; doi: 10.1016/S1474-4422(09)70062-6. PMID: 19296921.

Hirsch EC, Standaert DG. Ten Unsolved Questions About Neuroinflammation in Parkinson's Disease. *Move Disord Off J Move Disord Soc.* 2021; doi: 10.1002/mds.28075.

Hori O, Brett J, Slattery T, Cao R, Zhang J, Chen JX, Nagashima M, Lundh ER. The receptor for advanced glycation end products (RAGE) is a cellular binding site for amphotericin. Mediation of neurite outgrowth and co-expression of RAGE and amphotericin in the developing nervous system. *J Biol Chem.* 1995; doi: 10.1074/jbc.270.43.25752

Hua F., Tang H., Wang J., Prunty M. C., Hua X., Sayeed I. TAK-242, an antagonist for Toll-like receptor 4, protects against acute cerebral ischemia/reperfusion injury in mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2015; doi:10.1038/jcbfm.2014.240

Hughes CD, Choi ML, Rytén M, Hopkins L, Drews A, Botía JA, et al. Picomolar concentrations of oligomeric alpha-synuclein sensitizes TLR4 to play an initiating role in Parkinson's disease pathogenesis. *Acta Neuropathol.* 2019; doi: 10.1007/s00401-018-1907-y

Hunter RL, Dragicevic N, Seifert K, Choi DY, Liu M, Kim HC, Cass WA, Sullivan PG, Bing G. Inflammation induces mitochondrial dysfunction and dopaminergic neurodegeneration in the nigrostriatal system. *J Neurochem.* 2007; doi: 10.1111/j.1471-4159.2006.04327.x. PMID: 17254027.

Huttunen HJ, Kuja-Panula J, Sorci G, Agneletti AL, Donato R, Rauvala H. Coregulation of neurite outgrowth and cell survival by amphotericin and S100 proteins through receptor for advanced glycation end products (RAGE) activation. *J Biol Chem.* 2000; doi:10.1074/jbc.M006993200

Ibrahim ZA, Armor CL, Phipps S, Sukkar MB. RAGE and TLRs: relatives, friends or neighbours?. *Mol Immunol.* 2013; doi: 10.1016 / j.molimm.2013.07.008

J.C. Tobon-Velasco, E. Cuevas, M.A. Torres-Ramos. Receptor for AGEs (RAGE) as Mediator of NF- $\kappa$ B Pathway Activation in Neuroinflammation and Oxidative Stress. *CNS Neurol. Desord.* 2014; doi: 10.2174/1871527313666140806144831.

Jenner P. Oxidative stress and Parkinson's disease. *Handb Clin Neurol.* 2007; doi: 10.1016/S0072-9752(07)83024-7. PMID: 18808931.

Jiafeng Li e Ann Marie Schmidt. Characterization and functional analysis of the promoter of RAGE, the receptor for advanced glycation end products. *J. Biol. Chem.* 1997; doi: 10.1074 / jbc.272.26.16498

Jianling Xie, José D. Méndez, Verna Méndez-Valenzuela, María Montserrat Aguilar-Hernández. Cellular signalling of the receptor for advanced glycation end products (RAGE). *Cell Signaling.* 2013; doi:10.1016/j.cellsig.2013.06.013.

Karin M, Takahashi T, Kapahi P, Delhase M, Chen Y, Makris C, Rothwarf D, Baud V et al. Oxidative stress and gene expression: The AP-1 and NF- $\kappa$ B connections. *Biofactors.* 2011; doi:10.1002/biof.5520150207

Kawamoto T, Ii M, Kitazaki T, Iizawa Y, Kimura H. TAK-242 selectively suppresses Toll-like receptor 4-signaling mediated by the intracellular domain. *Eur J Pharmacol.* 2008; doi: 10.1016/j.ejphar.2008.01.026. PMID: 18299127.

