

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Biociências
Bacharelado em Biotecnologia - Ênfase em Biotecnologia Molecular

Reykla Ramon Bittencourt

O PAPEL DO RAGE (RECEPTOR PARA PRODUTOS FINAIS DE GLICAÇÃO
AVANÇADA) NA NEUROTOXICIDADE INDUZIDA POR 6-HIDROXIDOPAMINA EM
SH-SY5Y, UM MODELO CELULAR DA DOENÇA DE PARKINSON

Porto Alegre

2021

Reykla Ramon Bittencourt

O PAPEL DO RAGE (RECEPTOR PARA PRODUTOS FINAIS DE GLICAÇÃO AVANÇADA) NA NEUROTOXICIDADE INDUZIDA POR 6-HIDROXIDOPAMINA EM SH-SY5Y, UM MODELO CELULAR DA DOENÇA DE PARKINSON

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial à obtenção do título de bacharela em Biotecnologia - Ênfase em Biotecnologia Molecular do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Pens Gelain

Coorientadora: Ma. Carolina Saibro Girardi

Porto Alegre

2021

CIP - Catalogação na Publicação

Bittencourt, Reykla Ramon

O papel do RAGE (Receptor para Produtos Finais de Glicação Avançada) na neurotoxicidade induzida por 6-hidroxi-dopamina em SH-SY5Y, um modelo celular da Doença de Parkinson. / Reykla Ramon Bittencourt. -- 2021.

41 f.

Orientador: Daniel Pens Gelain.

Coorientadora: Carolina Saibro Girardi.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Biociências, Curso de Biotecnologia: Biotecnologia Molecular, Porto Alegre, BR-RS, 2021.

1. RAGE. 2. Doença de Parkinson. 3. Neuroinflamação. 4. Neurodegeneração. 5. Estresse Oxidativo. I. Pens Gelain, Daniel, orient. II. Saibro Girardi, Carolina, coorient. III. Título.

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

Reykla Ramon Bittencourt

O PAPEL DO RAGE (RECEPTOR PARA PRODUTOS FINAIS DE GLICAÇÃO AVANÇADA) NA NEUROTOXICIDADE INDUZIDA POR 6-HIDROXIDOPAMINA EM SH-SY5Y, UM MODELO CELULAR DA DOENÇA DE PARKINSON

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial à obtenção do título de bacharela em Biotecnologia - Ênfase em Biotecnologia Molecular do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Pens Gelain

Coorientadora: Ma. Carolina Saibro Girardi

Aprovada em: Porto Alegre, 19 de maio de 2021.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Daniel Pens Gelain
Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

Dra. Karine Begnini
Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

Dr. Juciano Gasparotto
Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

Honro o fechamento deste ciclo dedicando essa pesquisa a minha irmã Mayara (*in memoriam*), que mesmo sem estar no plano físico, segue me ensinando como se reerguer diante das adversidades da vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que me permitiu poder percorrer essa jornada, e que em todos os momentos é o maior mestre que alguém pode conhecer.

Agradeço à minha mãe, Nadia, e minha avó, Neusa. Meus maiores exemplos, minhas bases de apoio e incentivo, em todos os momentos da minha vida. Sem vocês eu não seria quem sou hoje, são luz nos meus caminhos. Eu amo vocês incondicionalmente.

Ao meu pai, Osvaldo. Que desde o início dessa caminhada, me deu o suporte necessário para que o sonho “UFRGS” pudesse se concretizar. Sempre com muito carinho. Te amo.

Aos meus irmãos, Mônica, Mayara (*in memoriam*), Bianca e André. Conhecer vocês, foi o maior presente da minha vida. Seguiremos juntos sempre, “na terra ou no céu”. Eu amo demais vocês.

Aos meus companheiros de jornada na Biotecnologia e também da vida. Meus presentes do pacote “UFRGS”. Sem vocês essa caminhada não teria todo o brilho e alegria que teve. Obrigada por todo incentivo, amizade e companheirismo. Mariana, João Luiz e Daniel.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Daniel Gelain. Obrigada por todo o conhecimento passado, pela paciência em ensinar e pela oportunidade de me deixar conduzir as pesquisas no Lab. 32, com autonomia e confiança. Me inspiro no grande pesquisador que tu é, Daniel.

À minha coorientadora, Ma. Carolina Girardi. Obrigada por toda confiança depositada em mim. Por todo o empenho e dedicação sempre. A maneira como tu conduz tua carreira, as pesquisas, é inspiração pra mim. Tu é demais Carol. Obrigada por tanto.

A todos colegas do Laboratório 32 no Departamento de Bioquímica. Estar em um lugar, e se sentir “família”, é fundamental. Em especial ao mestrando Alexander, e ao Doutorando Lucas, o apoio e ajuda de vocês foi essencial.

Aos membros da banca examinadora, Dr. Juciano Gasparotto e Dra. Karine Begnini, pelo gentil aceite e disposição no aperfeiçoamento deste trabalho.

À 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. Que cada pesquisador e cientista seja devidamente valorizado pelo trabalho essencial que tem em mãos. Que o saber de vocês chegue a todos os lugares do mundo!

*“Learn from yesterday, live for today,
hope for tomorrow.
The important thing is not to stop questioning. “*

Albert Einstein

RESUMO

A Doença de Parkinson (DP) é uma doença neurodegenerativa progressiva, e sua incidência tende ao aumento conforme a expectativa de vida da população cresce. Disfunção mitocondrial, estresse oxidativo, excitotoxicidade, desregulação autofágica e neuroinflamação crônica são alguns dos mecanismos que levam à degeneração progressiva dos neurônios dopaminérgicos da substância nigra pars compacta (SNpc), uma característica fisiopatológica típica da DP. O receptor para produtos finais de glicação avançada (RAGE), é um receptor transmembrana, com capacidade de reconhecimento multiligante. RAGE desencadeia importantes vias de sinalização associadas ao estresse oxidativo e neuroinflamação, atuando inclusive na indução da sua própria expressão. Esses mecanismos levam o receptor a ser vinculado com diversos processos patológicos, incluindo a neurodegeneração. Portanto, o objetivo desse estudo foi verificar o papel do RAGE em um modelo *in vitro* da DP, bloqueando o receptor através da administração do FPS-ZM1, na linhagem celular SH-SY5Y diferenciada por ácido retinóico (AR), exposta ao dano por 6-hidroxidopamina (6-OHDA). Os resultados mostram que a 6-OHDA induziu o aumento da expressão de *AGER*. Diante do bloqueio do receptor através do tratamento com FPS-ZM1, houve a proteção das células contra o dano conferido pela 6-OHDA. Ainda, nossos resultados sugerem que a modulação da expressão de *AGER* não depende da ativação do RAGE. O aumento da expressão de *TLR4* induzido pela 6-OHDA foi prevenido com a administração do FPS-ZM1. Por fim, a regulação positiva da expressão de $IL1\beta$ e $TNF\alpha$ não é dependente de nenhum receptor aqui estudado, sendo possivelmente, reflexos da manutenção da viabilidade celular conferida pelo FPS-ZM1.

Palavras-chave: RAGE; Doença de Parkinson; Neuroinflamação; Neurodegeneração; Estresse Oxidativo;

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is a progressive neurodegenerative disease, and its incidence tends to increase as the population's life expectancy grows. Mitochondrial dysfunction, oxidative stress, excitotoxicity, autophagic dysregulation, and chronic neuroinflammation are some of the components that lead to the progressive degeneration of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta (SNpc), a typical pathophysiological characteristic of PD. The receptor for advanced glycation end products (RAGE) is a transmembrane receptor with multi-ligand recognition capability. RAGE triggers critical signaling pathways associated with oxidative stress and neuroinflammation and also acts to induce expression itself. These mechanisms lead the receptor to be linked to several pathological processes, including neurodegeneration. Therefore, the study's objective was to verify the role of RAGE in an in vitro model of PD, blocking the receptor through the administration of FPS-ZM1 in the SH-SY5Y cell line differentiated by retinoic acid (RA) exposed to damage by 6-hydroxydopamine (6-OHDA). The results show that 6-OHDA induced an increase in *AGER* expression. Given the receptor blockade through treatment with FPS-ZM1, the cells were protected against the damage caused by 6-OHDA. Furthermore, our results suggest that the modulation of *AGER* expression does not depend on the activation of the RAGE. The increase in *TLR4* expression induced by 6-OHDA was prevented with the administration of FPS-ZM1. Finally, the positive regulation of $IL1\beta$ and $TNF\alpha$ expression is not dependent on any receptor studied here, possibly reflecting the maintenance of cell viability conferred by FPS-ZM1.

Keywords: RAGE; Parkinson's disease; Neuroinflammation; Neurodegeneration; Oxidative stress;

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- 6-OHDA** 6-Hidroxiopamina
- AR** Ácido Retinóico
- AGER** gene humano do RAGE
- BBB** Barreira Hematoencefálica
- COX2** Ciclo-oxigenase 2
- 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*
- IL1 β** Interleucina 1 *beta*
- JNK** *c-Jun N-terminal kinases*
- LCR** Líquido Cefalorraquidiano
- LDH** Lactato Desidrogenase
- LPS** Lipopolissacarídeo
- MPTP** 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina
- NADPH** Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
- NF- κ B** Fator Nuclear *kappa* B
- PAMPs** Padrão Molecular Associado a Patógenos
- PI3K** *Phosphoinositide 3-kinase*
- RAGE** Receptor para Produtos Finais de Glicação Avançada
- ROS** Espécies Reativas de Oxigênio (*Reactive Oxygen Species*)
- RRP** Receptor de Reconhecimento de Padrões
- SFB** Soro Fetal Bovino
- SNC** Sistema Nervoso Central
- SNpc** Substância Nigra *pars compacta*
- SRB** Sulforrodamina B
- TH** Tirosina Hidroxilase

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

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

TNF α Fator de Necrose Tumoral *alpha*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
1.1 DOENÇA DE PARKINSON	13
1.2 RECEPTOR PARA PRODUTOS FINAIS DE GLICAÇÃO AVANÇADA (RAGE).....	14
1.3 RAGE E NEUROINFLAMAÇÃO.....	15
1.4 RAGE E A DOENÇA DE PARKINSON	16
1.5 INIBIÇÃO DO RAGE – FPS-ZM1.....	17
1.6 CROSSTALK RAGE E TLR4.....	17
1.7 MODELOS EXPERIMENTAIS DA DP	18
2 OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA.....	20
3 METODOLOGIA.....	21
3.1 CULTURA CELULAR.....	21
3.2 TRATAMENTOS E DIFERENCIAÇÃO NEURONAL.....	21
3.3 TESTES DE VIABILIDADE CELULAR	22
3.4 RT-PCR	23
3.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	23
4 RESULTADOS	25
4.1 DIFERENCIAÇÃO CELULAR.....	25
4.2 CURVA DE SENSIBILIDADE À NEUROTOXINA 6-HIDROXIDOPAMINA	26
4.3 O PAPEL DA INIBIÇÃO DO RAGE NO MODELO DE ESTUDO.....	27
4.4 MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE <i>AGER</i> E <i>TLR4</i>	31
4.5 MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PARÂMETROS PRÓ-INFLAMATÓRIOS.....	32
5 DISCUSSÃO	34
6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	37
REFERÊNCIAS.....	38

1 INTRODUÇÃO

1.1 DOENÇA DE PARKINSON

A Doença de Parkinson (DP) é uma doença neurodegenerativa progressiva. Suas principais marcas neuropatológicas são: a deposição de agregados proteicos mal dobrados em diferentes regiões do cérebro, compostos predominantemente por α -sinucleína; e a degeneração progressiva de neurônios dopaminérgicos na Substância Nigra *pars compacta* (SN_{pc}), ocasionando a depleção de dopamina estriatal, sendo responsáveis pelos sintomas motores clássicos da DP (Spillantini et al, 1997).

