UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA

Karine Paula Reichert

EFEITOS DO ALUMÍNIO NA DIFERENCIAÇÃO NEURAL: ENVOLVIMENTO DA SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA

Santa Maria, RS, Brasil 2020

Karine Paula Reichert

EFEITOS DO ALUMÍNIO NA DIFERENCIAÇÃO NEURAL: ENVOLVIMENTO DA SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA

Tese apresentada ao Programa de Pósem Ciências **Biológicas**: Graduação Bioquímica Toxicológica do Centro de Naturais Ciências Exatas. e da Universidade Federal de Santa Maria, como requisito para obtenção do grau de em Ciências **Biológicas:** Doutor Bioquímica Toxicológica.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Vera Maria Melchiors Morsch

Santa Maria, RS, Brasil 2020.

Reichert, Karine Paula EFEITOS DO ALUMÍNIO NA DIFERENCIAÇÃO NEURAL: ENVOLVIMENTO DA SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA / Karine Paula Reichert.- 2020. 158 p.; 30 cm Orientadora: Vera Maria Melchiors Morsch Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, RS, 2020 1. Alumínio 2. CPNs 3. sistema purinérgico 4. receptores 5. citocinas I. Morsch, Vera Maria Melchiors II. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, KARINE PAULA REICHERT, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Tese) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Universidade Federal de Santa Maria Centro de Ciências Naturais e Exatas Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Tese de Doutorado

EFEITOS DO ALUMÍNIO NA DIFERENCIAÇÃO NEURAL: ENVOLVIMENTO DA SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA

elaborada por

Karine Paula Reichert

como requisito para obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof.^a Dr.^a Vera Maria Melchiors Morsch (Presidente/Orientador - UFSM)

Sara Marcheson Oliveira

Prof.^a Dr.^a Sara Marchesan de Oliveira - Parecer (1° membro da banca - UFSM)

lario Spanivel

Prof.^a Dr.^a Roselia Spanevello - Parecer (3° membro da banca - UFPel)

Prof^a. Dr^a. Margarete Bagatini - Parecer (4° membro da banca – UFFS)

Santa Maria, 23 de março de 2020.

Prof.^a Dr.^a Denise Bohrer - Parecer (2° membro da banca - UFSM)

Dedico esta tese às pessoas mais importantes da minha vida: meus pais Alberi e Redir e minha irmã Jaqueline, meus grandes exemplos de vida, que sempre me incentivaram a lutar pelos meus sonhos e, principalmente, nunca desistir. Dedico esta vitória a vocês, com todo meu amor!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por iluminar meus passos e me dar força e coragem para sempre seguir em frente.

A minha família, meu pai Alberi, minha mãe Redir e minha irmã Jaqueline, pois sem o incentivo e apoio dessas pessoas tão especiais eu não teria chegado até aqui. Muito obrigada pelo amor e confiança a mim depositados. Vocês são meus maiores exemplos de vida, e sei que nunca estarei sozinha tendo vocês!

A minha orientadora, professora Vera, pela oportunidade, confiança, paciência, dedicação e por todos os ensinamentos transmitidos. A ti tenho grande admiração, tanto pessoal quanto profissional. Muito obrigada!

A professora Maria Rosa, pela oportunidade que me deste, junto com minha orientadora, em fazer parte deste grupo de pesquisa. Agradeço pela atenção, confiança e apoio.

A Prof. Dr^a Cinthia Melazzo pela oportunidade de desenvolver parte deste trabalho em seu laboratório.

A professora Micheli Pillat, sua ajuda e apoio foram muito importantes. Estendo meu agradecimento ao Prof. Dr. Henning pela dedicação e incentivo nos trabalhos.

Ao pessoal do lab Enzitox, por tornar aqueles momentos difíceis em alegria e fazer tudo parecer mais fácil. Muito obrigada pela ajuda e carinho.

Aos meus amigos recentes e de longa data, pela compreensão e apoio. "Abençoados os que possuem amigos, os que os têm sem pedir. Porque amigo não se pede, não se compra, nem se vende. Amigo a gente sente!"

Aos membros da banca examinadora deste trabalho, pelos ensinamentos, disponibilidade e contribuições fundamentais para o aperfeiçoamento deste trabalho.

A UFSM e ao programa de pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica pela oportunidade.

A CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro.

Enfim, a todas as pessoas que me ajudaram de alguma forma para que eu chegasse até aqui.

Meu carinho e gratidão!

" ${\mathcal E}$ assim, depois de muito esperar, num dia como outro qualquer, decidi triunfar...

Decidi não esperar as oportunidades e sim, eu mesmo buscá-las.

Decidi ver cada problema como uma oportunidade de encontrar uma solução.

Decidi ver cada deserto como uma possibilidade de encontrar um oásis.

Decidi ver cada noite como um mistério a resolver.

Decidi ver cada dia como uma nova oportunidade de ser feliz.

Naquele dia descobri que meu único rival não era mais que minhas próprias limitações e que enfrentá-las era a única e melhor forma de as superar.

Naquele dia, descobri que eu não era o melhor e que talvez eu nunca tivesse sido.

Deixei de me importar com quem ganha ou perde.

Agora me importa simplesmente saber melhor o que fazer.

Aprendi que o difícil não é chegar lá em cima, e sim deixar de subir.

Aprendi que o melhor triunfo é poder chamar alguém de "amigo".

Descobri que o amor é mais que um simples estado de enamoramento, "o amor é uma filosofia de vida".

Naquele dia, deixei de ser um reflexo dos meus escassos triunfos passados e passei a ser uma tênue luz no

presente.

Aprendi que de nada serve ser luz se não iluminar o caminho dos demais.

Naquele dia, decidi trocar tantas coisas...

Naquele dia, aprendi que os sonhos existem para tornar-se realidade.

E desde aquele dia já não durmo para descansar... simplesmente durmo para sonhar."

Walt Disney

SUMÁRIO

1. INTRODU	UÇÃO	26	
2.REVISÃO	BIBLIOGRÁFICA	28	
2.1 Alu	mínio	28	
2.1.1	Histórico e obtenção	28	
2.1.2	Características físico-químicas	29	
2.1.2.	Principais formas de exposição ao alumínio	29	
2.1.3.	Biodisponibilidade	33	
2.1.4.	Toxicologia	35	
2.2. Alu	mínio: condições patológicas	37	
2.2.1.	Insuficiência renal	37	
2.2.2.	Doença de Alzheimer	38	
2.3. Neu	rogênese	39	
2.3.1.	Perspectiva histórica	39	
2.3.2.	Células-tronco e Células progenitoras neurais	40	
2.3.1	Desenvolvimento do sistema nervoso central	41	
2.3.3.	Estágios da neurogênse: proliferação, migração e diferenciação das célula	S	
progenit	toras neurais	42	
2.3.4	Fatores que afetam a neurogênese	45	
2.3.5	Neuroesferas como modelo de neurogênese in vitro	47	
2.4. Sina	alização purinérgica	49	
2.4.1	Histórico e função	49	
2.4.2	Nucleotídeos	49	
2.4.3	Ectoenzimas	50	
2.4.4	Receptores	52	
2.4.5	Sinalização purinérgica na neurogênese	54	
2.4.6	Neurodegeneração, sinalização purinérgica e neuroinflamação: uma		
possível	via mecanística	55 - 0	
3. OBJETIV	OS	59 - 0	
3.1 Obj	etivo geral	59 -	
3.2 Obj	etivos especificos	59 59	
4. ARTIGON	S E MANUSCRITOS	60	
Artigo 1: I	Publicado	60 0 1	
Artigo 2: I	Publicado	84 °=	
Manuscrit	to 2: Em fase de submissão 1	07	
5. DISCUSSAO			
6. CONCLU		41	
7. PERSPEC	CTIVAS FUTURAS	42	
8. REFERE	NCIAS 1	43 	
ANEXOS		53	

RESUMO

Tese de Doutorado

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica Universidade Federal de Santa Maria EFEITOS DO ALUMÍNIO NA DIFERENCIAÇÃO NEURAL: ENVOLVIMENTO DA SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA

Autora: Karine Paula Reichert Orientadora: Prof^a. Dr^a. Vera Maria Melchiors Morsch Santa Maria, 23 de março de 2020.

O Alumínio (Al) é considerado o metal mais abundante na natureza. Desta forma, os seres vivos tornam-se susceptíveis a uma exposição constante a este elemento. A forma catiônica trivalente do Al, Al^{3+} , é bem conhecida por ser a espécie mais tóxica para os sistemas biológicos. Inclusive, alguns estudos mostram que a concentração de Al³⁺ em cérebro humano pode estar associada com a etiologia de doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer (DA). Entretanto, o mecanismo subjacente à exposição ao Al e a neuropatogênese da DA permanece inconsistente. Neste sentido, o sistema purinérgico representa uma importante via de sinalização envolvida em mecanismos neuromodulatórios do SNC, além de emergir respostas inflamatórias pela ação de purinnoreceptores específicos, frente a algum estímulo externo, como o Al. No presente estudo avaliou-se os efeitos do Al^{3+} (0,1 – 100 µM) sobre a sinalização purinérgica durante a neurogênese de células precursoras neurais (CPNs) in vitro e, em modelo animal de exposição crônica ao Al (50 e 100 mg / kg de AlCl₃). Para explorar a ação do Al³⁺ no desenvolvimento neural, as CPNs foram isoladas de embriões obtidos de camundongos prenhas. As CPNs proliferam em condições específicas, na presenca dos fatores de crescimento EGF e FGF-2, e formam aglomerados de CPNs, as neuroesferas. A partir dos resultados obtidos, mostrou-se que o Al³⁺ teve uma função decisiva na inibição da proliferação de CPNs durante a diferenciação neural e, ainda foi capaz de induzir apoptose celular. O Al³⁺ também reduziu a migração das neuroesferas e, consequentemente a determinação do fenótipo neural. A análise por citometria de fluxo e imunocitoquímica mostrou que o Al³⁺ promoveu uma diminuição na expressão do marcador de neurônios imaturos ß3-tubulina seguido de um aumento na coexpressão da Nestina e GFAP, indicando a prevalência de CPNs indiferenciadas após a exposição ao Al³⁺. Além disso, mostrou-se que o Al³⁺ se adere ao citoplasma das neuroesferas, reduzindo a liberação extracelular de ATP e, diminuindo a hidrólise sequencial deste nucleotídeo pelas enzimas NTPDase e 5'-nucleotidase, respectivamente. Além disso, a redução na liberação do ATP pelo Al³⁺ foi suficiente para diminuir a expressão dos receptores P2Y1 e A2A nas neuroesferas diferenciadas. Esses receptores são cruciais para a proliferação e autorenovação de CPNs durante o desenvolvimento do cérebro. Por outro lado, no modelo de exposição oral crônica (30 dias) ao Al³⁺ em camundongos Swiss, na forma de AlCl₃, mostrouse que o metal foi capaz de reduzir o peso cerebral e se acumular no hipocampo de animais tratados com 100 mg / kg do sal. Ainda, o Al^{3+} causou déficits de memória e danos ao DNA. A hidrólise do ATP também foi afetada pelo tratamento com o metal, indicando um aumento nas atividades das enzimas NTPDase, 5'-nucleotidase e ADA. Além disso, o Al³⁺ aumentou a densidade dos receptores P2X7 e A2A, assim como da citocina pró-inflamatória IL-1β. Tomados em conjunto, os dados obtidos nesse estudo indicam que o Al³⁺ causou danos celulares e inibiu a diferenciação da CPNs, possivelmente devido a alterações na sinalização purinérgica. Ainda, a exposição ao metal de forma crônica, provocou prejuízos mnemônicos e neuroinflamação associada à via purinérgica.