Kazantsev AG, Kolchinsky AM. Central role of alpha-synuclein oligomers in neurodegeneration in Parkinson disease. *Arch Neurol.* 2008; doi:10.1001/archneur.65.12.1577

Kierdorf, K. and Fritz, G. RAGE regulation and signaling in inflammation and beyond. *Journal of Leukocyte Biology.* 2013; doi:10.1189/jlb.1012519

Kim J, Wan CK, J O'Carroll S, Shaikh SB, Nicholson LF. The role of receptor for advanced glycation end products (RAGE) in neuronal differentiation. *J Neurosci Res.* 2012; doi: 10.1002 / jnr.23014.

Kim SW, Lim CM, Kim JB, et al. Extracellular HMGB1 Released by NMDA Treatment Confers Neuronal Apoptosis via RAGE-p38 MAPK/ERK Signaling Pathway. *Neurotox Res.* 2011; doi: 10.1007 / s12640-010-9231-x

King E and Thomas A. Systemic inflammation in Lewy body diseases: a systematic review. *Alzheimer Dis Assoc Disord.* 2017; doi: 10.1097/WAD.0000000000000211

Kouli A, Camacho M, Allinson K, Williams-Gray CH. Neuroinflammation and protein pathology in Parkinson's disease dementia. *Acta Neuropathol Commun.* 2020; doi: 10.1186/s40478-020-01083-5.

Kouli A, Horne C, Williams-Gray C. Toll-like receptors and their therapeutic potential in Parkinson's disease and  $\alpha$ -synucleinopathies. *Brain Behav Immun.* 2019; doi: 10.1016/j.bbi.2019.06.042.

Kovalevich J., Langford D. Considerations for the Use of SH-SY5Y Neuroblastoma Cells in Neurobiology. *Neuronal Cell Culture. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*. 2013; doi: 10.1007/978-1-62703-640-5\_2

Kunzler A, Zeidán-Chuliá F, Gasparotto J, Girardi CS, Klafke K, Petiz LL, Bortolin RC, Rostirolla DC, Zanotto-Filho A, de Bittencourt Pasquali MA, Dickson P, Dunkley P, Moreira JCF, Gelain DP. Changes in Cell Cycle and Up-Regulation of Neuronal Markers During SH-SY5Y Neurodifferentiation by Retinoic Acid are Mediated by Reactive Species Production and Oxidative Stress. *Mol. Neuro*. 2017; doi: 10.1007/s12035-016-0189-4.

L. Shang, R. Ananthakrishnan, Q. Li, N. Quadri, M. Abdillahi, Z. Zhu, W. Qu, R. Rosario, F. Toure, SF Yan, AM Schmidt, R. Ramasamy. RAGE Modulates Hypoxia/Reoxygenation Injury in Adult Murine Cardiomyocytes via JNK and GSK-3 $\beta$  Signaling Pathways. *PLoS One*. 2010; doi: 10.1371/journal.pone.0010092.

Leclerc E, Fritz G, Weibel M, Heizmann CW, Galichet A. S100B and S100A6 differentially modulate cell survival by interacting with distinct RAGE (receptor for advanced glycation end products) immunoglobulin domains. *J Biol Chem* 2007; doi:10.1074/jbc.M703951200

Lee MS, Kim YJ. Signaling Pathways Downstream of Pattern-Recognition Receptors and Their Cross Talk. *Annu Rev Biochem*. 2007; doi: 10.1146/annurev.biochem.76.060605.122847

Lehnardt S, Massillon L, Follett P, Jensen FE, Ratan R, Rosenberg PA, Volpe JJ, Vartanian T. Activation of innate immunity in the CNS triggers neurodegeneration through a Toll-like receptor 4-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Jul 8;100(14):8514-9. doi: 10.1073/pnas.1432609100. Epub 2003 Jun 24. PMID: 12824464; PMCID: PMC166260.

Li J, Schmidt AM. Characterization and functional analysis of the promoter of RAGE, the receptor for advanced glycation end products. *J Biol Chem*. 1997 Jun 27;272(26):16498-506. doi: 10.1074/jbc.272.26.16498. PMID: 9195959.