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 são pessoas acima de 60 anos (Tysnes OB e Storstein A, 2017). Entretanto, seus tratamentos não mudaram na mesma proporção nos últimos 30 anos. Terapias de reposição de dopamina empregando L-dopa e agonistas de dopamina como base, bem como o uso de uma série de inibidores enzimáticos, são os tratamentos mais utilizados atualmente. Esses medicamentos são disponibilizados em uma variedade de formas: orais, intraduodenais, intravenosas, subcutâneas e transdérmicas; proporcionando diferentes graus de administração medicamentosa, conforme a necessidade do paciente. Há ainda, a supressão das oscilações neuronais patológicas por meio da estimulação cerebral profunda (DBS). Porém, todas essas abordagens tratam apenas os déficits motores da DP, com pouco efeito nos sintomas não motores. Até o momento, nenhum efeito sobre a progressão da doença foi comprovado (Antony PM et al, 2013).

Ao longo dos anos, vários mecanismos celulares e moleculares que podem contribuir para a morte neuronal têm sido amplamente descritos, incluindo disfunção mitocondrial, estresse oxidativo, excitotoxicidade e desregulação autofágica (Michel et al, 2016). No entanto, questões sobre a causa da morte de células neuronais permanecem sem resposta. A neuroinflamação tem sido fortemente associada à patogênese da DP, assim como de outros distúrbios neurodegenerativos. Porém, de que forma os processos neuroinflamatórios são causa ou consequência da degeneração neuronal ainda é uma questão em aberto (Gelders et al, 2018).

1.2 RECEPTOR PARA PRODUTOS FINAIS DE GLICAÇÃO AVANÇADA (RAGE)

O receptor para produtos finais de glicação avançada (RAGE) é um receptor transmembrana do tipo imunoglobulina, possuindo múltiplas isoformas oriundas de splicing alternativo, e atualmente é considerado um Receptor de Reconhecimento de Padrões (RRP) (Kierdorf K e Fritz G, 2013). A expressão do RAGE é constitutiva durante o desenvolvimento embrionário; já na vida adulta, essa expressão tende a ocorrer em níveis mais baixos, exceto no pulmão onde RAGE é altamente expresso ao longo da vida (Brett J et al, 1993). Nessas condições, RAGE é expresso em uma ampla variedade de células (endoteliais, cardiomiócitos, neutrófilos, monócitos/macrófagos, linfócitos, dendríticas), e também no sistema nervoso central (SNC): na glia e nos neurônios (Huttunen HJ et al, 2000; Qin J et al, 2008). Entretanto, foi relatado que a expressão de RAGE é regulada positivamente com o aumento da idade (Simm A et al, 2004), em parte, à interação com seus ligantes, que tendem a se acumular, devido a um turnover proteico reduzido em células senescentes (Friguet B et al, 2000). Seu papel pode, portanto, convergir com doenças relacionadas à idade, assim como a DP.

Sobre sua estrutura, RAGE possui três domínios imunoglobulina compondo sua parte extracelular positivamente carregada (um domínio do tipo V, seguido por um domínio do tipo C1, interconectado com um domínio do tipo C2), um domínio transmembrana, e uma parte intracelular negativamente carregada transdutora de sinal (cauda citoplasmática curta) (Figura 1). A partir de sua capacidade de reconhecimento multiligante na porção extracelular e de transdução de sinal na porção citoplasmática, o RAGE desencadeia importantes vias de sinalização intracelular (Figura 2) (Kierdorf K e Fritz G, 2013). Para a interação do domínio citoplasmático com possíveis adaptadores intracelulares que irão desencadear a sinalização, esta cauda citoplasmática curta na região C-terminal é essencial. Na ausência da cauda, RAGE não ativa cascatas de sinalização, embora ainda possa reconhecer seus ligantes, na porção extracelular (Ding e Keller, 2005).

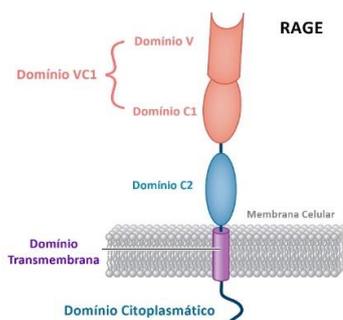


Figura 1. Estrutura do RAGE. Adaptado de (Hudson e Lippman, 2018)

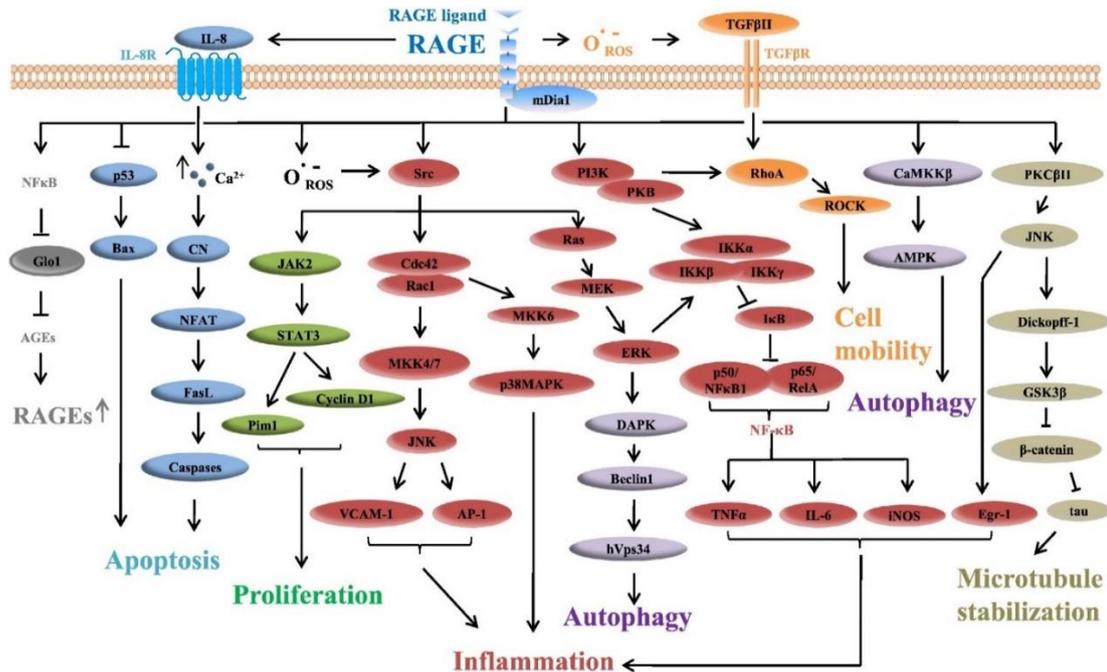


Figura 2. Representação esquemática das vias de sinalização do RAGE. RAGE controla uma variedade de processos celulares através de diversas vias de sinalização. Na imagem algumas dessas vias que já foram relatadas são mostradas, bem como seus processos celulares resultantes; Glo1-AGEs (aumenta a expressão de RAGE); p53-Bax (apoptose); IL-8-Caspases (apoptose); JAK-STAT3 (proliferação); Cdc42/Rac1-AP-1 (migração celular); Cdc42/Rac-1-p38 (inflamação); ERK-Beclin1 (autofagia); PI3K-IKK (α , β e γ)-NF κ B-TNF α -iNOS (inflamação) ou Bcl-2 (apoptose); TGF β II (migração celular); CaMKK β -AMPK (autofagia); PKC β II-JNK-Egr-1 (inflamação) e GSK3 β -tau (estabilização de microtúbulos); mDia1 é mostrado como adaptador para sinalização a jusante. Retirado de (Jianling Xie et al, 2013).

1.3 RAGE E NEUROINFLAMAÇÃO

O processo de neuroinflamação refere-se a respostas inflamatórias geradas por células do sistema nervoso central (SNC), como neurônios e micróglia, por exemplo. Dependendo do nível, ela pode ser neuroprotetora, atuando no reparo, regeneração e remoção de tecidos ou células danificadas. Entretanto, em condições de estresse crônico, como o estresse oxidativo, essa resposta anteriormente neuroprotetora, converte-se em uma resposta neurotóxica, desempenhando um papel crítico na progressão de doenças neurodegenerativas, incluindo a DP (Kempuraj et al, 2016).

Em um contexto neuronal, RAGE apresenta funções dependentes do estado de equilíbrio redox da célula, onde a presença do receptor em baixos níveis já é conhecida por promover a sobrevivência e favorecer a diferenciação neuronal. Porém, em situações de acúmulo de ligantes, um desbalanço no equilíbrio celular ocorre e a presença do RAGE passa a cooperar

em processos nocivos para a célula (Huttunen HJ et al, 2000). Após a interação com o ligante, ocorre a ativação de fatores de transcrição, como o NF- κ B por exemplo; geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a ativação de cascatas de fosforilação de cinases (Rouhiainen et al, 2013). Sabe-se que o NF- κ B tem papel chave no controle da expressão de uma variedade de parâmetros pró-inflamatórios, como Interleucinas (ILs), Ciclooxigenase 2 (COX2) e Fator de Necrose Tumoral α (TNF α), todos envolvidos na neuroinflamação (Tobon-Velasco et al, 2014).