Palavras-chave: Alumínio, CPNs, memória, sistema purinérgico, receptores, citocinas.

ABSTRACT

Thesis of Doctor's Degree

Post-Graduate Program in Biological Sciences: Toxicological Biochemistry Federal University of Santa Maria, RS, Brazil EFFECTS OF ALUMINUM IN NEURAL DIFFERENTIATION: INVOLVMENT OF PURINERGIC SIGNALLING

Author: Karine Paula Reichert Advisor: Vera Maria Melchiors Morsch

Aluminum (Al) is considered the most abundant metal in enviorment. In this way, all life forms are susceptible to constant exposure to this element. The trivalent cationic form of Al, Al^{3+} , is well known for being the most toxic species for biological systems. Some studies even show that the concentration of Al^{3+} in the human brain may be associated with the etiology of neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's disease (AD). However, the mechanism underlying to Al exposure and the neuropathogenesis of AD remains unclear. The purinergic system represents an important signaling pathway involved in CNS neuromodulatory mechanisms, in addition to emerging inflammatory responses through the action of specific purinoreceptors, in front of the external stimuli, such as Al. Thus, the present study evaluated the effects of Al^{3+} (0.1 – 100 μ M) on purinergic signaling during neurogenesis of neural precursor cells (NPCs) in vitro and, in animal model of chronic exposure to Al (50 – 100 mg / kg of AlCl₃). For investigate the role of Al^{3+} on neural development, CPNs were isolated from embryos obtained from pregnant mice. NPCs proliferate under specific conditions, in the presence of growth factors EGF and FGF-2, and form clusters of CPNs, the neurospheres. The results show that Al^{3+} played a decisive role in inhibiting the proliferation of NPCs during neural differentiation and, induced apoptosis in cells. Al^{3+} also reduced the migration of neurospheres and, consequently, the determination of the neural phenotype. Analysis by flow cytometry and immunocytochemistry showed that Al³⁺ promoted a decrease in the expression of the immature neuron marker \beta3-tubulin followed by an increase in the coexpression of Nestina and GFAP, indicating the prevalence of NPCs after exposure to Al³⁺. In addition, it was shown that Al³⁺ adheres to the cytoplasm of neurospheres, reducing the extracellular release of ATP, and decreasing the sequential hydrolysis of this nucleotide by NTPDase and 5'nucleotidase enzymes activities, respectively. The reduction in ATP release by Al³⁺ was sufficient to decrease the expression of P2Y1 and A2A receptors in differentiated neurospheres. These receptors are crucial for the proliferation and self-renewal of NPCs during brain development. On the other hand, in the model of chronic oral exposure (30 days) to Al^{3+} in Swiss mice, in the form of AlCl₃, the metal was able to reduced brain weight and accumulated in the hippocampus of animals treated with 100 mg / kg of salt. Memory deficits and DNA damage induced by Al³⁺ were observed. The hydrolysis of ATP was also affected by the treatment with the metal, indicating an increase in the NTPDase, 5'-nucleotidase and ADA enzymes activities. In addition, Al³⁺ increased the density of P2X7 and A2A receptors, as well as the proinflammatory cytokine IL-1β. Taken together, the data obtained in this study show that Al³⁺ causes cell damage and inhibits the differentiation of NPCs, possibly due to changes in purinergic signaling. In addition, chronic exposure to metal in vivo caused mnemonic damage and neuroinflammation associated with the purinergic pathway.

Keywords: Aluminum, NPCs, memory, purinergic system, receptors, cytokines.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Produção estimada de Al.	
Figura 2. Esquema de estação de tratamento da água potável	
Figura 3. Hidrólise do Al em função do pH	
Figura 4. Principais rotas pelas quais o Al pode ser transportados através de me	embranas
celulares ou endotélio celular	35
Figura 5. Formas de exposição humana ao Al e seus efeitos no organismo	
Figura 6. Formação do tubo neural	42
Figura 7. Neurogênese no período embrionário	43
Figura 8. Fases do ciclo celular.	44
Figura 9. Formação das neuroesferas in vitro	48
Figura 10. Cascata das ectonucleotidases.	51
Figura 11. Sinalização purinérgica.	54
Figura 12. Papel do P2X7 na neuroinflamação.	57
Figura 13. Efeitos do Al ³⁺ <i>in vitro</i>	136
Figura 14 . Efeitos do Al ³⁺ in vivo	139

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- Al Alumínio
- A1 Receptor A1 de adenosina
- A2A Receptor A2A de adenosina
- A2B Receptor A2B de adenosina
- A3 Receptor A3 de adenosina
- ADA Adenosina desaminase
- ADO Adenosina
- ADP Difosfato de adenosina
- AMP Monofosfato de adenosina
- AMPc Monofosfato ciclíco de adenosina
- ATP Trifosfato de adenosina
- B27- Fator de crescimento B 27
- Ca²⁺ Cálcio divalente
- CD39 NTPDase
- CD73 5´-nucleotidase
- CPNs Células precursoras neurais
- DA Doença De Alzheimer
- DNA Ácido desoxiribonucleico
- EGF Fator de crescimento epidermal
- E-NPP Ectonucleotideo pirofosfatase e/ou fosfodiesterases
- E-NTPDase Ectonucleosideo trifosfato difosfoidrolases
- E-5'-NT Ecto-5'-nucleotidases
- FGF Fator de crescimento fibrilar
- GFAP Proteína fibrilar glial ácida
- IL-1 β Interleucina-1 beta
- **IL-10** Interleucina-10
- P1R Receptor de adenosina
- P2R Receptor de ATP
- P2X7 Receptor de ligação para ATP
- P2Y1 Receptor de ligação para ATP e AMP
- SNC Sistema nervoso central

APRESENTAÇÃO

Os resultados que compõem esta tese estão apresentados sob a forma de artigo original publicado em revista internacional, manuscrito submetido e manuscrito em fase de submissão, o qual se encontra no item Artigo e Manuscritos. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências encontram-se no próprio artigo ou manuscritos e representam a íntegra deste estudo.

O item Conclusões encontra-se no final desta tese e apresenta interpretações e comentários gerais sobre o artigo e manuscritos contidos neste trabalho.

As Referências referem-se somente às citações que aparecem nos itens Introdução, Revisão Bibliográfica, Discussão e Conclusões desta tese.

A seguir encontra-se uma lista com as publicações aceitas ou em fase de submissão: 1) Karine P. Reichert, Maria Rosa C. Schetinger, Micheli M. Pillat, Nathieli B. Bottari, Tais V. Palma, Jessie M. Gutierres, Henning Ulrich, Cinthia M. Andrade, Christopher Exley, Vera M. M. Morsch. Aluminum affects neural phenotype determination of embryonic neural progenitor cells. Archives of Toxicology (2019) 31363819. DOI: 10.1007/s00204-019-02522-6.

2) Karine P. Reichert, Micheli M. Pillat, Maria Rosa C. Schetinger, Nathieli B. Bottari, Tais V. Palma, Charles E. Assmann, Jessie M. Gutierres, Henning Ulrich, Cinthia M. Andrade, Christopher Exley, Vera M. M. Morsch. Aluminum-induced alterations of purinergic signalling in embryonic neural progenitor cells. Chemosphere (2020) 32345545. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2020.126642.

3) Karine P. Reichert, Nathieli B. Bottari, Maria Rosa C. Schetinger, Anielen Dutra, Charles E. Assmann, Pauline da Costa, Thauan Faccin Lopes, Graciela Heidrich, Valderi Dressler, Vera M. Morsch. Aluminum impairs short and long-term memory and alters purinergic signaling in hippocampus of mice. Em fase de submissão para o periódico Toxicology.

1. INTRODUÇÃO

O Alumínio (Al) é o metal mais abundante no meio ambiente, porém sem nenhuma atividade biológica comprovada. Muito pelo contrário, fortes evidências científicas têm demonstrado que a exposição contínua a compostos de Al pode ser um fator de risco para o desenvolvimento de déficits neurológicos (BONDY; CAMPBELL, 2017). A exposição a este elemento ocorre através do ar, da água, da dieta e de diversos produtos da indústria farmacêutica e cosmética (EXLEY, 2013).

A toxicidade do Al depende da sua biodisponibilidade, a qual está relacionada a sua espécie química individual. Sabe-se que a forma catiônica trivalente, Al³⁺, é considerada a forma mais tóxica para os sistemas biológicos (BERTHON, 2002). O íon Al³⁺ predomina em condições ácidas, o que facilita sua absorção pelo trato gastrointestinal e subsequente excreção ou deposição nos mais diversos órgãos e tecidos (YOKEL, 2012).

A maior parte do Al ingerida é excretada pelo organismo, através dos rins, em condições fisiológicas normais (ATSDR, 2008). Porém, esta condição é agravada em pacientes com insufiência renal crônica (SENG et al., 2011). O Al³⁺ atravessa facilmente a barreira hematoencefálica, o que torna o sistema nervoso central (SNC) vulnerável aos efeitos da exposição ao metal (YOKEL, 2006). No SNC, o metal pode induzir alterações morfológicas e funcionais nas principais estruturas cerebrais, resultando em déficits cognitivos, principalmente sobre a memória e a aprendizagem (BONDY, 2016).

Alguns estudos epidemiológicos têm levantado a hipótese de que a concentração elevada de Al³⁺ em cérebro humano pode estar associada com a etiologia de doenças neurodegenerativas, em particular, a doença de Alzheimer (DA) (BAKAR et al., 2010).

A Al também pode interferir na neurotransmissão purinérgica, uma vez que o ATP é um neurotransmissor excitatório (ABBRACCHIO; BURNSTOCK, 1998), co-liberado na fenda sináptica junto com vários neurotransmissores (BURNSTOCK, 2008; ZIMMERMANN, 2008). Além disso, o Al³⁺ possui grande afinidade em se ligar a grupos fosfato, como do ATP, o que facilita a difusão do íon no SNC e periférico (CARDIANO et al., 2018).

As doenças neurodegenerativas afetam a neurogênese, o que dificulta a regeneração do SNC frente a alguma lesão (CAMPBELL, 2004). A neurogênese adulta ocorre no hipocampo, que é a estrutura cerebral mais afetada na DA e representa um alvo para o acúmulo de Al³⁺. Porém é no período fetal e pós-natal que a taxa neurogênica é mais abundante. A neurogênese é a formação de novos neurônios através da diferenciação das células progenitoras neurais (CPNs) (GAGE, 2000). Estudos evidenciaram alterações na homeostase de CPNs em modelo animal de demência, resultando na redução da sobrevivência e proliferação destas células (DONOVAN et al., 2006; HAUGHEY et al., 2002). As CPNs podem ser isoladas do cérebro durante seu desenvolvimento e, na presença de condições específicas podem se multiplicar em cultura e formar agregados celulares, chamados de neuroesferas, que irão definir o destino neural sob influência do ambiente local (GAGE, 2000). Assim, é possível analisar *in vitro* os efeitos sobre a neurogênese de fatores neurotóxicos, que possam estar envolvidos na fisiopatologia da DA, como o Al³⁺.