Lin MT, Beal MF. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature*. 2006; doi: 10.1038/nature05292. PMID: 17051205.

Litwinoff E, Hurtado Del Pozo C, Ramasamy R, Schmidt AM. Emerging Targets for Therapeutic Development in Diabetes and Its Complications: The RAGE Signaling Pathway. *Clin Pharmacol Ther*, 2015; doi: 10.1002/cpt.148

Long H, Zhang S, Zeng S, Tong Y, Liu J, Liu C, Li D. Interaction of RAGE with  $\alpha$ -synuclein fibrils mediates inflammatory response of microglia. *Cell Rep*. 2022; doi: 10.1016/j.celrep.2022.111401.

Lopes FM, Schröder R, da Frota ML Jr, Zanotto-Filho A, Müller CB, Pires AS, Meurer RT, Colpo GD, Gelain DP, Kapczinski F, Moreira JC, Fernandes Mda C, Klamt F. Comparison between proliferative and neuron-like SH-SY5Y cells as an in vitro model for Parkinson disease studies. *Brain Research*. 2010; doi: 10.1016/j.brainres.2010.03.102.

Lucas, K.; Maes, M. Role of the Toll Like receptor (TLR) radical cycle in chronic inflammation: possible treatments targeting the TLR4 pathway. *Mol Neurobiol*, 2013; doi:10.1007/s12035-013-8425-7

Lukic IK, Humpert PM, Nawroth PP, Bierhaus A. The RAGE pathway: activation and perpetuation in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Ann N Y Acad Sci*. 2008; doi: 10.1196/annals.1433.059. PMID: 18448798.

Mahlknecht, P., Peball, M., Mair, K., Werkmann, M., Nocker, M., Wolf, E., Eisner, W., Bajaj, S., Quirbach, S., Peralta, C., Eschlbock, S., Wenning, G. K., Willeit, P., Seppi, K., & Poewe, W. Has deep brain stimulation changed the very Long-term outcome of Parkinson's disease? A controlled longitudinal study. *Movement Disorders Clinical Practice*. 2020; doi: 10.1002/mdc3.13039

Malik MA, Blusztajn JK, Greenwood CE. Brain-derived neurotrophic factor val66met polymorphism affects human memory-related hippocampal activity and predicts memory performance. *J Nutr Biochem*. 2000; doi:10.1016/s0955-2863(99)00066-2dorf

Malik P, Chaudhry N, Mittal R, Mukherjee TK. Role of receptor for advanced glycation end products in the complication and progression of various types of cancers. *Biochim Biophys Acta*, 2015; doi: 10.1016/j.bbagen.2015.05.020.

Mariucci G, Pagiotti R, Galli F, Romani L, Conte C. The potential role of toll-like receptor 4 in mediating dopaminergic cell loss and alpha-synuclein expression in the acute MPTP mouse model of Parkinson's disease. *J Mol Neurosci*. 2018; doi: 10.1007/s12031-018-1057-7

Matsunaga N, Tsuchimori N, Matsumoto T, Ii M. TAK-242 (resatorvid), a small-molecule inhibitor of Toll-like receptor (TLR) 4 signaling, binds selectively to TLR4 and interferes with interactions between TLR4 and its adaptor molecules. *Mol Pharmacol*. 2011; doi: 10.1124/mol.110.068064. PMID: 20881006.

Michel PP, Hirsch EC, Hunot S. Understanding Dopaminergic Cell Death Pathways in Parkinson Disease. *Neuron*. 2016; doi: 10.1016/j.neuron.2016.03.038.

Miller RL, James-Kracke M, Sun GY, Sun AY. Oxidative and inflammatory pathways in Parkinson's disease. *Neurochem Res*. 2009; doi: 10.1007/s11064-008-9656-2. PMID: 18363100.

Neeper M, Schmidt AM, Brett J, Yan SD, Wang F, Pan YC, Elliston K, Stern D, Shaw A. Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. *J Biol Chem*. 1992; PMID: 1378843.