A sinalização do RAGE envolve um importante processo de retroalimentação positiva. Iniciada a partir da interação com ligantes, estimula a ativação da NADPH oxidase gerando ROS (o acúmulo de ROS propicia o aumento da formação de ligantes de RAGE, potencializando sua ativação) (Kierdorf K e Fritz G, 2013). Ainda, a ativação do NF- κ B é de suma importância na retroalimentação desse sistema: ativado por RAGE, NF- κ B transloca-se para o núcleo da célula, gerando a expressão de uma ampla gama de genes. Devido a presença de locais de ligação no promotor do RAGE para NF- κ B, o gene humano do RAGE (*AGER*) é transcrito, perpetuando sua expressão na superfície celular, onde poderá interagir com seus ligantes (Gasiorowski et al, 2018). Essa perpetuação de sinal aumenta as respostas inflamatórias, e sabidamente tem como consequência a aceleração de processos de neurodegenerativos (Gelders G et al, 2018).

1.4 RAGE E A DOENÇA DE PARKINSON

Estudos recentes sugerem um potencial papel do RAGE e seus ligantes, para a progressão da patogênese da DP. Foi demonstrado que, quando comparados à pacientes saudáveis, pacientes com DP, possuem concentrações mais altas de ligantes de RAGE, como S100B, presente na SNpc e no Líquido Cefalorraquidiano (LCR) (Sathe K et al, 2012). Igualmente com HMGB1, onde a expressão do ligante foi maior no sangue periférico de pacientes com DP do que em pacientes saudáveis (Yang Y et al, 2018). Em um modelo utilizando MPTP (um precursor da neurotoxina MPP+, que provoca sintomas permanentes da DP ao destruir os neurônios dopaminérgicos), camundongos transgênicos livres da expressão de RAGE, apresentaram um número reduzido de micróglia ativada quando tratados com MPTP. Indicando que o processo inflamatório foi atenuado devido à ablação do RAGE (Teismann P et al, 2012).

Independente da estratégia utilizada, a inibição do RAGE anula uma variedade de mecanismos observados em vários modelos semelhantes a DP, como: morte neuronal dopaminérgica, defeitos locomotores, ativação de NF- κ B e neuroinflamação (Gasparotto J et

al, 2017). Ainda que muitos desses resultados tenham sido parciais, é possível que novos estudos baseados no entendimento da função do RAGE na DP, forneçam caminhos significativos para o uso do receptor como intervenção terapêutica.

1.5 INIBIÇÃO DO RAGE – FPS-ZM1

O FPS-ZM1, é um bloqueador de alta afinidade para RAGE, que se liga ao domínio V do receptor, impedindo a interação do RAGE com seus ligantes (Deane et al, 2012). Diferente dos anticorpos anti-RAGE, assim como o RAGE solúvel (sRAGE) (Yan SF et al, 2010), que apenas bloqueiam o RAGE periférico, porém não cruzam a Barreira Hematoencefálica (BBB), o FPS-ZM1 é capaz de atravessar a BBB. Uma pesquisa recente demonstrou que o FPS-ZM1 foi capaz de produzir um efeito neuroprotetor em um modelo *in vivo*, revertendo um quadro de neuroinflamação instaurado no modelo; bem como a reversão da morte neuronal e déficits neurológicos (Shen, L et al, 2021). De mesmo modo, pesquisadores demonstraram o efeito da inibição do RAGE através do FPS-ZM1 em neurônios dopaminérgicos (Gasparotto J et al, 2017). Seus resultados demonstraram a reversão da morte neuronal dopaminérgica, bem como a supressão da ativação de vias de sinalização ligadas ao RAGE, sugerindo que a inibição do RAGE bloqueou a neuroinflamação no modelo estudado.

1.6 CROSSTALK RAGE E TLR4

Os TLRs (*Toll Like Receptor*), são uma família de receptores transmembrana tipo I. Assim como o RAGE, são considerados Receptores de Reconhecimento de Padrões (RRP), pois medeiam o reconhecimento de PAMPs (Padrões Moleculares Associados a Patógenos) e DAMPs (Padrões Moleculares Associados a Danos). TLR4, um membro da família TLR, foi o primeiro homólogo de mamífero identificado (Akira S, 2003), e pesquisas recentes sugerem que RAGE e TLR4 compartilham ligantes comuns: HMGB1, família de proteínas S100, e também LPS (Ibrahim ZA et al, 2013).

A cooperação RAGE/TLRs resulta na amplificação das respostas inflamatórias celulares. A partir da ligação com seus ligantes, RAGE e TLR4 desencadeiam suas principais vias; e há evidências crescentes para apoiar seu potencial sinergismo (Gąsiorowski K et al, 2018). Até o momento, dados da literatura onde a cooperação RAGE/TLRs é estudada, as vias de sinalização

a jusante desses receptores, são principal foco de estudo. Foi descoberto que os principais adaptadores de sinalização, tanto de TLR2, quanto de TLR4, as proteínas MyD88 e TIRAP, interagem com um conhecido adaptador de RAGE, a proteína mDia1 (Lee MS e Kim YJ, 2007; Sakaguchi M et al, 2011). Toda essa estimulação dos receptores, é capaz de ativar inúmeras proteínas em vias convergentes de sinalização (como ERK1/2, p38, JNK, por exemplo) (van Beijnum JR et al, 2008), ativando AP-1 e NF- κ B, fatores chaves na propagação da inflamação (Karin M et al, 2001).

Além dos estudos sobre o sinergismo entre os receptores e suas vias de sinalização, TLR4 vem se destacando em estudos sobre neurodegeneração. Sabendo que neuroinflamação leva ao progresso da neurodegeneração, uma pesquisa recente (Qian-hang S et al, 2019), demonstrou que TLR4 foi fator chave na morte de neurônios dopaminérgicos. Ainda, sua deficiência em camundongos transgênicos, atenuou os déficits motores nos animais, exerceu um efeito protetor nas anormalidades da α -sinucleína induzidas por MPTP, e reverteu quadros de neuroinflamação no modelo.

1.7 MODELOS EXPERIMENTAIS DA DP

O desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para a DP requer a melhor compreensão dos mecanismos moleculares relacionados à doença. Em pacientes, os estudos possuem inúmeras limitações, o que torna difícil esclarecer tais questões. A heterogeneidade amostral e a lenta progressão da doença in vivo são grandes obstáculos, além das considerações éticas à cerca desses estudos. Os modelos in vitro são facilmente manipuláveis, possuindo um ambiente altamente controlado. São modelos mais rápidos em comparação aos modelos tradicionais in vivo, possuindo resultados consistentes, sendo frequentemente utilizados para esse fim. O modelo de neurotoxicidade in vitro da linhagem celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y desafiada com a neurotoxina 6-hidroxidopamina (6-OHDA), por exemplo, tem sido amplamente utilizado em estudos da DP (Simola et al, 2007; Xie et al, 2010).

A linhagem SH-SY5Y é uma linhagem derivada de neuroblastoma humano, subclone da linhagem SK-N-SH (Kovalevich J. e Langford D, 2013). As vantagens acerca da utilização dessa linhagem em pesquisas de neurociência se dão pela alta capacidade de expansão (de forma simples e rápida), baixo custo de manutenção da linhagem, e a capacidade de sofrer diferenciação neuronal a partir do uso de agentes (Forster JI et al, 2016). Em seu estado proliferativo mantido em cultura, as células SH-SY5Y apresentam morfologia semelhante a

células epiteliais. Já as células diferenciadas apresentam um formato estrelado, com longas projeções neuríticas. O ácido retinóico (AR) é o agente de diferenciação mais comumente usado nessa linhagem (Malik MA et al, 2000). In vitro, o AR promove a diferenciação e inibe a divisão celular. Esse processo de diferenciação confere às células o aumento do imunoconteúdo de marcadores dopaminérgicos, como a tirosina hidroxilase (TH) e o transportador de dopamina (DAT) (Edsjö A et al, 2007). Assim, a diferenciação celular da linhagem, permite que as células de neuroblastoma passem de um fenótipo semelhante a células epiteliais, para um fenótipo com características neuronais. Portanto, a partir de sua diferenciação, e por ser um modelo derivado de células humanas, torna-se um modelo de estudo mais próximo de uma célula neuronal humana.

A neurotoxina 6-OHDA é amplamente utilizada tanto em modelos in vivo quanto em modelos in vitro da DP (Simola et al, 2007). A toxicidade da 6-OHDA depende diretamente da modulação redox celular. Sofrendo rápida oxidação no citoplasma, a 6-OHDA se acumula na mitocôndria, promovendo a inibição da cadeia transportadora de elétrons (Guo JD et al, 2018). Além disso, as espécies reativas de oxigênio geradas pela ação da 6-OHDA, podem reagir com proteínas de membrana, assim como o RAGE, exacerbando funções biológicas prejudiciais as células (Blum et al, 2000; Simola et al, 2007; Elfawy HA et al, 2019). Ainda, níveis elevados de ROS causam neuroinflamação e apoptose celular, que são desencadeadas por alterações mitocondriais e liberação de fatores pró-inflamatórios e pró-apoptóticos (Redza-Dutordoir M et al, 2016; C. Henze et al, 2005).

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 com processos neuroinflamatórios, neurodegeneração e a DP; (iii) o potencial terapêutico do bloqueio do RAGE através de seu antagonista FPS-ZM1 frente à modelos neuroinflamatórios in vivo; e (iv) a falta de estudos que abordem os mecanismos pelos quais o receptor atua em um contexto neuronal; este trabalho tem como objetivo *investigar a associação da sinalização do RAGE com o dano neuronal dopaminérgico induzido pela 6-OHDA em um modelo celular da DP utilizando a linhagem SH-SY5Y, auxiliando na compreensão da função do RAGE neuronal nos processos neurodegenerativos.*

Como objetivos específicos, este trabalho visa:

- i. Estabelecer o modelo de neurotoxicidade induzida por 6-OHDA na linhagem SH-SY5Y diferenciada por ácido retinóico, com análises de viabilidade celular, em uma curva de tempo e concentração da neurotoxina 6-OHDA.
- ii. Investigar se a neurotoxicidade por 6-OHDA está associada à modulação da expressão de *AGER* e de *TLR4*.
- iii. Avaliar a indução de parâmetros neuroinflamatórios em resposta à neurotoxicidade, com a análise da expressão dos seguintes mediadores pró-inflamatórios: *TNF α* e *IL1 β* .
- iv. Verificar a função da ativação do RAGE, avaliando se o pré-tratamento com o antagonista do RAGE, FPS-ZM1, é capaz de proteger as células contra os danos neurotóxicos causados pela 6-OHDA no modelo celular.