Tendo em vista que a incidência da DA vem tomando elevadas proporções no mundo inteiro e que um dos fatores de risco ambiental que parece estar relacionado com a etiologia desta doença é a exposição ao Al, torna-se relevante investigar os efeitos de diferentes concentrações de Al³⁺ sobre a neurogênese em um modelo de neuroesferas *in vitro*, bem como avaliar mecanismos subjacentes da exposição ao Al que possam estar envolvidos com a neurodegeneração *in vivo*.

Neste contexto, a hipótese deste estudo é investigar se a exposição ao Al³⁺ afeta a neurogênese *in vitro* e parâmetros cognitivos *in vivo*, através do possível envolvimento do sistema purinérgico nestes processos, na tentativa de propor um mecanismo ainda pouco investigado nesta área.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Alumínio

2.1.1 Histórico e obtenção

O Alumínio (Al) é considerado um elemento não essencial e, de todos os metais é o mais abundante na natureza, representando cerca de 8% da crosta terrestre. Há pelo menos sete milênios, persas já produziam utensílios de barro que continha o óxido de alumínio, a alumina. Mas foi apenas no início do século XIX, que o britânico Humphrey Davy realizou a primeira obtenção de uma liga de ferro e Al. Alguns anos mais tarde, em 1821, o francês Pierre Berthier descobriu a bauxita, o minério mais comum de alumínio, no sul da França. E, logo em seguida, no ano de 1825, o químico dinamarquês Hans Oersted isolou o alumínio de outra maneira, reduzindo o cloreto de alumínio com potássio (DAVIS, 2010).

No Brasil, as primeiras referências sobre a obtenção do alumínio datam em 1945, na cidade de Ouro Preto (MG), onde foi produzido o primeiro lingote de Al do Hemisfério Sul. A principal forma de extração do metal é a partir da bauxita, um minério de cor marromavermelhada que é purificada para que se possa extrair a alumina (Al₂O₃). A partir da alumina ocorre o processo de sua transformação em alumínio metálico (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DO ALUMÍNIO, 2019). A reserva brasileira de bauxita é a 4ª maior do mundo e a produção brasileira de Al primário ocupa a 10ª posição no ranking mundial (Figura 1) (ABAL, 2018).



Figura 1. Produção estimada de Al. Fonte: ABAL, 2018.

Desde o início de sua produção no Brasil, o Al passou a integrar e abranger diversos ramos e atividades do cotidiano. Compostos de Al são utilizados diariamente em uma grande variedade de aplicações industriais. E, por ser um metal muito reativo em sua forma livre (Al³⁺), encontra-se combinado com outros elementos, principalmente hidróxidos, silicatos, sulfatos e

fosfatos, podendo ser liberado no ambiente através de processos naturais e/ou antropogênicos (JURINAK; BAES; MESMER, 1976; YOKEL, 2012).

2.1.2 Características físico-químicas

O Al é um elemento químico pertencente ao terceiro período e ao décimo terceiro grupo (3A) da Tabela Periódica dos Elementos Químicos. É um elemento que está incluso na série química dos metais representativos, apresentando número atômico 13 e massa atômica 27 u.

Na temperatura ambiente é sólido e possui aspecto cinza prateado e fosco, devido a camada de óxidos formada em contato com o ar, a qual o protege de oxidações posteriores, conferindo-lhe uma elevada resistência a corrosão. A leveza, também está entre as principais características e vantagens deste metal, apresentando uma densidade de 2,73 g/cm³.

Possui ponto de fusão de 660 °C, relativamente baixo, quando comparado a outros metais, permitindo ser altamente dúctil e maleável. Além disso, o metal Al apresenta elevada condutividade térmica, é relativamente mole e pouco resistente quando puro, mas ao formar ligas com outros metais, torna-se consideravelmente mais resistente (ATKINS et al., 2010; LEE, 1999).

O Al em sua forma iônica, Al³⁺, é um cátion pequeno e altamente carregado, e essa alta relação carga/raio confere-lhe um elevado poder polarizador, sendo caracterizado como um ácido de Lewis forte. O Al também interage com espécies ricas em elétrons, como o flúor e o cloro formando compostos trivalentes, como é o caso do sal inorgânico bastante comum, o AlCl₃ (AZEVEDO; CHASIN, 2003). Diferentemente de outros sais iônicos, o AlCl₃ apresenta caráter covalente, responsável pela condução de eletricidade, no seu estado líquido.

Devido às propriedades físico-químicas deste metal, ele é amplamente empregado em nível industrial, principalmente na fabricação de utensílios domésticos, medicamentos e vacinas, aditivos alimentares, desodorantes e ainda os sais de Al são utilizados no tratamento da água potável (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DO ALUMÍNIO, 2019).

2.1.2. Principais formas de exposição ao alumínio

Uma vez que o Al é considerado um metal onipresente no ambiente, a exposição dos seres humanos a ele pode ocorrer de diversas formas, como:

- por meio do ar;
- por meio do consumo de alimentos;
- por meio da água subterrânea e potável;

- por meio do uso de alguns produtos farmacêuticos;
- por meio de cosméticos (KLOTZ et al., 2017).

O ar que respiramos contribui significativamente para a carga corporal do Al. O Al entra na atmosfera como um dos principais constituintes de partículas atmosféricas originadas pela erosão natural do solo, atividades de mineração ou agrícolas, erupções vulcânicas ou ainda pela combustão do carvão. As concentrações atmosféricas de Al apresentam consideráveis variações temporais e espaciais, por exemplo, em áreas com intensa industrialização os níveis de Al no ar chegam a mais de 1 μ g / m³ (WHO, 2010). Além disso, o Al é um componente primário de muitas formulações de aerossóis e grande parte desse alumínio pode ficar retida no pulmão e epitélio olfativo (WHO, 2016).

A exposição ao alumínio através da respiração também pode ser influenciada por atividades específicas, incluindo a exposição no local de trabalho, principalmente oriundos da poeira do solo e em trabalhos de soldagem, assim como a exposição habitual, por exemplo, através do cigarro (EXLEY, 2013).

A dieta também é uma forma de exposição ao Al. Como o Al é o metal mais abundante na crosta terrestre, ele está presente nos alimentos *"in natura"* espontaneamente (PENNINGTON; SCHOEN, 1995). A alimentação representa uma das principais fontes do Al ingerido, sendo que a quantidade do metal presente em cada alimento pode variar muito, dependendo da variedade dos vegetais e das condições do solo. Assim sendo, alguns alimentos tem um grande potencial em acumular Al, é o caso de ervas e chás, que podem conter mais do que 500 μ g Al/g (SONI et al., 2001).

Outro fator que contribui para o acúmulo do metal em alimentos não processados é a ocorrência da chuva ácida. Esta, favorece o decréscimo do pH do solo, permitindo a mobilidade e absorção do Al pelas plantas, assim como pode alcançar os lençóis d'água e contaminar rios e lagoas de água doce (ATSDR, 2008a). Inclusive, o uso contínuo de fertilizantes e adubos nitrogenados contribui ainda mais para a acidificação do solo (ZHAO; SHEN, 2018). Porém os alimentos naturais possuem concentrações bem mais baixas de Al do que os alimentos processados (OGIMOTO et al., 2016).

Os compostos de Al são, amplamente, utilizados pelas indústrias alimentícias (OGIMOTO et al., 2016; STAHL; TASCHAN; BRUNN, 2011). Nestes alimentos processados, as principais fontes de Al são os aditivos, representando a principal via de exposição ao Al para o público em geral, excluindo aqueles que não usam medicamentos a base de Al. Os principais aditivos alimentares utilizados são: fosfato ácido de Al e sódio como agente fermentador em

produtos de panificação e biscoitos, fosfato básico de Al e sódio como agente emulsificante no processamento de queijos, sulfato de Al como agente floculante no tratamento da água potável e pigmentos e corantes de Al usados para colorir produtos secos como, gomas de mascar e balas (YOKEL, 2012). Porém, em virtude dos crescentes relatos sobre a relação entre a exposição ao Al e o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, a ANVISA proibiu recentemente, no ano de 2019, o uso de aditivos alimentares contendo este elemento (ANVISA, 2019).

Além disso, os utensílios domésticos que contém Al também representam uma forma de exposição dos seres humanos ao metal. Esta forma de exposição, depende da composição química dos alimentos adicionados, as condições de preparo como temperatura e tempo de cozimento, o pH dos alimentos e a presença de algumas substâncias, tais como ácidos orgânicos e sais, que podem facilitar sua absorção (ZHAO; SHEN, 2018).

O uso de embalagens, também pode favorecer o contato com Al. A utilização do metal no armazenamento de alimentos cozidos, congelados e embalados aumentou muito nos últimos anos (TIETZ et al., 2019). De forma geral, a quantidade de Al ingerida através de panelas, utensílios e embalagens pode aumentar a quantidade de Al nos alimentos; no entanto, a magnitude desse aumento geralmente não é de grande importância.

Além disso, o Al é um componente natural presente tanto nas águas superficiais quanto subterrâneas. A concentração de Al nas águas naturais pode variar muito, dependendo de vários fatores físico-químicos e mineralógicos. As concentrações de Al dissolvido em águas com valores de pH quase neutros geralmente variam de 0,001 a 0,05 mg / L, mas aumentam para 0,5-1 mg / L em águas mais ácidas ou em águas ricas em matéria orgânica (WHO, 2010).

O Al pode ocorrer em várias formas diferentes na água, como espécies hidroxi mono e poliméricas, soluções, géis coloidais e precipitados. Além disso, pode formar complexos com vários compostos orgânicos, como ácidos húmicos ou fúlvicos e ligantes inorgânicos, como fluoreto, cloreto e sulfato (ATSDR, 2008). Na água pura, o Al tem uma solubilidade mínima na faixa de pH de 5,5 a 6,0, sendo que as concentrações totais de Al dissolvido aumentam a valores de pH mais baixos (SCHAEFER; JAHREIS, 2006).

Além disso, o Al é utilizado na maioria das estações de tratamento de água de todo o mundo. Os níveis de Al na água potável variam de acordo com os níveis encontrados na água de origem e se os coagulantes de Al são usados durante o tratamento da água (ATSDR, 2008). Sais de Al, geralmente sulfato de Al, são utilizados como agentes floculantes, de forma a reduzir os níveis de matéria orgânica, microorganismos e turbidez nas etapas iniciais do tratamento da água para o abastecimento, como mostra a Figura 2.



Figura 2. Esquema de estação de tratamento da água potável. Fonte: Sabesp, 2020.

Atualmente, o valor padrão de potabilidade estabelecido pelo Ministério da Saúde para a concentração de Al é de 0,2 mg / L, o que contribui em cerca de 4% para a exposição oral total ao Al (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

O Al também é um componente de muitos medicamentos. Dentre estes incluem antiácidos, aspirinas tamponadas e como adjuvante de vacinas e tratamentos alérgicos, nos quais até 1 mg de Al é injetado junto com um antígeno ou alérgeno (EXLEY, SIESJÖ; ERIKSSON, 2010). As pessoas que fazem uso regular de antiácidos e analgésicos tamponados contendo Al podem chegar a uma ingestão de 5 g de Al / dia (OMS, 1997).