Ott C., Jacobs K., Haucke E., Navarrete Santos A., Grune T., Simm A. Role of advanced glycation end products in cellular signaling. *Redox Biology*. 2014; doi: 10.1016/j.redox.2013.12.016.

Pablo A. Iglesias González, Melisa A. Conde, Verónica González-Pardo, Romina M. Uranga, Gabriela A. Salvador. In vitro 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity: New insights on NFκB modulation. *Toxicology in Vitro*. 2019; doi: 10.1016/j.tiv.2019.06.019.

Pajares M, I Rojo A, Manda G, Boscá L, Cuadrado A. Inflammation in Parkinson's Disease: Mechanisms and Therapeutic Implications. *Cells*. 2020; doi: 10.3390/cells9071687. PMID: 32674367; PMCID: PMC7408280.

Paleologou KE, Kragh CL, Mann DM, Salem SA, Al-Shami R, Allsop D, Hassan AH, Jensen PH, El-Agnaf OM. Detection of elevated levels of soluble alpha-synuclein oligomers in post-mortem brain extracts from patients with dementia with Lewy bodies. *Brain*. 2009; doi: 10.1093/brain/awn349. PMID: 19155272.

Paudel Y.N., Angelopoulou E., Piperi C., Othman I., Aamir K., Shaikh M.F. Impact of HMGB1, RAGE, and TLR4 in Alzheimer's Disease (AD): From Risk Factors to Therapeutic Targeting. *Cells*. 2020; doi: 10.3390/cells9020383

Perez-Pardo P, Dodiya HB, Engen PA, Forsyth CB, Huschens AM, Shaikh M, et al. Role of TLR4 in the gut-brain axis in Parkinson's disease: a translational study from men to mice. *Gut*. 2019; doi: 10.1136/gutjnl-2018-316844

- Peixoto DO, Bittencourt RR, Gasparotto J, Kessler FGC, Brum PO, Somensi N, Girardi CS, Dos Santos da Silva L, Outeiro TF, Moreira JCF, Gelain DP. Increased alpha-synuclein and neuroinflammation in the substantia nigra triggered by systemic inflammation are reversed by targeted inhibition of the receptor for advanced glycation end products (RAGE). *J Neurochem.* 2023; doi: 10.1111/jnc.15956.
- Picca A, Guerra F, Calvani R, Romano R, Coelho-Júnior HJ, Bucci C, Marzetti E. Mitochondrial Dysfunction, Protein Misfolding and Neuroinflammation in Parkinson's Disease: Roads to Biomarker Discovery. *Biomolecules.* 2021; doi: 10.3390/biom11101508. PMID: 34680141; PMCID: PMC8534011.
- Piras S, Furfaro AL, Domenicotti C, et al. RAGE Expression and ROS Generation in Neurons: Differentiation versus Damage. *Oxid Med Cell Longev.* 2016; doi: 10.1155 / 2016/9348651
- Poewe, W., & Espay, A. J. Long duration response in Parkinson's disease: Levodopa revisited. *Brain.* 2020; doi: 10.1093/brain/awaa226
- Portz P, Lee MK. Changes in Drp1 Function and Mitochondrial Morphology Are Associated with the  $\alpha$ -Synuclein Pathology in a Transgenic Mouse Model of Parkinson's Disease. *Cells.* 2021; doi: 10.3390/cells10040885. PMID: 33924585; PMCID: PMC8070398.
- Prantner D., Nallar S., Vogel S.N. The role of RAGE in host pathology and crosstalk between RAGE and TLR4 in innate immune signal transduction pathways. *FASEB J.* 2020; doi: 10.1096/fj.202002136R.
- Qian-hang S, Ying C, Fang-fang L, Shuo W, Xiao-ling Z, Yu-he Y, Nai-hong C. TLR4 deficiency has a protective effect in the MPTP/probenecid mouse model of Parkinson's disease. *Acta Pharmacol Sin.* 2019; doi: 10.1038 / s41401-019-0280-2
- Qin J, Goswami R, Dawson S, Dawson G. Expression of the receptor for advanced glycation end products in oligodendrocytes in response to oxidative stress. *J Neurosci Res.* 2008; doi:10.1002/jnr.21692
- Ray, R., Juranek, J. K., & Rai, V. RAGE axis in neuroinflammation, neurodegeneration and its emerging role in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews.* 2016; doi: 10.1016/j.neubiorev.2015.12.006
- Redza-Dutordoir M., Averill-Bates DA. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochim. Biophys. Acta.* 2016; doi: 10.1016 / j.bbamcr.2016.09.012.
- Rui F. Simões, Rafaela Ferrão, Margarida R. Silva, Sonia L.C. Pinho, Lino Ferreira, Paulo J. Oliveira, Teresa Cunha-Oliveira. Refinement of a differentiation protocol using neuroblastoma SH-SY5Y cells for use in neurotoxicology research. *Food and Chemical Toxicology.* 2021; doi: 10.1016/j.fct.2021.111967.
- Sakaguchi M, Murata H, Yamamoto K, Ono T, Sakaguchi Y, Motoyama A, Hibino T, Kataoka K et al. TIRAP, an Adaptor Protein for TLR2/4, Transduces a Signal from RAGE Phosphorylated upon Ligand Binding. *PLoS One.* 2011; doi: 10.1371 / journal.pone.0023132
- Sathe K., Maetzler W., Lang JD, et al. S100B is increased in Parkinson's disease and ablation protects against MPTP-induced toxicity through the RAGE and TNF- $\alpha$  pathway. *Brain.* 2012; doi: 10.1093 / brain / aws250
- Schmidt A., Kuhla B., Bigl K., Münch G., Arendt T. Cell cycle related signaling in Neuro2a cells proceeds via the receptor for advanced glycation end products. *Journal of Neural Transmission.* 2007; doi: 10.1007/s00702-007-0770-0