3 METODOLOGIA

3.1 CULTURA CELULAR

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 (1:1) da marca Sigma-Aldrich suplementado com antibiótico-antimicótico (Penicilina 100 Unidades/ml; estreptomicina 100 µg/ml) e 10% de soro fetal bovino (SFB) inativado. Foram mantidas em incubadora com temperatura a 37°C e CO₂ 5%. As passagens foram realizadas quando atingida cerca de 90% de confluência celular, e as trocas de meio foram realizadas a cada dois dias. Para os experimentos foram utilizadas células entre 20 e 26 passagens.

3.2 TRATAMENTOS E DIFERENCIAÇÃO NEURONAL

Preparo e administração da 6-OHDA: devido à grande instabilidade e auto oxidação rápida do composto, a 6-OHDA (Sigma-Aldrich) foi pesada e preparada no momento de sua utilização. Dessa forma, o preparo da solução de trabalho consiste na dissolução de 12,5 mg de 6-OHDA em uma solução salina (NaCl 0,9%) contendo ácido ascórbico 0,01%. Após isso, a droga foi diluída no meio de cultura, nas concentrações desejadas para cada procedimento e os tratamentos foram realizados pelo tempo total de 12, 24 e 48 horas. A solução contendo ácido ascórbico 0,01% foi utilizada como veículo em todos os procedimentos. A solução com 6-OHDA foi filtrada antes da administração na cultura celular a fim de evitar possíveis contaminações e administrada em meio DMEM/F12 com 1% SFB.

Preparo e administração do FPS-ZM1: foi preparada uma solução estoque de FPS-ZM1 (Sigma-Aldrich) na concentração de 1mg dissolvendo o composto no solvente orgânico dimetilsulfóxido (DMSO) e então diluído no meio de cultura celular a fim de se atingir a concentração final desejada de 1µg/mL e/ou 2µg/mL. Os tratamentos seguiram os tempos de incubação prévia do composto FPS-ZM1 no meio de cultivo celular, por 15 ou 60 minutos, seguido da adição da 6-OHDA por 12, 24 e 48 horas. Os reagentes utilizados foram filtrados antes da administração na cultura celular a fim de evitar possíveis contaminações e foram administrados em meio DMEM/F12 com 1% SFB.

Preparo e administração do Ácido Retinóico: foi preparada uma solução de estoque de ácido retinóico na concentração de 20nM dissolvendo o composto no solvente orgânico dimetilsulfóxido (DMSO) e então diluído no meio de cultura celular a fim de se atingir a concentração final desejada de 20 μ M. Para execução do protocolo de diferenciação neuronal, seguiu-se a metodologia já descrita na literatura (Lopes et al, 2010; Kunzler et al, 2017) com alterações pontuais. As células foram semeadas em placas de 12, 24 ou 48 poços com densidade celular de 30mil células/cm² e 60 mil células/cm² para placas de 6 poços, em meio de cultura DMEM/F12 com 10% de SFB. Após 24 horas, o meio de cultura foi trocado por DMEM/F12 com 1% de SFB e a adição de 20 μ M de ácido retinóico (AR) para a diferenciação rápida de três dias.

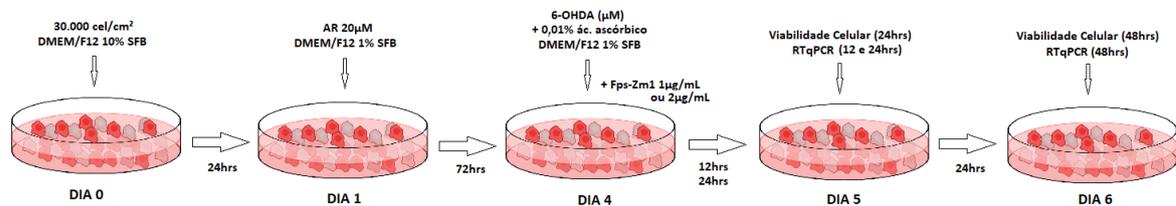


Figura 3 – Protocolo de tratamentos com 6-OHDA, FPS-ZM1 e diferenciação neuronal induzida por ácido retinóico na linhagem celular SH-SY5Y. Fonte: autoria própria (2021).

3.3 TESTES DE VIABILIDADE CELULAR

Para a análise de viabilidade e citotoxicidade celular foram utilizados os métodos de incorporação de sulforrodamina B (SRB), ensaio da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) no meio de incubação e a redução do brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio (MTT). 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). Já o ensaio da quantificação da enzima LDH, consiste em mensurar a 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). Para isso, o sobrenadante removido das placas de cultura 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, e 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 RT-PCR

O RNA total das células SH-SY5Y foi isolado com reagente TRIzol® (Invitrogen) e quantificado por meio de biofotômetro. Após síntese de cDNA pelo kit comercial SuperScript III (Invitrogen), as reações de PCR em tempo real foram realizadas no termociclador StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) com a utilização do kit comercial Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Para a amplificação do cDNA de *AGER* foram utilizados os *primers* direto 5' GTGAAGGAACAGACCAGGAG e reverso 5' GAAGGTACAGGAGAAGGTGG; para *TLR4* os *primers* direto 5' TCTACAAAATCCCCGAAACC e reverso 5' GCTCTGATATGCCCCATCTTC; para *TNFα* os *primers* direto 5' GATCCCTGACATCTGGAATCTG e reverso 5' GAAACATCTGGAGAGAGAGGAAGG; para *IL1β* os *primers* direto 5' GCATCCAGCTACGAATCTC e reverso 5' ATTCTCCTGGAAGGTCTGT; O gene endógeno utilizado foi o *GNB2L*, amplificado com os *primers* direto 5' GCTTGCAGTTAGCCAGGTTC e reverso 5' GAGTGTGGCCTTCTCCTCTG.

3.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 8.0.1, e os testes estatísticos foram determinados por ANOVA de uma via seguida pelo teste post hoc de

Tukey para comparação grupos múltiplos ou teste post hoc de Bonferroni para comparar grupos selecionados quando aplicável. A ANOVA de duas vias seguida pelo teste post hoc de Tukey foi aplicada para comparar grupos múltiplos. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Os resultados são expressos como valores médios \pm desvio padrão (DP).

4 RESULTADOS

4.1 DIFERENCIAÇÃO CELULAR

As células da linhagem celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y foram induzidas à diferenciação por meio da administração de AR 20 μ M seguindo o protocolo já descrito na literatura (Lopes et al., 2010; Kunzler et al., 2017). Adaptações pontuais foram feitas, a fim de utilizar o protocolo de diferenciação rápida (3 dias), já empregado em nosso laboratório. Após a indução da diferenciação celular, as células apresentaram aumento de projeções neuríticas, que foi verificada por meio de microscopia de contraste de fase (Figura 4). Por outro lado, as células não diferenciadas apresentaram morfologia típica da linhagem SH-SY5Y, que se assemelha à de células epiteliais.

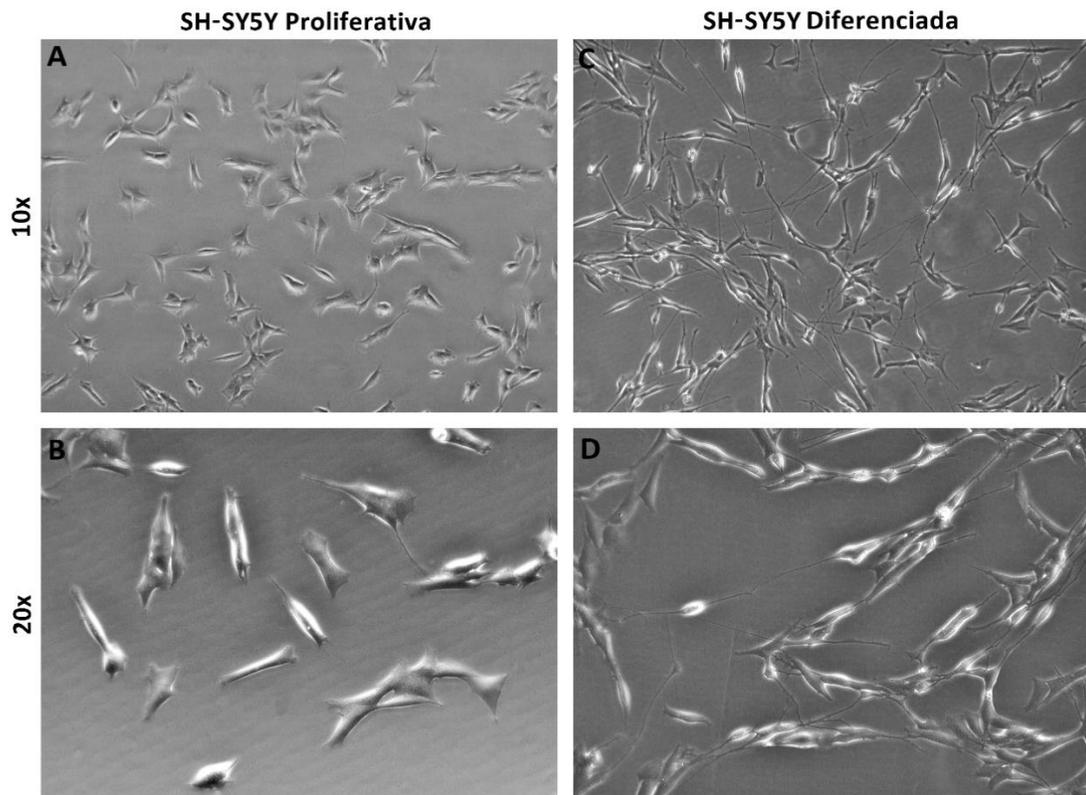


Figura 4. Morfologia das células SH-SY5Y em seu estado proliferativo e diferenciado. A linhagem celular SH-SY5Y não diferenciada em seu estado proliferativo (A e B), sob o protocolo de diferenciação rápida (C e D), registrada por meio do uso de microscopia de contraste de fase. (A e C) sob um aumento de 10x e (B e D) sob um aumento de 20x.