Outro setor, que muitas vezes nos passa desapercebido, é a aplicação do Al em diversos tipos de cosméticos aplicados topicamente à pele, cabelos e relacionados a produtos de higiene, intencionalmente, quando o Al é adicionado às formulações ou involuntariamente quando o Al está presente como contaminante (TIETZ et al., 2019). Os antitranspirantes são um dos maiores contribuintes para os níveis elevados de Al no organismo, pois seu uso envolve a aplicação de cerca de 2 g de Al, comumente na forma de Al₂Cl(OH)₅, na pele todos os dias, permanecendo até 24 hs, até que seu resíduo seja lavado da superfície da pele (EXLEY, 1998; PINEAU et al., 2012). Da mesma forma, dados semelhantes podem ser calculados para muitos outros produtos aplicados à superfície da pele, como protetores solares, cremes para o corpo, loções para bronzear e maquiagem (LIU; KATHARINE HAMMOND; ROJAS-CHEATHAM, 2013).

Em suma, todas as formas de exposição ao Al aqui citadas, contribuem para um possível aumento na concentração deste elemento, nos diferentes orgãos e tecidos do corpo humano. A tabela abaixo mostra as concentrações de Al encontradas em alguns órgãos e tecidos de indivíduos saudáveis. Porém, um fator determinante para o acúmulo do Al, é a regularidade com que somos expostos ao metal, assim como a capacidade individual do nosso organismo em excretar o metal.

Tecido	Faixa de concentração (mg / kg)
Pulmões	20
Ossos	5 - 10
Cérebro	0,25 - 0,75
Sangue	0,007–0,01
Outros	0,3-0,8

Tabela 1. Faixas de concentração de alumínio encontradas em indivíduos saudáveis. Fonte: ATSDR, 2008.

2.1.3. Biodisponibilidade

Apesar da principal fonte de ingestão de Al ser o consumo de alimentos processados e de antiácidos contendo Al, é na água potável que este elemento possui uma maior biodisponibilidade (SCHAEFER; JAHREIS, 2006). A biodisponibilidade, bem como a toxicidade do Al depende da sua espécie química individual, que por sua vez, é influenciada pelo pH, temperatura e presença de agentes complexantes (GIORDANO; COSTANTINI, 1993). O gráfico abaixo mostra as principais espécies químicas de Al em função do pH, destacando a forma iônica solúvel, Al³⁺, em pH ácido e hidróxido de Al precipitado, Al(OH)₃ em pH neutro (BAES; MESMER, 1986).



Figura 3. Hidrólise do Al em função do pH. A forma iônica (Al³⁺) prevalece na faixa de pH ácido, enquanto em pH neutro a forma predominante é o hidróxido de Al precipitado (Al(OH)₃). Fonte: Baes e Mesmer, 1986.

Nos últimos anos, várias organizações de saúde tem sugerido limites de ingestão de Al. A decisão mais recente partiu da Comissão FAO/WHO de Especialistas em Aditivos Alimentares (JECFA), a qual estabeleceu um valor tolerável de ingestão semanal correspondente a 2 mg de Al / kg de peso corporal (WHO, 2019).

Porém, a ingesta diária dos seres humanos é de 2 a 40 mg de Al / dia tanto por via oral como por inalação através de alimentos, utensílios domésticos, medicamentos, partículas de pó e através da água potável (WHO, 2019). A exposição geral da população ao Al compreende níveis moderados, mas devido à baixa absorção no trato gastrointestinal os problemas são minimizados.

A maior parte do Al ingerida é excretada pelo organismo, através dos rins, em condições fisiológicas normais (JOUHANNEAU et al., 1997). Porém, 1% da ingestão diária do metal é absorvida pelo trato gastrointestinal, devido ao pH ácido, e ainda, fatores dietéticos que podem aumentar sua solubilidade, como por exemplo, o ácido cítrico, ácido ascórbico e ácido láctico (BERTHON, 2002).

De forma geral, a absorção do Al depende da forma de exposição e/ou ingestão, da forma química do metal e da habilidade gastrointestinal para dissolver o Al considerando acidez das secreções gástricas (LIBERAL, 2003; RONDON-BARRAGÁN et al., 2007). No estômago, o baixo pH (\approx 2-3) permite a dissolução completa dos compostos de Al que seriam insolúveis em outras regiões do organismo. Esse processo gera o alumínio livre, Al³⁺, que fica disponível para novas ligações e possível absorção (DEVOTO; YOKEL, 1994).

Assim que é absorvido, o Al não é metabolizado e acaba sendo excretado de forma inalterada. No entanto, este metal pode se combinar facilmente com outras moléculas do organismo, e seu destino é determinado a partir da afinidade do Al com possíveis ligantes disponíveis, assim como do metabolismo individual de cada pessoa (ATSDR, 2006). Estas moléculas incluem peptídeos, ácidos nucléicos e aminoácidos, de forma que associadas ao Al, facilitam tanto sua absorção, quanto sua mobilidade a partir de transportadores específicos presentes nas células (DELONCLE et al.,1990).

Nos sistemas biológicos, o sangue é a principal rede de distribuição do Al sistêmico para os diferentes órgãos e tecidos. A maior parte do Al³⁺ presente no sangue, pode se ligar a transferrina (cerca de 89%), e ter acesso espontâneo ao SNC mediado por complexo receptor-transferrina (XU et al., 1992; YOKEL et al.,1999). O Al, também pode interagir com ligantes de baixo peso molecular, como citrato e fosfato, capaz de atravessar facilmente as membranas (BEARDMORE; EXLEY, 2009). Além disso, existem mais maneiras do Al deixar o sangue,

como mostra a Figura 4: 1) através da via paracelular; 2) via transcelular; 3) por transporte ativo; 4) por canais iônicos e, 5) por meio de endocitose adsortiva ou mediada por receptor. Geralmente cada via de transporte do Al é apropriada para as diferentes formas do Al, são elas: o cátion trivalente livre (Al^{3+}), complexos solúveis neutros e de baixo peso molecular (BPM- Al^{0}), complexos solúveis neutros e de alto peso molecular ($APM-Al^{0}$), complexos solúveis carregados de baixo peso molecular ($BPM-Al(L)n^{+/-}$ e, nano e micropartículas (Al(L)n) (EXLEY, 2013).



Figura 4. Principais rotas pelas quais o Al pode ser transportado através de membranas celulares ou endotélio celular. 1) paracelular; 2) transcelular; 3) transporte ativo; 4) canais iônicos; 5) endocitose adsortiva ou mediada por receptor. BPM-Al⁰: complexo solúvel de baixo peso molecular neutro; APM-Al⁰: complexo solúvel de alto peso molecular neutro; BPM-Al(L)_n^{+/-}: complexo solúvel de baixo peso molecular carregado; Al(L)_n: nano e micropartículas. Fonte: Adaptado de EXLEY, 2013.

2.1.4. Toxicologia

O Al é um dos poucos elementos químicos abundantes no meio ambiente, e que não apresenta nenhuma função biológica conhecida e, durante muitos anos acreditou-se que este elemento não tivesse efeitos nocivos aos seres vivos.

O reconhecimento acerca da possível neurotoxicidade do Al teve início quando Alfrey e colaboradores (ALFREY; LEGENDRE; KAEHNY, 1976) observaram que pacientes com insuficiência renal crônica que necessitavam de diálise, apresentavam em comum, uma síndrome que ficou conhecida como encefalopatia de diálise, caracterizada por transtornos na fala, demência, contrações musculares involuntárias e incontroláveis, seguidos de convulsões (ALFREY; LEGENDRE; KAEHNY, 1976).

Este assunto ainda gera muitas discussões e controvérsias, de modo que o esclarecimento de mecanismos a respeito da toxicidade conferida pelo metal e seus efeitos no SNC não são totalmente esclarecidos. Uma crescente série de relatos científicos mostram que o Al possui efeitos toxicológicos observados em diferentes espécies, como plantas, animais e, obviamente em humanos (LIAQUAT et al., 2019; MIRZA et al., 2016; PAOLO, DI et al., 2014; WANG et al., 2017).

Diversos estudos apontam que elevadas concentrações de Al no tecido cerebral estão associadas com neuropatologias (BONDY, 2016; MARTYN et al., 1997; PAOLO, DI et al., 2014). Nos últimos anos, essa evidência tomou grande força decorrente de alguns motivos que contribuem para entender seus efeitos: a) a maior biodisponibilidade ambiental do Al³⁺ para os seres vivos e, b) o acúmulo do metal em fluidos e tecidos de todos os sistemas biológicos (BONDY, 2010; MCLACHLAN et al., 2019).

A neurotoxicologia do Al ocorre devido a capacidade do metal de atravessar a barreira hematoencefálica, alterando o fluxo de moléculas e íons e, favorecendo a indução de alterações morfológicas e funcionais no SNC (BONDY, 2010). Estas modificações na homeostase celular convergem para déficits neurocomportamentais, principalmente sobre a memória e aprendizagem (BOLLA et al., 1992; COLOMINA et al., 2002; SHARMA et al., 2013).

O acúmulo do metal nas células nervosas pode chegar a concentrações micromolares (AREMU; MESHITSUKA, 2006; KAIZER, 2008; WU et al., 2012). No SNC de forma geral, o Al pode favorecer o aparecimento de diversas manifestações neurológicas, incluindo a encefalopatia, déficits de memória, tremores, espasmos, enfraquecimento da coordenação motora, movimentos lentos, perda de entusiasmo e convulsão generalizada com sintomas de epilepsia (ZATTA et. al, 1998; WU et al., 2012).

O Al também é considerado um agente mutagênico e pró-oxidante, potencializando a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) (ESPARZA et al., 2003; EXLEY, 2004). O aumento do metabolismo oxidativo celular causa peroxidação dos lipídeos da membrana, induzindo alterações estruturais e funcionais nestas organelas, devido a sua forte interação com o Al (KAIZER, 2008). Em resumo, a Figura 5 demonstra as principais formas de exposição ao Al e seus efeitos no organismo até ser excretado ou absorvido e distribuído nos mais diversos órgãos.



Figura 5. Formas de exposição humana ao Al e seus efeitos no organismo. Esquema das principais formas de exposição, absorção e distribuição, ações e formas de excreção do metal. Fonte: Adaptado de Exley 2013.

2.2. Alumínio: condições patológicas

2.2.1. Insuficiência renal

O Al, por ser de excreção predominantemente renal, assume uma toxicidade mais acentuada em pacientes com insuficiência renal, tanto em pacientes que realizam diálise, assim como naqueles pré-dialíticos e transplantados renais (NAYAK, 2002; SENG et al., 2011).

Na diálise, o Al e / ou outros contaminantes tóxicos presentes na solução dialisante podem entrar diretamente na corrente sanguínea do paciente e, se acumular no organismo. Sob tais circunstâncias, ocorre o aumento dos níveis de Al no soro dos pacientes após as sessões de hemodiálise (ATSDR, 2008).

O Al absorvido deposita-se no organismo, preferencialmente no tecido ósseo, onde faz trocas com o cálcio, causando osteomalácia devido a desmineralização óssea (CHAPPARD et al., 2016). Além disso, o Al³⁺ causa depleção dos estoques de ferro através da sua ligação com a transferrina, podendo causar anemia hipocrômica e microcítica (BIGNUCOLO et al., 2012).