- Schmidt AM, Yan SD, Yan SF, Stern DM. The biology of the receptor for advanced glycation end products and its ligands. *Biochim Biophys Acta*. 2000; doi: 10.1016 / s0167-4889 (00) 00087-2
- Sessa L, Gatti E, Zeni F, Antonelli A, Catucci A, Koch M, Pompilio G, Fritz G, Raucci A, Bianchi ME. The receptor for advanced glycation end-products (RAGE) is only present in mammals, and belongs to a family of cell adhesion molecules (CAMs). *PLoS One*, 2014; doi: 10.1371/journal.pone.0086903
- Shen, L, Zhang, T, Yang, Y, Lu, D, Xu, A, Li, K. FPS-ZM1 Alleviates Neuroinflammation in Focal Cerebral Ischemia Rats via Blocking Ligand/RAGE/DIAPH1 Pathway. *ACS Chem. Neurosci*. 2021; doi: 10.1021/acschemneuro.0c00530
- Shin WH, Jeon MT, Leem E, Won SY, Jeong KH, Park SJ, McLean C, Lee SJ, Jin BK, Jung UJ, Kim SR. Induction of microglial toll-like receptor 4 by prothrombin kringle-2: a potential pathogenic mechanism in Parkinson's disease. *Sci Rep*. 2015; doi: 10.1038/srep14764. PMID: 26440368; PMCID: PMC4594003.
- Shukla V, Mishra SK, Pant HC. Oxidative stress in neurodegeneration. *Adv Pharmacol Sci*. 2011; doi: 10.1155/2011/572634. PMID: 21941533; PMCID: PMC3177364.
- Simm A, Casselmann C, Schubert A, Hofmann S, Reimann A, Silber RE. Age associated changes of AGE-receptor expression: RAGE upregulation is associated with human heart dysfunction. *Exp Gerontol*. 2004; doi:10.1016/j.exger.2003.12.006
- Simola N, Morelli M, Carta AR. The 6-Hydroxydopamine model of parkinson's disease. *Neurotox Res*. 2007; doi: 10.1007 / BF03033565.
- Somensi N, Lopes SC, Gasparotto J, Mayer Gonçalves R, Tiefensee-Ribeiro C, Oppermann Peixoto D, Ozorio Brum P, Pinho CM, Agnes JP, Santos L, de Oliveira J, Spiller F, Fonseca Moreira JC, Zanotto-Filho A, Prediger RD, Pens Gelain D. Role of toll-like receptor 4 and sex in 6-hydroxydopamine-induced behavioral impairments and neurodegeneration in mice. *Neurochem Int*. 2021; doi: 10.1016/j.neuint.2021.105215.
- Sorci G, Riuuzzi F, Giambanco I, Donato R. RAGE in tissue homeostasis, repair and regeneration. *Biochim Biophys Acta* 2013; doi:10.1016/j.bbamcr.2012.10.021
- Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M. Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature*. 1997; doi: 10.1038/42166.
- Taguchi A, Blood DC, del Toro G, Canet A, Lee DC, Qu W, Tanji N, Lu Y. Blockade of RAGE-amphoterin signalling suppresses tumour growth and metastases. *Nature* 2000; doi:10.1038/35012626
- Takeda K, Akira S. TLR signaling pathways. *Semin Immunol*. 2004; doi: 10.1016/j.smim.2003.10.003. PMID:14751757.
- Takuma K, Fang F, Zhang W, Yan S, Fukuzaki E, Du H, Sosunov A, McKhann G. RAGE-mediated signaling contributes to intraneuronal transport of amyloid-beta and neuronal dysfunction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; doi:10.1073/pnas.0905686106
- Tang S. C., Lathia J. D., Selvarj P. K., Jo D. G. Toll-Like Receptor-4 Mediates Neuronal Apoptosis Induced by Amyloid  $\beta$ -Peptide and the Membrane Lipid Peroxidation Product 4-Hydroxynonenal. *Exp Neurol*. 2008; doi: 10.1016/j.expneurol.2008.05.014
- Tang, S. C.; Arumugam, T. V.; Xu, X., Cheng A. Pivotal role for neuronal Toll-like receptors in ischemic brain injury and functional deficits. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007; doi: 10.1073/pnas.070255310