4.2 CURVA DE SENSIBILIDADE À NEUROTOXINA 6-HIDROXIDOPAMINA

A curva de dano da 6-OHDA foi realizada utilizando as concentrações de 6,25 a 200 μM por 24 e 48 horas, nas células SH-SY5Y diferenciadas por três dias com 20 μM de AR (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 5C), e da atividade da enzima LDH (Figuras 5B e 5D). Em 24 horas, as doses de 200 a 50 μM mostraram níveis altos de toxicidade celular, enquanto as concentrações mais baixas de 6,25 a 25 μM não obtiveram diferença estatística. Um padrão semelhante é visto em 48 horas, onde as doses de 200 a 50 μM conferem um alto grau de toxicidade, porém aqui as doses mais baixas mostraram significância em relação ao veículo, conferindo um resultado de menor viabilidade celular em 48 horas de tratamento. Diante desses resultados, as doses escolhidas para todos os tratamentos a seguir, foram de 100 e 50 μM , no tempo de 24 horas.

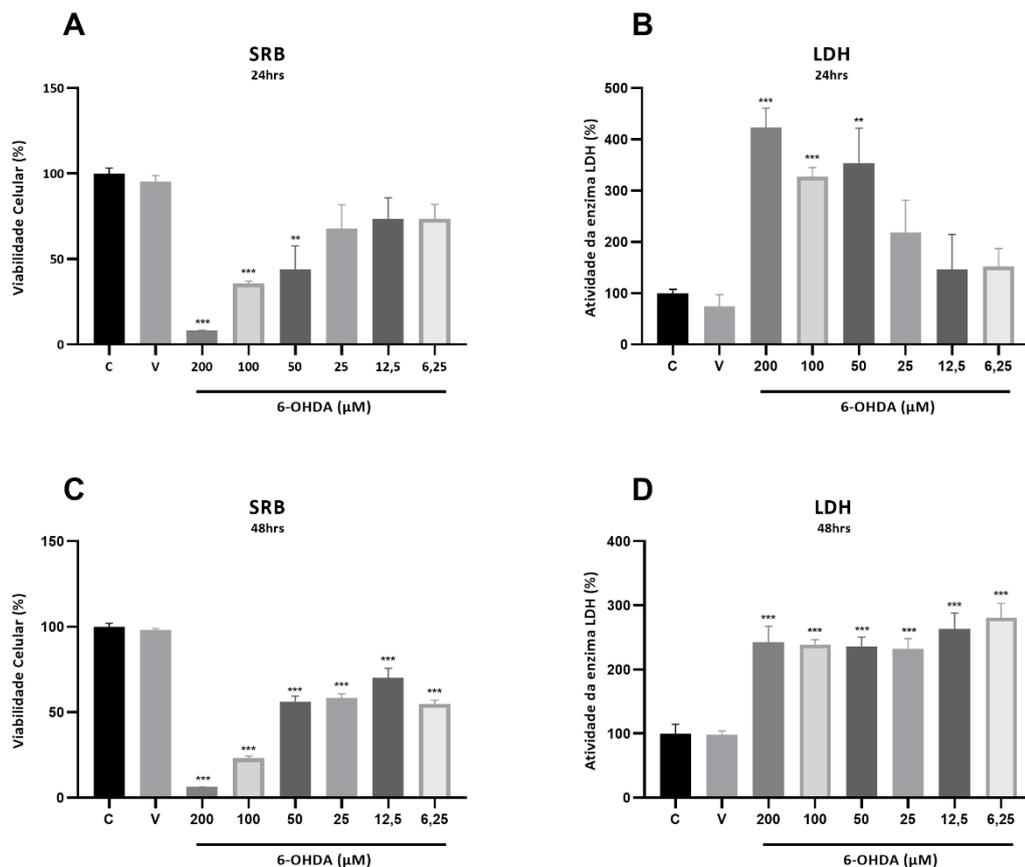


Figura 5. Curva de citotoxicidade da 6-OHDA nas células SH-SY5Y diferenciadas. A curva de dano da 6-OHDA foi realizada com concentrações de 6,25 a 200 μM por 24 horas (A e B) e 48 horas (C e D) nas células SH-SY5Y diferenciadas. A viabilidade celular do tratamento foi verificada pelos ensaios da

incorporação de SRB (A e C) e atividade da enzima LDH (B e D). Os dados são apresentados pela média \pm DP. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ em comparação ao grupo veículo.

4.3 O PAPEL DA INIBIÇÃO DO RAGE NO MODELO DE ESTUDO

A fim de compreender um possível papel do RAGE frente ao modelo desafiado com a neurotoxina 6-OHDA, pré-tratamentos com o antagonista do RAGE, FPS-ZM1, foram realizados, em 15 minutos na concentração de $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (Figura 6) e 60 minutos nas concentrações de $1\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 7) e $2\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 8). O pré-tratamento foi seguido da adição da neurotoxina nas concentrações de $50\mu\text{M}$ e $100\mu\text{M}$ ao meio de cultura celular por 24 horas nas células SH-SY5Y diferenciadas. Frente ao dano causado pela neurotoxina 6-OHDA o pré-tratamento por 15 minutos com FPS-ZM1 (Figuras 6A e 6B), não demonstrou surtir efeitos na viabilidade celular.

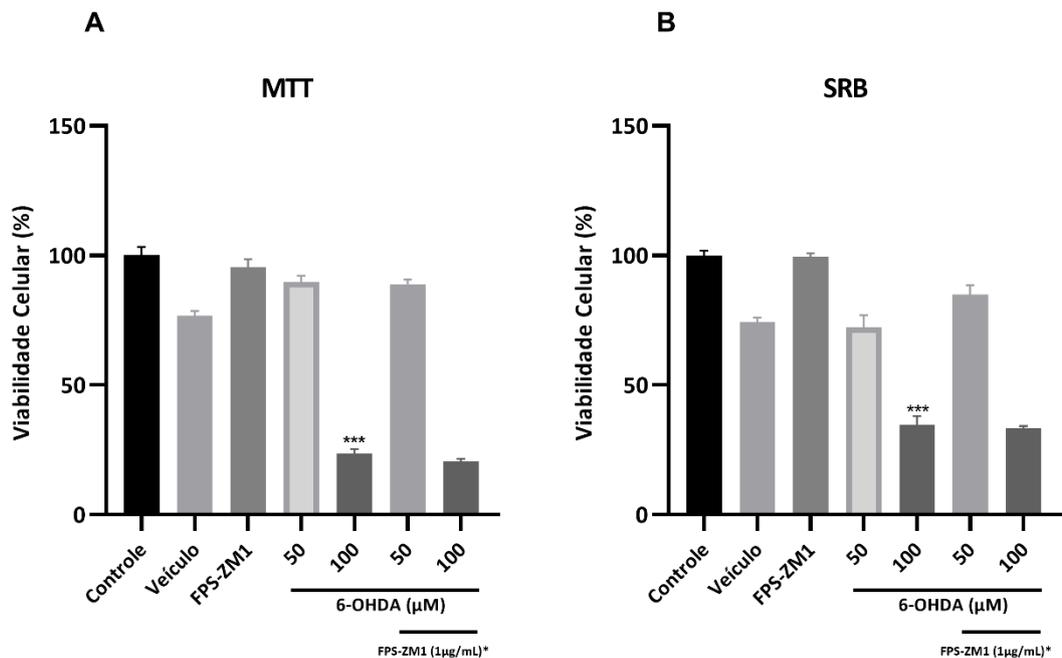


Figura 6. Redução da citotoxicidade da 6-OHDA frente à inibição do RAGE: pré-tratamento com $1\mu\text{g}/\text{mL}$ de FPS-ZM1 por 15 minutos. As células diferenciadas foram pré-tratadas com o FPS-ZM1* na concentração de $1\mu\text{g}/\text{mL}$ por 15 minutos, previamente ao dano realizado pela 6-OHDA nas concentrações de $50\mu\text{M}$ e $100\mu\text{M}$ por 24 horas (A e B). (A) Ensaio da redução da MTT e (B) Ensaio da incorporação de SRB. Os dados são apresentados pela média \pm DP. *** $p < 0,001$ em comparação ao grupo veículo.

Em contraponto, o pré-tratamento por 1 hora com o antagonista demonstrou efeitos positivos na viabilidade celular na concentração de $1\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 7), em ambos os ensaios.

As células foram visualizadas por microscopia, a fim de analisar a confluência celular nos poços de tratamento (Figuras 7A à 7G). Na análise das células SH-SY5Y diferenciadas, a mesma confluência celular nos grupos controle, veículo e FPS-ZM1 (Figuras 7A a 7C) pode ser observada, assim como a morfologia típica com projeções neuríticas. Já nos grupos com a adição da 6-OHDA nas concentrações de 50 μ M (Figura 7D) e 100 μ M (Figura 7F), pode-se observar a diminuição do número de células no campo visual. Entretanto, nos grupos 6-OHDA 50 μ M (Figura 7E) e 100 μ M (Figura 7G) pré-tratados com FPS-ZM1, foi observada atenuação do dano, visto a confluência celular passível de comparação com o controle e veículo.

No ensaio da atividade da LDH (Figura 7H), o pré-tratamento utilizando 1 μ g/mL de FPS-ZM1 foi capaz de atenuar significativamente o dano realizado pela 6-OHDA na concentração de 100 μ M, enquanto no ensaio da incorporação da SRB (Figura 7I), o pré-tratamento com FPS-ZM1 atenuou o dano em ambas as concentrações da 6-OHDA.