As principais fontes de contaminação pelo Al durante o tratamento de pacientes com insuficiência renal crônica são a água utilizada na hemodiálise e medicamentos injetáveis como soluções salinas, glicose, heparina e albumina (DRÜEKE, 2002; SAVORY; WILLS, 1992). Em virtude dos diversos efeitos nocivos que caracterizam a intoxicação alumínica, muitos
países desenvolvidos têm realizado um controle mais rigoroso da água empregada na diálise, visando minimizar o agravamento da saúde dos pacientes com insuficiência renal crônica. Neste sentido, os valores da concentração de Al no dialisado não podem ultrapassar a concentração de 10 μ g / L (NSW AGENCY, 2018).

Além disso, a Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA) recomenda que o nível de Al sérico de pacientes em tratamento de hemodiálise seja determinado anualmente, e deve apresentar valor inferior a 30 mg / L. Se exceder essa concentração, será necessário tratamento com agente quelante do metal, a desferroxamina. A determinação do metal presente no soro é um indicador útil para avaliar o grau de intoxicação do paciente com Al (ANVISA, 2014). Já em indivíduos saudáveis o valor máximo de Al sérico recomendado para a população é de 10 μ g / L (ANVISA, 2014).

2.2.2. Doença de Alzheimer

Estudos subsequentes identificaram concentrações de Al 10 vezes maiores no cérebro de pacientes que realizavam hemodiálise, assim como a deposição do Al em emaranhados neurofibrilares e placas senis, característicos da Doença de Alzheimer (DA) (HETNARSKI et al., 1980; CANDY et al., 1986). Assim, surge a hipótese de que a concentração elevada de Al em cérebro humano pode estar associada com a etiologia de doenças neurodegenerativas, como a esclerose lateral amiotrófica, doença de Parkinson e a doença de Alzheimer (DA) (BAKAR et al., 2010).

Em particular, a incidência da DA vem tomando elevadas proporções no mundo inteiro. Segundo a Associação Internacional da doença de Alzheimer, na sua última estimativa, feita no ano de 2015 haviam 46,8 milhões de pessoas no mundo acometidas com a demência e este número chega a quase dobrar a cada 20 anos, podendo chegar a 74,7 milhões de casos em 2030 (Alzheimer's Disease International, 2016). No Brasil, o número de pessoas com a doença atinge cerca de 1,2 milhões, sendo que apenas a metade é diagnosticada (Associação Brasileira de Alzheimer, 2016).

A DA é uma desordem neurodegenerativa crônica, que tem como alvo a população senil. Trata-se de uma forma de demência caracterizada pela perda progressiva da memória e de outras funções cognitivas, devido a alterações cerebrais causadas pela doença, como a presença de placas amilóides e de um grande número de emaranhados neurofibrilares em algumas regiões do cérebro (HAMLEY, 2012). Ainda, a DA está associada com a morte neuronal e proliferação glial, resultando na redução do volume cerebral (RONDEAU et al., 2000). Desde a descoberta da DA, diversas hipóteses a respeito da fisiopatologia desta doença têm sido propostas. Dentre estas, a hipótese da disfunção colinérgica foi a primeira teoria a ser formulada (BARTUS et al., 1982), uma vez que o papel do sistema colinérgico em processos mnemônicos e de aprendizagem é bem elucidado desde a década de 70 (DEUTSCH, 1971). Outra teoria mais recente que busca explicar o mecanismo envolvido no desenvolvimento da DA é a hipótese metálica. Sabe-se que a DA resulta de um processo multifatorial, no qual estão presentes componentes genéticos e ambientais e um dos fatores de risco ambiental amplamente investigado é a exposição ao Al.

Evidências têm demonstrado que o cérebro de pacientes com a DA possui concentrações de Al de 2 a 3 vezes maiores do que indivíduos saudáveis (GUPTA et al., 2005). Além de o envelhecimento ser um importante fator de risco para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, ele também representa um fator de risco para o acúmulo de Al no cérebro (EXLEY, 1997).

A perda da função neuronal parece ser um dos principais efeitos da exposição ao Al. Desta forma, a neurogênese torna-se um processo de suma importância para avaliar os efeitos do Al, a fim de compreender mecanismos que levam a perda e degeneração neuronal (BONDY; CAMPBELL, 2017).

2.3. Neurogênese

2.3.1. Perspectiva histórica

Desde o final do século XIX até muito recentemente, acreditava-se que a neurogênese ocorria apenas durante o desenvolvimento embrionário e que o cérebro dos mamíferos era incapaz de gerar novos neurônios durante a fase adulta. No ano de 1928, Ramón y Cajal concluíram que não havia o surgimento de novas células nervosas no cérebro adulto, além das que já estavam determinadas durante o período embrionário e pós-natal (RAMÓN Y CAJAL, 1928).

Anos mais tarde, a fim de desvendar este dogma da ciência, o neurocientista Joseph Altman (1965) publicou o primeiro relato da ocorrência da neurogênese em cérebro de roedores jovens e adultos, em regiões conhecidas como o giro denteado do hipocampo, bulbo olfatório e neocórtex (ALTMAN, 1969; ALTMAN; DAS, 1965). Entretanto, nessa época, esses achados foram insuficientes e não tiveram o merecido reconhecimento pela comunidade científica.

Foi apenas em 1988, que surgiram métodos mais sólidos e eficientes para avaliar a neurôgenese, como por exemplo, a introdução do 5-bromo-3'-deoxiuridina (BrdU), um análogo

sintético de timina, que é captado pelas células durante a fase S da mitose, representando um poderoso marcador de células em proliferação. Essas células podem ser observadas através de técnicas de imunohistoquímica, e ainda podem ser marcadas com anticorpos específicos para neurônios ou células gliais para identificar o fenótipo celular (MILLER; NOWAKOWSKI, 1988).

A partir do uso da técnica do BrdU, estudos sobre a neurogênese adulta tomaram considerável impulso. O ano de 1993 data a confirmação da neurôgenese hipocampal adulta em roedores (CAMERON et al., 1993). Posteriormente, foi avaliada a neurôgenese em alguns grupos de invertebrados e em praticamente todos vertebrados, incluindo primatas e humanos (HE; CREWS, 2007; KORNACK; RAKIC, 1999; LINDSEY; TROPEPE, 2006; SPALDING et al., 2013).

Mais recentemente, evidências apontam que cerca de 700 neurônios são gerados por dia em cada hipocampo adulto humano, o que equivale a uma taxa anual de 1,75% de neurônios em processo de auto-renovação, e que decai continuamente durante o envelhecimento. Essa taxa de neurogênese adulta é similar à de roedores (SPALDING et al., 2013).

Nos dias de hoje, é amplamente aceita a teoria de que a neurogênese persiste na zona subgranular do giro denteado do hipocampo de mamíferos adultos, porém com um potencial de desenvolvimento e proliferação mais limitado e em regiões restritas do cérebro, quando comparado com a neurogênese embrionária e pós-natal (BOLDRINI et al., 2018).

2.3.2. Células-tronco e Células progenitoras neurais

Devido a imensa complexidade do SNC, para que os diferentes tipos de neurônios e células gliais sejam gerados, as células-tronco e progenitoras neurais devem proliferar e se diferenciar em um processo extremamente preciso e controlado (GAGE, 2000; MING; SONG, 2011).

As células-tronco são células não diferenciadas capazes de se auto renovar indefinidamente e/ou de se diferenciarem em muitas outras linhagens celulares. Ou seja, é a célula indiferenciada capaz de gerar, por divisão mitótica simétrica, duas células-filhas idênticas a ela ou, por divisão mitótica assimétrica, uma célula-filha diferenciada e outra nova célula que permanece indiferenciada e mantém a linhagem original. Além disso, as células-tronco podem ser programadas para desenvolver funções específicas, tendo em vista que ainda não possuem uma especialização (MOORE, 2013).

As mais diversas células-tronco existentes podem ser classificadas quanto a sua origem e potencial de diferenciação. Dentre estas, destacam-se as células-tronco totipotentes, capazes de formar qualquer célula, incluindo tecidos extraembionários, como a placenta. Este tipo de célula-tronco é característico exclusivamente do zigoto e das células formadas até a fase de mórula. Existem ainda, as células-tronco pluripotentes, que possuem grande capacidade de diferenciação, podendo dar origem a todos fenótipos celulares de um organismo adulto. Outro tipo de célula-tronco, mas não menos importantes, são as células-tronco multipotentes, que por apresentarem um potencial de diferenciação mais restrito, originam apenas tipos de células presentes no mesmo tecido de sua origem (MOORE, 2013).

Cabe a esta última classificação, incluir as células-tronco neurais, consideradas células multipotentes, capazes de originar populações específicas de células nervosas como neurônios, astrócitos e oligodendrócitos (BOLDRINI et al., 2018; MOORE, 2013). Estas células são responsáveis pela formação do SNC na fase embrionária e pós-natal, assim como a manutenção da sua integridade fisiológica na fase adulta (JOHANSSON et al., 1999).

2.3.1 Desenvolvimento do sistema nervoso central

É na fase embrionária que o SNC se desenvolve, a fim de formar a complexa rede neuronal de um organismo adulto. As primeiras indicações do desenvolvimento do SNC começam durante a terceira semana da gestação dos mamíferos, a partir de um importante processo da embriogênese: a neurulação. A neurulação é a formação da placa neural, a partir da indução de sucessivas invaginações da ectoderme pela notocorda e a mesoderme subjacentes, formando a placa neural (MOORE, 2013).

No final da terceira semana, as bordas laterais da placa neural se elevam para formar as pregas neurais. Ao se desenvolverem, as pregas neurais se fundem formando o tubo neural, cuja cavidade interna é composta de sulco neural. Concomitantemente ao fechamento do tubo neural, algumas células neuroectodérmicas situadas ao longo da margem interna de cada prega neural formam um grupo celular diferenciado chamado de crista neural. Logo, a crista se separa em duas partes, direita e esquerda, que se deslocam para os aspectos dorsolaterais do tubo neural, neste local, elas darão origem aos gânglios sensoriais dos nervos espinhais e cranianos, como mostra a Figura 6 (MOORE, 2013).

O tubo neural dará origem a três regiões distintas do SNC: o romboencéfalo, o mesencéfalo e o prosencéfalo. Destas, o prosencéfalo dará origem ao telencéfalo, considerada a maior e mais desenvolvida porção do encéfalo, e ao diencéfalo. As principais partes cerebrais

se tornam visíveis na 7^a semana, a partir de então o cérebro começará a crescer e se desenvolver (MOORE, 2013).



Figura 6. Formação do tubo neural. Esquema de cortes transversais de embriões, ilustrando a formação do sulco neural, tubo neural e crista neural. Fonte: Moore et al., 2013

Em suma, o tubo neural é a estrutura embrionária que originará o encéfalo e também a medula espinhal. Para a formação do encéfalo, a camada de células do tubo neural deve proliferar, migrar e diferenciar. As células neuroepiteliais multipotentes que formam o tubo neural se posicionam em locais distintos e, então diferenciam-se, num processo conhecido como neurogênese (MOORE, 2013).