Teismann P, Sathe K, Bierhaus A, Leng L, Martin HL, Bucala R, Weigle B, Nawroth PP, Schulz JB. Receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) deficiency protects against MPTP toxicity. *Neurobiol Aging*. 2012; doi: 10.1016 / j.neurobiolaging.2011.12.006

Teissier T, Boulanger E. The receptor for advanced glycation end-products (RAGE) is an important pattern recognition receptor (PRR) for inflammaging. *Biogerontology*. 2019; doi: 10.1007/s10522-019- 09808-3

Tsang AH, Chung KK. Oxidative and nitrosative stress in Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta*. 2009; doi: 10.1016/j.bbadis.2008.12.006. PMID: 19162179.

Tysnes OB, Storstein A. Epidemiology of Parkinson's disease. *J Neural Transm*. 2017; doi: 10.1007/s00702-017-1686-y

van Beijnum JR, Buurman WA, Griffioen AW. Convergence and amplification of toll-like receptor (TLR) and receptor for advanced glycation end products (RAGE) signaling pathways via high mobility group B1 (HMGB1). *Angiogenesis*. 2008; doi: 10.1007 / s10456-008-9093-5.

van Noort JM, Bsibsi M. Toll-like receptors in the CNS: implications for neurodegeneration and repair. *Prog Brain Res*. 2009; doi: 10.1016/S0079-6123(09)17509-X. PMID: 19660653.

Vichai, V. e Kirtikara, K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature Protocols*. 2006; doi: 10.1038 / nprot.2006.179.

Vogel, S. N., Fitzgerald, K. A., Fenton, M. J. TLRs: differential adapter utilization by toll-like receptors mediates TLR-specific patterns of gene expression. *Mol Interv*. 2003; doi: 10.1124/mi.3.8.466

Xie HR, Hu LS, Li GY. SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: in vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Chin Med J*. 2010; PMID: 20497720.