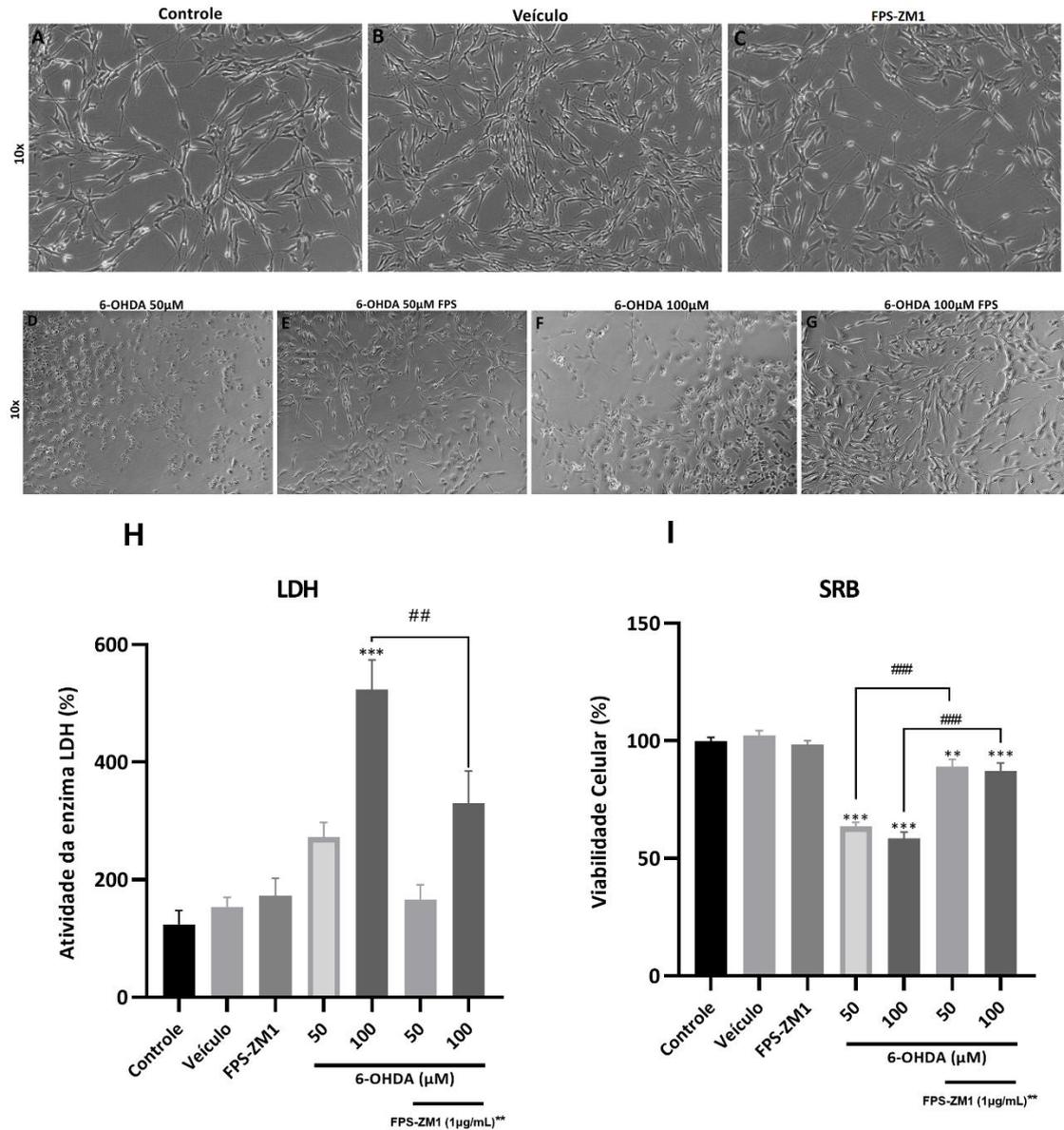


Figura 7. Redução da citotoxicidade da 6-OHDA frente à inibição do RAGE: pré-tratamento com 1 μg/mL de FPS-ZM1 por 60 minutos. As células diferenciadas foram pré-tratadas com o FPS-ZM1** na concentração de 1 μg/mL por 60 minutos, previamente ao dano realizado pela 6-OHDA nas concentrações de 50 μM e 100 μM por 24 horas. (A a G) Microscopia das células SHSY-5Y em 24h de tratamentos (aumento de 10x). (H) Ensaio da atividade da enzima LDH. (I) Ensaio da incorporação de SRB. Os dados são apresentados pela média ± DP. **p < 0,01; ***p < 0,001 em comparação ao grupo veículo. ##p < 0,01; ###p < 0,001 em comparação ao grupo 6-OHDA respectivo.

De mesmo modo, o pré-tratamento por 1 hora com o antagonista à 2 μg/mL mostrou resultados semelhantes na viabilidade celular em ambos os ensaios citotóxicos (Figura 8). Na análise da confluência celular do grupo FPS-ZM1 (Figura 8C), há uma diminuição visível no

número de células nos poços, em comparação ao controle e veículo, demonstrando leve citotoxicidade da concentração de 2µg/mL nas células.

Porém, tanto no ensaio da atividade da LDH (Figura 8H), quanto no ensaio da incorporação da SRB (Figura 8I), o pré-tratamento utilizando 2µg/mL de FPS-ZM1 foi capaz de atenuar significativamente o dano realizado pela 6-OHDA na concentração de 100µM. Em contrapartida, o mesmo não pode ser visto na concentração de 50µM, que não obteve diferença estatística quando comparado ao grupo 6-OHDA da sua respectiva concentração.

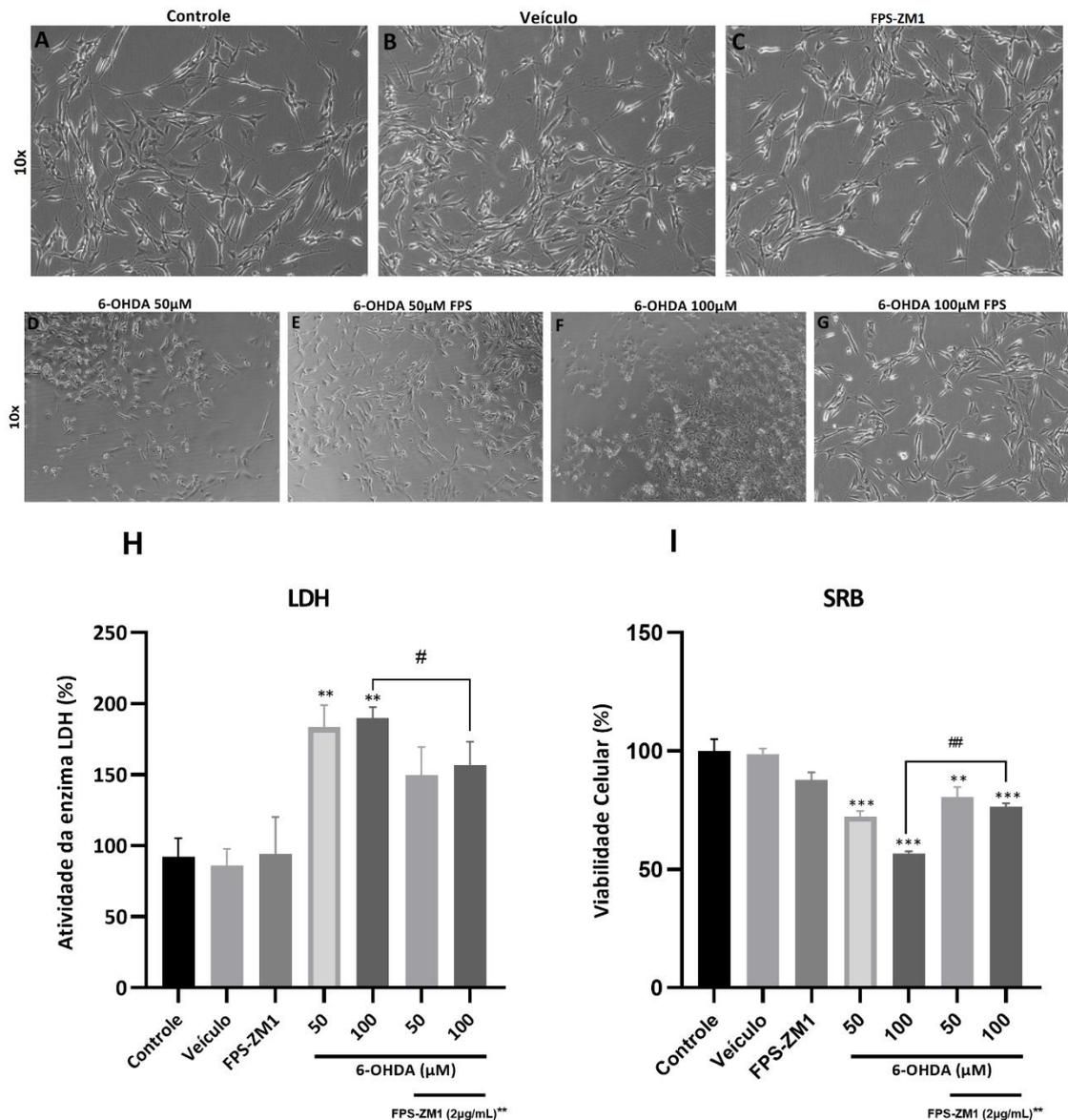


Figura 8. Redução da citotoxicidade da 6-OHDA frente à inibição do RAGE: pré-tratamento com 2µg/mL de FPS-ZM1 por 60 minutos. As células diferenciadas foram pré-tratadas com o FPS-ZM1** na concentração de 2µg/mL por 60 minutos, previamente ao dano realizado pela 6-OHDA nas concentrações de 50µM e 100 µM por 24 horas. (A a G) Microscopia das células SHSY-5Y em 24h de

tratamentos (aumento de 10x). (H) Ensaio da atividade da enzima LDH. (I) Ensaio da incorporação de SRB. Os dados são apresentados pela média \pm DP. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ em comparação ao grupo veículo. # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$ em comparação ao grupo 6-OHDA respectivo.

4.4 MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE *AGER* E *TLR4*

Para avaliar se a neurotoxina 6-OHDA e o pré-tratamento com o antagonista do RAGE, FPS-ZM1, poderia modular a expressão de *AGER* e de *TLR4*, células SH-SY5Y diferenciadas foram tratadas com o 1 μ g/mL de FPS-ZM1, por 1 hora, previamente à adição da 6-OHDA 50 μ M por 12 a 48 horas de tratamento (Figura 9). A transcrição de mRNA correspondente aos genes *AGER* e *TLR4* após os tratamentos foi avaliada via RT-qPCR.

AGER e *TLR4* demonstraram aumento de expressão diante do tratamento com 6-OHDA, no tempo de 12 horas; *AGER* (Figura 9A) foi expresso cerca de três vezes mais diante do tratamento quando comparado ao grupo veículo, enquanto a expressão de *TLR4* (Figura 9B) sofreu um aumento de até duas vezes diante do dano.

Em relação a expressão de *AGER*, o pré-tratamento com FPS-ZM1 conjuntamente com o dano da 6-OHDA, não demonstrou surtir efeitos na diminuição da expressão, mantendo os níveis de transcritos elevados no grupo, em 12 horas de tratamento (Figura 9A). Entretanto, a análise por RT-qPCR demonstrou a redução nos níveis de transcritos de *TLR4* após o pré-tratamento com FPS-ZM1, em 12 horas de tratamento (Figura 9B). O FPS-ZM1 foi capaz de prevenir o aumento da expressão de *TLR4*, mas não o de *AGER*, no modelo de neurotoxicidade por 6-OHDA.