2.3.3. Estágios da neurogênse: proliferação, migração e diferenciação das células progenitoras neurais

Ao mesmo tempo em que ocorre a formação do tubo neural, um grupo de células neuroepiteliais das pregas neurais migram para formar a crista neural. A grande capacidade migratória destas células, a induzem a se diferenciarem e originar uma variedade de células, como os neurônios e glias, células neurosecretoras da glândula adrenal e a neurônios do sistema nervoso (MOORE, 2013).

As células neuroepiteliais proliferam-se várias vezes por divisão simétrica (GÖTZ; HUTTNER, 2005). Durante este processo, a parede do tubo neural torna-se mais espessa, e estas células neuroepiteliais se alongam adquirindo características de células da glia radial. As células da glia radial, por sua vez, formam dois tipos celulares distintos, através de divisão assimétrica, que são uma célula da glia radial e um neurônio imaturo ou uma célula da glia radial e uma célula progenitora neuronal, na fase neurogênica (HOMEM; REPIC; KNOBLICH, 2015). Os neurônios imaturos saem da zona ventricular rumo à placa cortical, onde se tornam neurônios maduros, enquanto as células progenitoras migram para a zona subventricular, e proliferam-se formando mais neurônios. Além de formar vários tipos de neurônios por divisão assimétrica, as células da glia radial formam oligodendrócitos e astrócitos (Figura 7). Ambas as células neuroepiteliais e da glia radial são consideradas células progenitoras neurais e estendem-se até a superfície do tecido, com a função de fornecer suporte para a migração de neurônios e outros tipos celulares (FARKAS; HUTTNER, 2008; FLORIO; HUTTNER, 2014).



Figura 7. Neurogênese no período embrionário. O esquema mostra a proliferação de células neuroepiteliais por divisão simétrica. Em seguida, estas células adquirem características de células de glia radial. Por divisão assimétrica, as células da glia radial formam as células progenitoras neurais, oligodendrócitos e astrócitos. As células progenitoras neurais, por sua vez, migram para a zona subventricular, onde sofrem repetidas divisões assimétricas, formando os neurônios.

Fonte: Adaptado de Kriegstein; Alvarez-Buylla, 2009.

O desenvolvimento do SNC envolve uma soma de eventos, rigorosamente controlados, iniciando pela proliferação e migração e, por conseguinte, acompanhado da determinação do fenótipo neural e maturação celular (MOORE, 2013). Uma vez que a célula adquire suas características de especificação neural após a divisão celular, estas células migram até atingir sua localização final, onde estendem seus axônios e fazem conexões apropriadas onde estabelecem suas características funcionais e fisiológicas específicas (FARKAS; HUTTNER, 2008).

O destino das células progenitoras neurais em se auto renovar ou se diferenciar é determinada nas fases iniciais do ciclo celular, a partir de fatores internos e externos envolvidos no ambiente em que a célula está inserida (ARAI; HUTTNER; CALEGARI, 2016). O ciclo celular é dividido em duas principais fases: a interfase e a fase mitótica. Durante a interfase a célula encontra-se em seu momento de maior atividade metabólica, podendo ser divido ainda em três fases, sendo elas: G_1 ou *gap* 1, S ou síntese e G_2 ou *gap* 2, como está apresentado na Figura 8.



Figura 8. Fases do ciclo celular. O ciclo celular consiste na interfase e na fase mitótica. Durante a interfase, a célula cresce (G1) e o DNA nuclear é duplicado (S). A interfase é seguida pela fase mitótica (G2M). Fonte: Autor

A primeira fase da interfase é conhecida como G_1 ou *gap* (do inglês intervalo), na qual a célula aumenta seu tamanho e faz a síntese de RNA e proteínas, preparando a célula para as

próximas etapas do ciclo celular. Nesta fase, as células-tronco e progenitoras neurais também determinam se a divisão celular que irá acontecer será simétrica ou assimétrica, ou seja, se dará origem a mesma linhagem celular ou distinta (NEGANOVA; LAKO, 2008).

A segunda fase da interfase do ciclo celular é a fase de Síntese, conhecida como fase S, corresponde a fase em que ocorre duplicação do material genético. A terceira fase é chamada de G₂ ou *gap 2*, é a fase preparatória para a próxima etapa do ciclo. A última fase do ciclo é conhecida como Mitose ou fase M, como o próprio nome já diz, é a fase em que ocorre a divisão celular por mitose, gerando duas células-filhas. As células-filhas podem receber os componentes celulares da célula-mãe em partes iguais (divisão simétrica) ou diferentes (divisão assimétrica) (SALOMONI; CALEGARI, 2010).

Além destas fases descritas, as células podem entrar no estágio quiescente (G_0), onde param de proliferar. Geralmente, células altamente especializadas permanecem nesta fase, como as células nervosas (RUMMAN; DHAWAN; KASSEM, 2015). Além disso, durante o desenvolvimento cerebral, ocorre um aumento na proporção de células que se encontra no estágio G_1 , realizando divisões proliferativas para a diferenciação celular, assim como de células, neurônios em sua maioria, que abandonam o ciclo celular e ficam na fase de repouso (G_0) (HARDWICK et al., 2015).

O controle destes processos celulares, é responsável pelo número de neurônios formados em diferentes regiões do SNC, de forma que, fatores que possam influenciar a progressão do ciclo celular, podem afetar diretamente a neurogênese (HOMEM; REPIC; KNOBLICH, 2015).

2.3.4 Fatores que afetam a neurogênese

A neurogênese, resumidamente, envolve três etapas principais: a proliferação das células progenitoras neurais, a determinação do fenótipo neural (diferenciação) e a migração destas células já diferenciadas até o local de destino, para sua completa maturação. Este processo, é muito mais complexo do que se imagina, podendo sofrer influência de inúmeros fatores tanto intrínsecos, quanto de sinais extracelulares (SHOHAYEB et al., 2018).

Cada estágio da neurôgenese é controlado por estímulos diferentes, e cada estímulo pode atuar em diferentes alvos. Dentre os fatores intrínsecos que podem afetar este processo em si estão hormônios, neurotransmissores, fatores tróficos, fatores de transcrição, citocinas inflamatórias, modificações epigenéticas, fatores de crescimento e, também a conexão com outras linhagens celulares, como a glia (MUOTRI; GAGE, 2006). A sinalização endotelial e os contatos célula a célula facilitam a proliferação das células progenitoras neurais e provavelmente estão envolvidos na integração da neurogênese (PALMER; WILLHOITE; GAGE, 2000). Os astrócitos também fornecem um suporte físico para os neurônios e facilitam sua migração e integração nos circuitos neuronais. Portanto, uma interação complexa de efetores de sinalização distintos dentro do nicho neurogênico serve para manter a neurogênese até a idade adulta (LEE; CLEMENSON; GAGE, 2012).

Além disso, está bem estabelecido que os neurotransmissores influenciam a proliferação e diferenciação das células progenitoras neurais nas zonas neurogênicas, uma vez que, estas células já expressam receptores de glutamato, GABA_A, acetilcolina, ATP, dopamina dentre outros (RATHBONE et al., 1999). A sinalização induzida por essas moléculas pode promover a proliferação celular durante a neurogênese, e ao término desse processo os neurotransmissores e seus receptores podem assumir novas funções, como mediar a comunicação sináptica (OLIVEIRA; ILLES; ULRICH, 2016). Além disso, a manipulação dos níveis de neurotransmissores e / ou ativação com seus receptores específicos representa um potencial farmacológico para estimular a neurogênese frente a alguma patologia (YOUNG; TAYLOR; BORDEY, 2011).

Por outro lado, podemos considerar os fatores extrínsecos como sendo o estresse, atividade física, inflamação, ingestão alimentar e fatores ambientais. Esses fatores extrínsecos podem modular a neurogênese através da indução ou bloqueio de uma rede de fatores neurotróficos, fatores de transcrição e liberação de citocinas inflamatórias estabelecendo uma relação entre os fatores externos e intrínsecos da célula (SHOHAYEB et al., 2018).

Um fator ambiental, que pode afetar a neurogênese é o Al. Muitos estudos têm investigado seus efeitos nos sistemas biológicos, uma vez que este elemento químico não possui nenhuma função fisiológica específica descrita, e foi tomado como um agente neurotóxico para o SNC nos últimos anos. Como já foi mencionado nesta tese, o Al é caracterizado por ser um elemento onipresente no ambiente, de forma que a exposição ao metal torna-se praticamente inevitável.

Assim, a análise da diferenciação neural *in vitro* usando células-tronco neurais que formam as neuroesferas, revela-se um excelente modelo experimental, representando uma ferramenta para avaliar mecanismos moleculares básicos que podem ser afetados nas etapas iniciais da embriogênese, quando expostas a algum estímulo externo.

2.3.5 Neuroesferas como modelo de neurogênese in vitro

As células-tronco neurais podem ser isoladas do cérebro durante seu desenvolvimento, podendo ser isoladas em cultura e crescer em monocamadas ou agregados conhecidos como neuroesferas (GAGE, 2000). As neuroesferas representam um excelente modelo para estudar a proliferação, a migração e a diferenciação neural, assim como a influência de fatores externos.

Cada neuroesfera deriva de uma única célula que dá origem a outra célula filha idêntica e a um progenitor, por divisão assimétrica. Assim, os efeitos do microambiente em que se encontram podem ser manipulados *in vitro*, e questões fundamentais a respeito dos mecanismos de desenvolvimento neural podem ser respondidas (SUSLOV et al., 2002).

Para que seja possível observar a formação das neuroesferas a partir do isolamento de células troncos neurais e células progenitoras neurais, é necessário a presença dos fatores de crescimento EGF (Epidermal Growth Factor) e FGF-2 (Fibroblast Growth Factor-2) no meio de cultivo celular específico (MARSHALL et al., 2008). Desta forma, as neuroesferas são constituídas por células-tronco e células progenitoras, e utiliza-se o termo "células precursoras neurais" (CPNs) para descrever ambos os tipos celulares (SEKI et al., 2007).

Em roedores, a maior proliferação neuronal ocorre na metade do período gestacional (com pico no 12° dia) e processos tais como migração e diferenciação ocorrem no final da gestação (NEGRAES et al., 2012). No SNC dos seres humanos, estes eventos equivalem ao período correspondente aos 3° e 4° meses de gestação, e até o 8° mês de gestação, o córtex cerebral humano já apresenta um grande número de neurônios completamente formados (FAGUNDES; TAHA, 2004).

A partir da formação das neuroesferas *in vitro*, é possível manipular diversas situações mimetizando o que ocorre no cérebro humano, como por exemplo a influência de fatores externos, os quais acredita-se que podem influenciar no potencial neurogênico. Assim como ocorre *in vivo*, os fatores de crescimento EGF e FGF-2 induzem a proliferação das CPNs *in vitro* (OLIVEIRA et al., 2013). Após a formação das neuroesferas, os fatores de crescimento são removidos do meio de cultivo específico e, então é observada uma matriz aderente, em que as CPNs migram e diferenciam-se em neurônios e glias, de forma espontânea como mostra a Figura 9 (NEGRAES et al., 2012).