Xie J, Mendez JD, Mendez-Valenzuela V, Aguilar-Hernandez MM. Cellular signalling of the receptor for advanced glycation end products (RAGE). *Cell Signal*, 2013; doi: 10.1016/j.cellsig.2013.06.013

Xiuli Jiang, Xiaoli Wang, Miao Tuo, Jiangnan Ma, Anmu Xie. RAGE and its emerging role in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Neuroscience Letters*. 2018; doi: 10.1016/j.neulet.2018.02.049.

Yamada M, Ichikawa T, Ii M, Sunamoto M, Itoh K, Tamura N, Kitazaki T. Discovery of novel and potent small-molecule inhibitors of NO and cytokine production as antisepsis agents: synthesis and biological activity of alkyl 6-(N-substituted sulfamoyl)cyclohex-1-ene-1-carboxylate. *J Med Chem*. 2005; doi: 10.1021/jm050623t. PMID: 16279805.

Yamamoto Y, Higashida H. RAGE regulates oxytocin transport into the brain. *Commun Biol*, 2020; doi: 10.1038/s42003-020-0799-2

Yan SF, Ramasamy R, Schmidt AM. Soluble RAGE: Therapy and biomarker in unraveling the RAGE axis in chronic disease and aging. *Biochem Pharmacol*. 2010; doi: 10.1016 / j.bcp.2010.01.013.

Yang J., Zhang R., Jiang X., Lv J., Li Y., Ye H. Toll-like receptor 4-induced ryanodine receptor 2 oxidation and sarcoplasmic reticulum Ca(2+) leakage promote cardiac contractile dysfunction in sepsis. *J. Biol. Chem*. 2018; doi:10.1074/jbc.M117.812289

Yang Y, Han C, Guo L, Guan Q. High expression of the HMGB1–TLR4 axis and its downstream signaling factors in patients with Parkinson's disease and the relationship of pathological staging. *Brain Behav*. 2018; doi: 10.1002 / brb3.948.

Yonekura H, Yamamoto Y, Sakurai S, Petrova RG, Abedin MJ, Li H, Yasui K, Takeuchi M, Makita Z, Takasawa S, Okamoto H, Watanabe T, Yamamoto H. Novel splice variants of the receptor for advanced glycation end-products expressed in human vascular endothelial cells and pericytes, and their putative roles in diabetes-induced vascular injury. *Biochem J*. 2003; doi: 10.1042/BJ20021371. PMID: 12495433; PMCID: PMC1223244.

Zhang J, Yu C, Zhang X, Chen H, Dong J, Lu W, Song Z, Zhou W. Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide induces cognitive dysfunction, mediated by neuronal inflammation via activation of the TLR4 signaling pathway in C57BL/6 mice. *J Neuroinflammation*. 2018; doi: 10.1186/s12974-017-1052-x. PMID: 29426327; PMCID: PMC5810193.

Zhang L., Bukulin M., Kojro E., et al. Receptor for advanced glycation end products is subjected to protein ectodomain shedding by metalloproteinases. *Journal of Biological Chemistry*. 2008; doi: 10.1074/jbc.M806948200.

Zhang Y, You B, Liu X, Chen J, Peng Y, Yuan Z. High-Mobility Group Box 1 (HMGB1) Induces Migration of Endothelial Progenitor Cell via Receptor for Advanced Glycation End-Products (RAGE)-Dependent PI3K/Akt/eNOS Signaling Pathway. *Med Sci Monit*. 2019; doi: 10.12659 / MSM.915829

Zhong H, Li X, Zhou S, Jiang P. Interplay between RAGE and TLR4 Regulates HMGB1-Induced Inflammation by Promoting Cell Surface Expression of RAGE and TLR4. *J Immunol*. 2020; doi: 10.4049/jimmunol.1900860

Zong, H, Madden A, Ward M, Mooney M. Homodimerization is essential for the receptor for advanced glycation end products (RAGE)-mediated signal transduction. *J Biol Chem*. 2010; doi: 10.1074/jbc.M110.133827