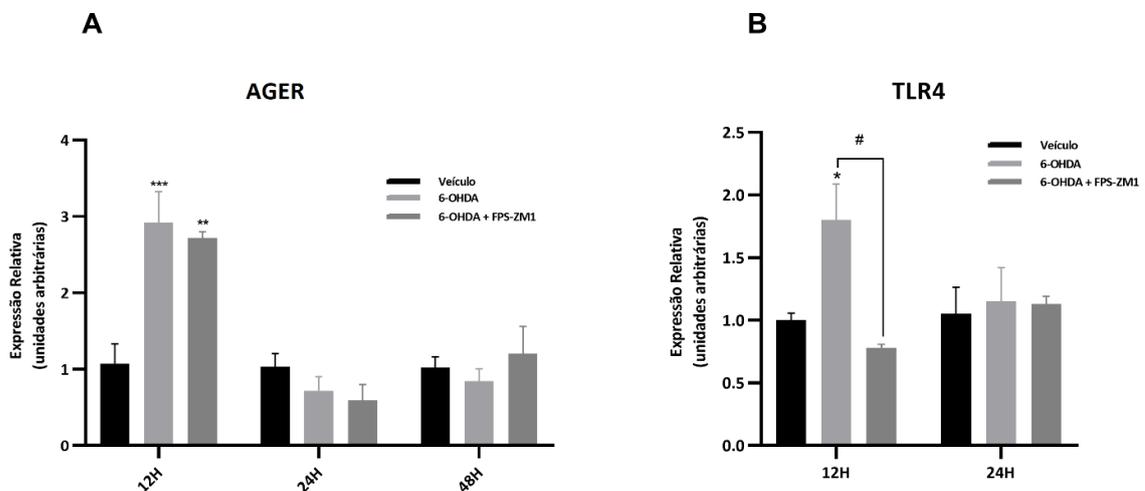


Figura 9 – Genes *AGER* e *TLR4* tem expressão aumentada em resposta a 6-OHDA, e FPS-ZM1 previne o aumento de *TLR4*. As células diferenciadas foram pré-tratadas com o FPS-ZM1 (1 μ g/mL) por 1 hora,

previamente ao dano realizado pela 6-OHDA (50 μ M). 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 veículo do respectivo tempo de tratamento. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ em relação ao veículo. # $p < 0,05$ em relação ao grupo 6-OHDA.

4.5 MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PARÂMETROS PRÓ-INFLAMATÓRIOS

A expressão das citocinas $IL1\beta$ e $TNF\alpha$ também foi avaliada, a fim de investigar o perfil de resposta causada pela 6-OHDA, assim como frente à atenuação dos danos, vista com o antagonista FPS-ZM1. Para isso as células SH-SY5Y diferenciadas foram tratadas com o 1 μ g/mL de FPS-ZM1, por 1 hora, previamente à adição de 50 μ M de 6-OHDA por 12 e 24 horas de tratamentos (Figuras 10A e 10B). A transcrição de mRNA correspondente a $IL1\beta$ e $TNF\alpha$ após os tratamentos foi avaliada via RT-qPCR.

Os dados mostram que a exposição das células ao pré-tratamento com FPS-ZM1 em conjunto com 6-OHDA, aumentou significativamente a expressão de mRNA de $TNF\alpha$ (Figura 10A) em comparação ao grupo 6-OHDA. No caso de $IL1\beta$ (Figura 10B), a mesma tendência foi observada, porém não significativa. Na comparação do grupo 6-OHDA com o veículo, por sua vez, não foi observada diferença estatística em nenhum dos casos. Os resultados indicam que a modulação da expressão desses parâmetros inflamatórios nas células expostas a 6-OHDA foi afetada pela inibição do RAGE.

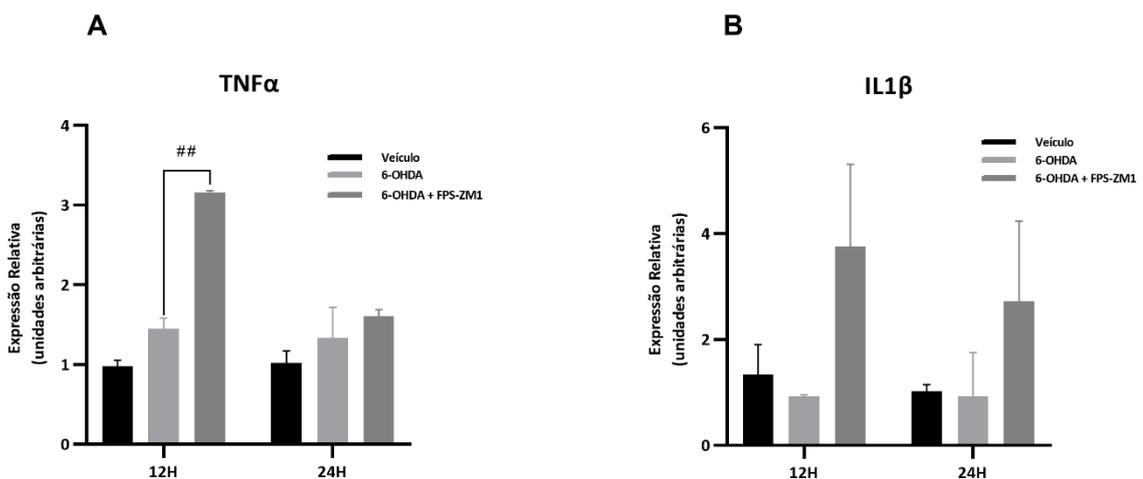


Figura 10 – Indução da expressão de parâmetros inflamatórios frente ao tratamento com 6-OHDA e FPS-ZM1. As células diferenciadas foram pré-tratadas com o FPS-ZM1 (1 μ g/mL) por 1 hora, previamente ao dano realizado pela 6-OHDA (50 μ M). RT-PCR quantitativo dos parâmetros inflamatórios $TNF\alpha$ (A) e $IL1\beta$ (B),

expresso em termos de $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Valores de expressão normalizados por *GNB2L*, relativos ao grupo veículo do respectivo tempo de tratamento. ## $p < 0,001$ em relação ao grupo 6-OHDA.

5 DISCUSSÃO

Evidências crescentes na pesquisa do RAGE fornecem insights sobre seu envolvimento em inúmeros processos moleculares, afetando a sobrevivência neuronal. Entretanto, até o momento, os mecanismos detalhados da contribuição do RAGE permanecem indefinidos. Pesquisas recentes (Piras S et al, 2016; Xiuli J et al, 2018; Teissier T et al, 2019) sugerem que a ativação do RAGE após interação com ligantes, contribui para o aumento da neuroinflamação, estresse oxidativo, degeneração neuronal e apoptose. Elucidar os papéis do RAGE na neuroinflamação e neurodegeneração, delineando ligações entre os mecanismos moleculares até a disfunção neuronal, será um marco nos estudos da DP. Dessa forma, por meio dos dados obtidos, pode-se compreender inicialmente a associação da ativação do RAGE com o dano neuronal induzido pela 6-OHDA, assim como a função do receptor no neurônio em processos associados a neurodegeneração.

A fim de preparar o modelo celular desse estudo, as células SH-SY5Y foram diferenciadas por ácido retinóico, obtendo então um fenótipo neuronal característico, sendo considerado um melhor modelo para estudos de neuroproteção (Xie HR et al, 2010; Rui F. Simões et al, 2021). Após a diferenciação, tratamos as células com diferentes concentrações de 6-OHDA (6,25, 12,5, 25, 50, 100 e 200 μ M) por 24 a 48 horas, e a viabilidade celular foi medida. A partir dos resultados, escolhemos uma dose alta de dano (100 μ M) e uma dose intermediária (50 μ M) para seguir os experimentos, no tempo de 24 horas. A utilização da 6-OHDA como indutor de degeneração neuronal é um dos modelos mais populares da DP (Simola et al, 2007; Pablo A. Iglesias González et al, 2019). 6-OHDA é um análogo da dopamina, altamente oxidável, que gera uma alta quantidade de ROS, comprometendo o funcionamento mitocondrial, levando a danos ao DNA e apoptose celular. De forma consistente, estudos sugerem que o aumento de ROS e o comprometimento mitocondrial atuam na patogênese da DP (Guo JD et al, 2018).

O FPS-ZM1, é um bloqueador multimodal do RAGE, com capacidade de atravessar a BBB. Atua bloqueando o domínio extracelular do tipo V do receptor, impedindo a interação RAGE-ligantes (Deane et al, 2012). Pesquisas recentes demonstraram que o bloqueio do receptor RAGE com FPS-ZM1 em modelos *in vitro* e *in vivo* (Shen L et al, 2021; Fan H et al, 2020), reverte quadros de neuroinflamação e contribui para a sobrevivência neuronal. Ainda, o efeito da inibição do RAGE sobre neurônios dopaminérgicos, foi estudado em um modelo animal de dano a partir da 6-OHDA (Gasparotto J et al, 2017). Os resultados de Gasparotto e colegas, mostraram que o FPS-ZM1 foi capaz de bloquear a morte neuronal dopaminérgica,

quando administrado em conjunto com a 6-OHDA, resgatando conteúdo da proteína tirosina hidroxilase (TH). Em suma, para investigar as ações do bloqueio do RAGE sobre a morte neuronal, expusemos as células SH-SY5Y diferenciadas, ao dano com 6-OHDA juntamente ao pré-tratamento com o antagonista FPS-ZM1, e realizamos testes de sobrevivência celular. Pode-se observar que em ambas as dosagens de 6-OHDA (100 μ M e 50 μ M), tanto 1 μ g/mL, quanto 2 μ g/mL de FPS-ZM1, protegeram às células (Figuras 7 e 8). Sendo então a inibição do RAGE, um fator chave na manutenção da viabilidade celular no modelo exposto ao dano por 6-OHDA, de forma consistente com os dados encontrados na literatura.