Para que se possa avaliar a diferenciação neural, são necessários marcadores específicos de CPNs, assim como marcadores de neurônios e glias maduros e /ou recém formados. Dentre estes marcadores destacam-se a Nestina, GFAP e β3-tubulina, permitindo avaliar o progresso de diferenciação e desenvolvimento neural (ZHANG; JIAO, 2015).



Figura 9. Formação das neuroesferas *in vitro***.** As CPNs extraídas do telencéfalo de embriões de camundongos no 13° dia de gestação, são mantidas no meio de cultivo celular específico (DMEM-F12) para induzir seu crescimento com EGF, FGF-2 e suplemento B-27 durante 5 dias. Após esse período, é observada a formação das neuroesferas e os fatores de crescimento são removidos para que elas possam se diferenciar durante 7 dias. Fonte: Autor

A Nestina é uma proteína do filamento intermediário do tipo VI. Essas proteínas de filamentos intermediários são expressas principalmente em células nervosas imaturas ou em rápida proliferação. Porém, durante o desenvolvimento neural essa proteína é expressa somente em CPNs, incluindo as células-tronco neuroepiteliais, glias radiais e progenitores neurais (WISLET-GENDEBIEN et al., 2003).

Por outro lado, o GFAP (Proteina Glial Fibrilar Ácida) é uma proteína intermediária do filamento do tipo III, presente no citoesqueleto de células gliais, como o próprio nome sugere (YANG; WANG, 2015). Porém, o GFAP pode ser expresso em outras linhagens celulares neurais como as glias radiais, um tipo de célula-tronco precursora neural, que inclusive, também expressa a Nestina (OLIVEIRA et al., 2013; WISLET-GENDEBIEN et al., 2003). Por fim, a β 3-tubulina, é uma proteína que compõem os microtúbulos, assim como todas as tubulinas e, expressa especificamente neurônios imaturos durante o desenvolvimento neural (KATSETOS et al., 2003).

Desta forma, as neuroesferas representam o principal modelo de diferenciação neural abordado nesta tese, e refletem grande parte dos processos complexos que acontecem nos estágios iniciais do desenvolvimento do SNC, de forma simplificada e acessível, correspondendo a um excelente modelo experimental para avaliar a influência de fatores externos e mecanismos que possam estar envolvidos (BAUMANN et al., 2016; NEGRAES et al., 2012).

2.4. Sinalização purinérgica

2.4.1 Histórico e função

Evidências apontam que o sistema purinérgico está envolvido na manutenção, proliferação e diferenciação de células-tronco multipotentes (BURNSTOCK; ULRICH, 2011; OLIVEIRA; ILLES; ULRICH, 2016). A sinalização purinérgica é uma das vias mais antigas que se conhece e, expandiu-se ao longo dos anos, incluindo não apenas a função conhecida do ATP como reserva energética para o metabolismo celular dos sistemas biológicos, como também uma molécula com propriedades de neurotransmissores. Entretanto, a primeira grande evidência científica dada ao ATP na neurotransmissão, ocorreu na década de 70, que posteriormente, levou ao surgimento das substâncias purinérgicas (BURNSTOCK et al., 1970).

A sinalização purinérgica é uma importante via moduladora de vários processos fisiológicos, envolvida em mecanismos neuronais e não neuronais, tanto em eventos de curta como longa duração, os quais incluem respostas imunes, neurotransmissão, vasodilatação, proliferação e morte celular (BURNSTOCK, 2014; BURNSTOCK; ULRICH, 2011). O interesse do envolvimento do sistema purinérgico se deve principalmente à exploração da fisiologia em neuropatologias deste sistema como um possível alvo terapêutico (BURNSTOCK, 2006; 2017; SACHDEVA; GUPTA, 2013; WOODS et al., 2016).

De forma geral, o sistema purinérgico é formado por três componentes principais: os nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares, os receptores através dos quais elas exercem seus efeitos e as ectoenzimas responsáveis pela regulação dos níveis dessas moléculas (BURNSTOCK; VERKHRATSKY, 2012).

2.4.2 Nucleotídeos

Os nucleotídeos de adenina, adenosina 5'-trifosfato (ATP), adenosina 5'-difosfato (ADP) e adenosina 5'-monofosfato (AMP) e seu nucleosídeo correspondente, a adenosina, são algumas das moléculas que compõem o sistema purinérgico. Estas purinas estão presentes em muitos tecidos e órgãos, especialmente no SNC, onde desempenham função na neurotransmissão e neuromodulação sináptica (BURNSTOCK, 2008).

O ATP, especificamente, atua como um neurotransmissor e co-transmissor na maioria dos nervos, tanto no SNC quanto no sistema nervoso periférico (BURNSTOCK et al., 1970). No SNC, este nucleotídeo é liberado fisiologicamente das células por exocitose ou por canais de membrana, principalmente pelos neurônios durante as sinapses (BURNSTOCK, 2007b). Além disso, o ATP exerce muitas funções importantes a curto prazo, como a modulação da excitabilidade neuronal e efeitos tróficos de longo prazo necessários para o desenvolvimento embrionário (BURNSTOCK; ULRICH, 2011). No desenvolvimento cerebral, o ATP aumenta a liberação de cálcio intracelular nas células gliais radiais e nas células-tronco neurais embrionárias, das quais todos os tipos de células neurais se originam e, consequentemente contribui para o desenvolvimento cortical (WEISSMAN et al., 2004). A liberação do ATP pelos progenitores neurais, indica seus possíveis efeitos na modulação da proliferação celular neste estágio (BURNSTOCK; ULRICH, 2011).

Estudos mais recentes, propuseram que o aumento da proliferação das CPNs induzido pelo ATP ocorre através do recrutamento de células quiescentes no ciclo celular (fase G₀), aumentando o número de células de glia radiais (BARRACK; THUL; OWEN, 2014).

2.4.3 Ectoenzimas

Os níveis do ATP extracelular biodisponível são controlados por enzimas que catalisam sua degradação, as ectoenzimas. As enzimas envolvidas neste processo incluem a trifosfato difosfohidrolase ecto-nucleosídeo (E-NTPDase), ecto-nucleotídeo pirofosfatase/ fosfodiesterase (E-NPP), ecto-5'-nucleotidase (E-5'-nucleotidase) e adenosina desaminase (ADA) (YEGUTKIN, 2008; ZIMMERMANN, 2008). Estas enzimas são conhecidas como ectonucleotidases, e agem em conjunto, formando uma cascata (Figura 10). Primeiramente, as enzimas E-NTPDase e E-NPP degradam o ATP e o ADP em AMP, que em seguida é hidrolisado a adenosina pela ecto-5'-nucleotidase e finalmente a adenosina resultante é desaminada a inosina pela ADA (ZIMMERMANN, 2008). Estas ectoenzimas controlam os níveis de ATP e adenosina, modulam a ativação de seus receptores específicos e têm um papel importante na regulação da atividade sináptica (BURNSTOCK, 2007b).

As NTPDases representam uma grande família de enzimas, que foram descobertas, clonadas e caracterizadas estrutural e funcionalmente apenas na década de 90. Os membros desta família são codificados por oito genes diferentes, desta forma diferem na especificidade pelo substrato e na localização tecidual (ZIMMERMANN, 2001). Estas enzimas podem ser identificadas como NTPDase 1 a 8, sendo que quatro destas enzimas (NTPDase 1, 2, 3 e 8) encontram-se ancoradas na membrana celular, com seu sítio catalítico voltado para o meio extracelular e as restantes (NTPDase 4, 5, 6 e 7) localizam-se intracelularmente (ZIMMERMANN, 2008).



Figura 10. Cascata das ectonucleotidases. Degradação do ATP até inosina pela ação sequencial das ectonucleotidases. Fonte: Autor

As NTPDases têm a propriedade de desfosforilar nucleotídeos extracelulares, presentes em muitos tecidos e células e suas atividades catalíticas máximas são dependentes da presença de cátions divalentes, como Ca²⁺ ou Mg²⁺ (ZIMMERMANN, 2008). Além de modular a concentração de nucleotídeos em muitos tecidos, esta enzima também está envolvida na neurotransmissão. Estudos indicam que a NTPDase pode estar associada em processos como aquisição de memória, melhora na lesão cerebral, circulação sanguínea e tônus vascular (ZIMMERMANN, 2008).

Seguindo a cascata enzimática, a E-5'-nucleotidase tem um papel fundamental na degradação de nucleotídeos monofosfatados tendo como produto final a formação de adenosina (ZIMMERMANN, 2011). Assim como as NTPDases, a E-5'-nucleotidase também encontra-se ligada à membrana celular, mas através de uma molécula de glicosil fosfatodilinositol, e apresenta seu sítio catalítico voltado para o meio extracelular (ZIMMERMANN, 2011).

Já foram identificados sete subtipos desta ectoenzima, amplamente distribuídos em vários tecidos, incluindo o tecido nervoso (BURNSTOCK, 2007b). A principal função da E-5'-nucleotidase está na formação da adenosina, uma molécula envolvida em importantes processos relacionados ao SNC, como a neuroproteção e neuromodulação (COLGAN et al., 2006). Assim, as ectonucleotidases têm a função de remover o ATP e gerar adenosina, também exibem constante controle nas concentrações dos nucleotídeos de adenina, bem como duração e extensão da respectiva ativação do receptor (ZIMMERMANN, 2011). A expressão dos diferentes tipos de ectonucleotidases difere durante o desenvolvimento, podendo ser transitoriamente expressas em determinadas regiões do SNC (ZIMMERMAN, 2006). Por fim, a enzima que hidrolisa a adenosina até inosina é a adenosina desaminase, desta forma controla os efeitos e a concentração de adenosina no meio celular (FREDHOLM et al., 2005).

Em conjunto, estas ectoenzimas constituem uma cascata enzimática altamente organizada com uma importante função na manutenção da homeostasia normal e na neurotransmissão purinérgica, principalmente por regular o catabolismo do ATP, considerado um importante neurotransmissor, e a produção de adenosina, uma molécula neuromodulatória de acordo com a ativação de seus receptores (YEGUTKIN, 2008).

Neste sentido, o Al pode causar alterações no metabolismo e sinalização celular por meio de sua inserção em sítios de ligação de metais essenciais para a atividade de enzimas, como por exemplo, interferir no sítio de ligação de Ca^{2+} e Mg^{2+} das ectonucleotidases, dentro das células (MARTIN, 1992).

2.4.4 Receptores

Os efeitos biológicos de nucleotídeos de purina e sua interação com receptores específicos têm sido estudados em diferentes linhagens celulares e em tecidos. Estes receptores podem apresentar uma função na comunicação celular embrionária, incluindo proliferação celular, diferenciação e apoptose (BURNSTOCK; ULRICH, 2011; MISHRA 2006; OLIVEIRA; ILLES; ULRICH, 2016). Atualmente, pouco se sabe sobre os efeitos do ATP nas fases iniciais do desenvolvimento embrionário. Mas pelo fato das CPNs já expressarem a maioria dos receptores purinérgicos, acredita-se que essa via tem uma importante função fisiológica nesta etapa do desenvolvimento, principalmente em processos que envolvem a proliferação, diferenciação, migração e até morte celular programada das CPNs (OLIVEIRA; ILLES; ULRICH, 2016).