A fim de desenvolver uma compreensão mais aprofundada sobre a modulação da expressão do RAGE em nosso modelo, verificamos os níveis de mRNA de *AGER* nas células SH-SY5Y tratadas com 6-OHDA e FPS-ZM1. Pode-se constatar o aumento da expressão de *AGER* no grupo exposto ao dano por 6-OHDA. Entretanto, o FPS-ZM1 falhou em reverter a expressão de *AGER* em nosso experimento. Esses resultados podem indicar que a modulação da expressão de *AGER* nas células neuronais, não depende da ativação do RAGE, e aqui, possivelmente, outros eventos podem estar modulando sua expressão gênica nas células. Além disso, nossos resultados de amplificação da expressão de *AGER* no grupo 6-OHDA, vem de encontro à dados na literatura; que sugerem que o aumento da expressão do RAGE induzido por 6-OHDA pode estar relacionado ao dano oxidativo induzido pela neurotoxina (Gasparotto J et al, 2017). Pois, a natureza oxidante da 6-OHDA poderia ativar sinais inflamatórios, levando a produção de ROS, danificando proteínas e lipídios, gerando ligantes (AGEs e HMGB1 por exemplo), que poderiam levar à regulação positiva do RAGE e consequente morte neuronal. (D. Blum et al, 2001).

Além disso, curiosamente em nossos resultados, quando há a ligação do RAGE com seu antagonista, FPS-ZM1, bloqueando a interação receptor-ligantes, continuamos vendo o aumento da expressão de *AGER*. Esse fato pode ser explicado pela ocorrência de outros mecanismos de modulação do RAGE. Por exemplo, sinalizações intracelulares a jusante do RAGE, e até mesmo a própria diferenciação das células SH-SY5Y com AR; que pode induzir a transcrição de mRNA de *AGER*, causando seu acúmulo nas células. O aumento da expressão do RAGE diante da diferenciação neuronal por AR foi estudado (Kim J et al, 2012), e os resultados indicaram que em células NT2, a expressão do RAGE foi regulada positivamente durante a diferenciação. De mesmo modo, resultados de RT-qPCR sobre a expressão de *AGER* em células SH-SY5Y diferenciadas por AR, também mostraram aumentar sua expressão em comparação a células proliferativas (dados não publicados; experimento conduzido anteriormente em nosso laboratório).

Com a finalidade de investigar o perfil de resposta da expressão do RAGE associada ao dano da 6-OHDA, a expressão das citocinas pró-inflamatórias $IL1\beta$ e $TNF\alpha$ foi avaliada. Nesse experimento, não conseguimos observar diferença estatística na expressão das citocinas, no grupo tratado somente com 6-OHDA em relação ao grupo veículo. Porém, no grupo onde há a inibição do RAGE somada ao dano da 6-OHDA, $TNF\alpha$ mostrou um aumento significativo em sua expressão, enquanto $IL1\beta$ mostrou uma tendência ao aumento. Curiosamente, esses resultados podem ser explicados em conjunto com a proteção conferida às células pelo FPS-ZM1 nas células tratadas com 6-OHDA (Figuras 7 e 8). Resumidamente: (i) no grupo 6-OHDA, a geração de respostas inflamatórias pelas células pode não ser evidenciada, visto que o dano causado pela 6-OHDA resultou em alta taxa de morte celular; (ii) no grupo 6-OHDA + FPS-ZM1, a proteção conferida pelo antagonista do RAGE, consegue manter a sobrevivência celular; mantendo as células responsivas ao dano causado pela 6-OHDA, evidenciando o aumento de mediadores pró-inflamatórios, como $TNF\alpha$ e $IL1\beta$. Entretanto, o aumento do N amostral nesse experimento se mostra necessário futuramente, bem como o acréscimo do grupo VEÍCULO + FPS-ZM1. Buscando entender se este aumento dos parâmetros pró-inflamatórios, está associado ao bloqueio do RAGE pelo FPS-ZM1, protegendo as células e tornando-as responsivas ao dano da 6-OHDA; ou então, exclusivamente um reflexo ao bloqueio do RAGE (VEÍCULO + FPS-ZM1).

RAGE e TLRs compartilham ligantes comuns, vias de sinalização em comum, e ambos estão relacionados a neuroinflamação e neurodegeneração (van Beijnum JR et al, 2008). Diante do resultado da modulação positiva das citocinas não ser dependente da ativação do RAGE em nosso experimento, decidimos investigar se a modulação da expressão de $TLR4$ poderia estar associada a este aumento. Em nossos resultados, $TLR4$ teve sua expressão aumentada nas células SH-SY5Y diferenciadas tratadas com 6-OHDA, que foi prevenida pelo pré-tratamento com FPS-ZM1. Esse dado indica que a modulação da expressão de $TLR4$ está relacionada com a ativação do RAGE, dado consistente aos achados da literatura. Porém, em relação a propagação da inflamação no grupo 6-OHDA + FPS-ZM1, possivelmente, o aumento da expressão de $TNF\alpha$ e $IL1\beta$ em nosso modelo, não está relacionado a nenhum dos receptores aqui estudados. Reforçando o possível reflexo da manutenção da viabilidade celular, conferida pelo FPS-ZM1, encontrado em nossos experimentos. Ainda, a sinalização intracelular de ambos os receptores não foi investigada, e merece atenção em nosso modelo de estudo.

6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

De um modo geral, os resultados obtidos neste trabalho mostram que a 6-OHDA induz o aumento da expressão do RAGE, e que a inibição do RAGE através de seu antagonista FPS-ZM1 atenua os danos causados pela 6-OHDA em um contexto neuronal. Nossos resultados também sugerem que a modulação da expressão de *AGER* parece não depender da ativação do RAGE. Ainda, o aumento da expressão de *TLR4* induzido pela 6-OHDA foi prevenido através da inibição do RAGE. Por fim, os dados sugerem que a regulação positiva da expressão de *IL1 β* e *TNF α* parece não depender de nenhum receptor aqui estudado, e sim, possivelmente são reflexos da manutenção da viabilidade celular conferida pelo FPS-ZM1.

Modelos *in vitro* nos permitem uma investigação preliminar rápida, em comparação aos modelos tradicionais *in vivo*. São de fácil manipulação e controle experimental, porém, são modelos que não recriam a real complexidade das interações celulares, principalmente interações entre as células do SNC. Entretanto, continuam sendo ótimas alternativas para estudos de mecanismos moleculares, visando o papel do agente alvo de estudo para aplicações terapêuticas futuras. Como perspectivas, ainda precisamos elucidar por quais mecanismos moleculares o bloqueio do RAGE atuou diante da proteção conferida as células. Para esse fim, todos os resultados serão complementados com o aumento do N amostral a fim de verificar a consistência dos mesmos. Novas análises envolvendo a ativação do fator de transcrição NF- κ B no modelo de estudo serão realizadas, a fim de verificar se sua ativação está diretamente relacionada com o RAGE. A análise da integridade das mitocôndrias e produção de espécies reativas de oxigênio também será explorada, a fim de investigar possíveis acúmulos de ROS causados por RAGE, podendo resultar em disfunção mitocondrial. A elucidação das vias de sinalização celular do RAGE em nosso modelo, através da imunodeteção de ERK1/2, JNK, MAPK e p38 serão realizadas. Ainda, todas essas análises serão repetidas em cultura primária de neurônios (murina), para posterior publicação dos resultados.

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
- 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.* 2005; doi: 10.1007/s00109-005-0688-7
- Brett J, Schmidt AM, Yan SD, et al. Survey of the distribution of a newly characterized receptor for advanced glycation end products in tissues. *Am J Pathol.* 1993; PMID: 8256857
- C. Henze, C. Earl, J. Sautter, N. Schmidt, C. Themann, A. Hartmann. Brain-derived neurotrophic factor expression in the substantia nigra does not change after lesions of dopaminergic neurons. *Brain Res.* 2005; doi: 10.1007/BF03033922
- D. Blum, S. Torch, N. Lambeng, M. Nissou, AL Benabid, R. Sadoul, JM Verna. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Prog. Neurobiol.* 2001; doi:10.1016/s0301-0082(01)00003-x
- David Blum, Sakina Torch, Marie-France Nissou, Alim-Louis Benabid, Jean-Marc Verna. Extracellular toxicity of 6-hydroxydopamine on PC12 cells. *Neuroscience Letters.* 2000; doi: 10.1016/S0304-3940(00)00948-4.
- Deane R, Singh I, Sagare AP, Bell RD, Ross NT, LaRue B, Love R, Perry S, Paquette N, Deane RJ, Thiyagarajan M, Zarcone T, Fritz G, Friedman AE, Miller BL, Zlokovic BV. A multimodal RAGE-specific inhibitor reduces amyloid β -mediated brain disorder in a mouse model of Alzheimer disease. *J Clin Invest.* 2012; doi: 10.1172/JCI58642
- 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
- Edsjö A, Holmquist L, Pålman S. Neuroblastoma as an experimental model for neuronal differentiation and hypoxia-induced tumor cell dedifferentiation. *Semin Cancer Biol.* 2007; doi:10.1016/j.semcancer.2006.04.005
- 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
- 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
- Forster JI, 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

- 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, 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
- 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
- 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
- Huttunen HJ, Kuja-Panula J, Sorci G, Agneletti AL, Donato R, Rauvala H. Coregulation of neurite outgrowth and cell survival by amphoterin 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- κ B Pathway Activation in Neuroinflammation and Oxidative Stress. *CNS Neurol. Desord.* 2014; doi: 10.2174/1871527313666140806144831.
- 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- κ B connections. *Biofactors.* 2011; doi:10.1002/biof.5520150207
- 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
- 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 β Signaling Pathways. *PLoS One*. 2010; doi: 10.1371/journal.pone.0010092.
- 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
- 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.
- 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
- Michel PP, Hirsch EC, Hunot S. Understanding Dopaminergic Cell Death Pathways in Parkinson Disease. *Neuron*. 2016; doi: 10.1016/j.neuron.2016.03.038.
- Pablo A. Iglesias González, Melisa A. Conde, Verônica González-Pardo, Romina M. Uranga, Gabriela A. Salvador. In vitro 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity: New insights on NF κ B modulation. *Toxicology in Vitro*. 2019; doi: 10.1016/j.tiv.2019.06.019.
- 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
- 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
- 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- α pathway. *Brain*. 2012; doi: 10.1093/brain/aws250
- 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

- 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/acchemneuro.0c00530
- 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.
- Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M. Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature.* 1997; doi: 10.1038/42166.
- 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
- 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.
- Vichai, V. e Kirtikara, K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature Protocols.* 2006; doi: 10.1038 / nprot.2006.179.
- 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.
- 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.
- 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 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.
- 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