Muitos neurotransmissores também possuem uma função de moléculas sinalizadoras, em que a sinalização por eles induzida está relacionada ao seu gradiente de difusão e a distribuição dos seus respectivos receptores. O efeito dos neurotransmissores pode ser estimulado ou bloqueado através de agonistas e antagonistas, respectivamente, destas moléculas (GRANT, 2015). Os nucleotídeos de adenina, ATP e ADP, exercem os seus efeitos através dos receptores do tipo P2, largamente distribuídos no SNC, e pertencem a duas famílias principais: uma família de receptores P2X, que são receptores de canais iônicos dependentes de ligantes (receptores ionotrópicos) e uma família de receptores P2Y, os quais se encontram acoplados à proteína G (receptores metabotrópicos) (BURNSTOCK, 2008; BURNSTOCK; DALE, 2015).

Os receptores P2X são proteínas de membrana que formam canais iônicos na camada lipídica da membrana celular, estes canais são seletivos a cátions como Ca²⁺, Na⁺ e K⁺. Desta forma, a principal via de sinalização ativada por estes receptores é o aumento na concentração de Ca²⁺ intracelular, que leva a despolarização da membrana e ativação de várias proteínas quinases (BURNSTOCK, 2007b). O aumento dos níveis intracelulares de Ca²⁺ faz com que ocorra uma liberação de transmissores das células neuronais e gliais, promovendo a liberação de hormônios além de ativar cascatas de sinalização em muitas células (WEISSMAN et al., 2004).

Atualmente, já foram identificados sete diferentes subtipos de receptores P2X, identificados como P2X₍₁₋₇₎, de acordo com a ordem em que foram clonados e encontram-se distribuídos nos neurônios centrais e periféricos (BURNSTOCK, 2008; BURNSTOCK; DALE, 2015; RALEVIC; BURNSTOCK, 1998). Esta família de receptores compartilha a mesma estutura geral, tendo regiões carboxi e amino-terminais localizadas no espaço intracelular, duas regiões hidrofóbicas que atravessam a membrana e um domínio extracelular contendo dez resíduos de cisteína, onde podem se ligar os agonistas, antagonistas e moduladores (BURNSTOCK, 2007a).

Já os receptores do tipo P2Y são metabotrópicos, associados à diferentes proteínas G, ativados por purinas e pirimidinas, e estruturalmente formados por sete alças transmembrana e possuem a parte carboxi-terminal localizada intracelularmente e a porção amino-terminal localizada no meio extracelular. Já foram identificados oito subtipos deste receptor em humanos: P2Y₁, PY₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃ e P2Y₁₄. Os números que faltam representam subtipos que não existem em mamíferos (BURNSTOCK, 2007a). De modo geral agem principalmente ativando a fosfolipase C, levando à formação de inositol 1,4,5-trifosfato e a mobilização de cálcio citoplasmático (NORTH, 2002).

Além disso, o nucleosídeo derivado da degradação do ATP, a adenosina, atua através de receptores do tipo P1. Estes receptores são divididos em quatro subtipos conforme suas estruturas moleculares, distribuição tecidual e afinidade pelo ligante: A1, A2A, A2B e A3, os quais estão todos acoplados a proteínas G (RALEVIC; BURNSTOCK, 1998). Assim como os

receptores metabotrópicos P2Y, os receptores de adenosina apresentam sete segmentos transmembrana, com a porção amino terminal voltada para o meio extracelular e a porção carboxi-terminal voltada para o meio intracelular, como mostra a Figura 11 (FREDHOLM et al., 2005; RALEVIC; BURNSTOCK, 1998).



Figura 11. Sinalização purinérgica. Ectonucleotidases localizadas na membrana plasmática catalisam a hidrólise sequencial de ATP para ADP, AMP e ADO. Os receptores P1 reconhecem a adenosina, enquanto os receptores P2 se ligam a moléculas nucleotídicas di e trifosfato. Fonte: Adaptado de MENZIES et al. (2017).

2.4.5 Sinalização purinérgica na neurogênese

O padrão de expressão dos receptores purinérgicos durante o desenvolvimento embrionário sugere a importância desses receptores. A expressão das subunidades de alguns receptores P2 já podem ser observadas durante a neurulação de embriões de camundongos, como o P2Y1, P2X3, P2X5 e P2X7 (BURNSTOCK; ULRICH, 2011). Segundo Trujillo e colaboradores (2012), todas as subunidades de P2X, exceto o P2X1, estão altamente expressas em cultura de CPNs derivada do telencéfalo embrionário de roedores, assim como os receptores P2Y1,2,4,6,12 e 14 (TRUJILLO et al., 2012).

Dentre estes, os receptores P2Y estariam associados a proliferação e expansão das CPNs, atuando como reguladores da neurogênese (LIN et al., 2007). A partir da análise *in vitro* em cultura de CPNs extraídas de camundongos adultos, foi possível observar transientes de

cálcio, assim como um aumento da proliferação celular induzidos por ATP, ADP ou UTP e mediados pelos receptores P2Y1, sendo estes efeitos atenuados por seus respectivos antagonistas (MISHRA et al., 2006). Desta forma, aumentos nos níveis de cálcio intracelular induzem a liberação de ATP e outros fatores tróficos, que orientam o curso da migração e diferenciação das CPNs embrionárias e adultas, atribuídos à estimulação do receptor P2Y1 (MISHRA, et al., 2006).

A liberação do ATP regulada espaço-temporal, seguida pela ativação dos receptores P2Y1, pode interferir em eventos cruciais para o desenvolvimento embrionário normal, resultando em padrões alterados de migração e destino neural, interrompendo a formação do SNC, contribuindo para a disfunção cortical (OLIVEIRA; ILLES; ULRICH, 2016). Neste sentido, os receptores purinérgicos atuam como um dos principais mediadores da comunicação neurônio-glia, principalmente através da formação de ondas de cálcio, após a diferenciação dos progenitores neurais (BURNSTOCK; ULRICH, 2011; OLIVEIRA; ILLES; ULRICH, 2016).

Assim como os receptores P2, os receptores do subtipo P1 também já são expressos durante o desenvolvimento do SNC, principalmente o A1 e A2A, que são altamente expressos em CPNs extraídas durante o desenvolvimento embrionário e que tem seus níveis aumentados após o nascimento (RIVKEES, 1995; RODRIGUES; MARQUES; CUNHA, 2018; ZIMMERMANN, 2006). A adenosina, atuando através dos receptores A1 e A2A, pode influenciar no desenvolvimento do sistema nervoso, mais precisamente em etapas como a diferenciação e migração dos neural (CANALS et al., 2005). Esse processo desencadeia respostas celulares específicas integradas à atividade geral de sinalização celular, como a sobrevivência e a proliferação celular, em diversos tipos de células (LAKE; CORRÊA; MÜLLER, 2016; WEIHS et al., 2014).

2.4.6 Neurodegeneração, sinalização purinérgica e neuroinflamação: uma possível via mecanística

Distúrbios no processo da neurogênese seguidas da degeneração neuronal representam as principais causas da perda progressiva da memória e de funções cognitivas, com considerável redução das sinapses e consequentemente, da plasticidade neural (ZHU et al., 2017).

Estudos apontam que doenças neurodegenerativas afetam a neurogênese, o que dificulta a regeneração do SNC frente a alguma lesão ou fator externo (WANG et al., 2004). A neurogênese adulta ocorre no hipocampo, que é a estrutura cerebral mais afetada na DA. Ainda, estudos evidenciaram alterações na homeostase de CPNs em modelo animal desta doença, resultando na redução da sobrevivência e proliferação celular (DONOVAN et al., 2006; HAUGHEY et al., 2002).

Através da descoberta da neurogênese adulta e, uma vez, demonstrada a presença de células-tronco multipotentes na zona subventricular e subgranular do hipocampo (HAYASHI et al., 2018), surge a possibilidade de um possível tratamento com células-tronco, atuando como um alvo terapêutico afim de reverter déficits neuronais observados em pacientes com DA.

Alguns estudos com modelo animal mostram que a indução de CPNs no giro denteado do hipocampo, após a indução da DA revertem os danos mnemônicos a partir de testes comportamentais (BLURTON-JONES et al., 2009; KIM et al., 2015; MCGINLEY et al., 2018). Porém ainda é um processo que exige muito estudo até suceder em humanos, onde o controle da diferenciação de CPNs poderia restabelecer o auto-reparo do SNC, embora seja um processo complexo e limitado para recuperar completamente todos os neurônios danificados.

Atualmente, o mecanismo da farmacoterapia das doenças neurodegenerativas baseia-se em estratégias neuroprotetoras, que garantem que o ambiente em torno da lesão possua condições apropriadas que delongam a morte neuronal e favoreçam a reintegração de regiões degeneradas, uma vez que esta não tem cura (MCDONALD, 2016).

Neste sentido, já é bem descrito que os receptores de adenosina, A1 e A2A, estão envolvidos no papel neuroprotetor da adenosina em muitas condições neuropatológicas, uma vez que os receptores do tipo A1 são predominantes no cérebro (RALEVIC; BURNSTOCK, 1998). Porém, um aumento na regulação dos receptores do tipo A2A é suficiente para causar o declínio cognitivo e perda de memória, como observado em doenças neurodegenerativas (RALEVIC; BURNSTOCK, 1998; DUARTE et al., 2006).

Por outro lado, além das características neurotransmissoras, o ATP pode atuar como um agente pró-inflamatório quando liberado excessivamente na fenda sináptica, através da interação com receptores específicos. Dentre estes, o receptor P2X7 encontra-se amplamente distribuído em muitas células do sistema nervoso central, incluindo a microglia, astrócitos e neurônios (FERRARI et al., 1996; DI IORIO et al., 1996; DEUCHARS et al., 2001). O aumento na liberação do ATP favorece a ativação do P2X7 o que pode induzir a formação de um poro não seletivo na membrana plasmática, permeável a moléculas de peso molecular de até 800 Da, induzindo ao aumento de Ca²⁺ intracelular (RALEVIC; BURNSTOCK, 1998). O influxo do Ca²⁺ para o espaço intracelular pode favorecer a neurodegeneração, uma vez que está relacionado com a ativação glial, excitotoxidade e morte neuronal, favorecendo condições para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas (SÁEZ-ORELLANA et al., 2016).

Um desequilíbrio na ativação deste receptor, pode levar a processos de morte celular, principalmente, por apoptose, favorecendo condições para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas (PUERTO, DEL; WANDOSELL; GARRIDO, 2013). Na microglia, células imunes do SNC, a ativação do receptor P2X7 pode levar a liberação de interleucinas como a interleucina 1 β (IL-1 β) e citocinas como o fator de necrose tumoral α (TNF α) que possuem efeitos pró-inflamatórios (SOLINI et al., 2008). As citocinas pró-inflamatórias podem prejudicar a potencialização em longo prazo e inibir as neurotrofinas, o que é importante para a sobrevivência, função neuronal, plasticidade sináptica e formação de memória (MINICHIELLO, 2009).

Junto com a grande liberação de ATP, ocorre a liberação de glutamato com a conseqüente ativação dos receptores P2X7 e NMDA, respectivamente. A estimulação desses receptores leva a um aumento do efluxo de K⁺, resultando na ativação do inflamassoma NLRP3 e na secreção de citocinas inflamatórias, como IL-1 β , IL-18 e TNF- α na microglia. Também ocorre um aumento do influxo de Ca²⁺ levando à liberação de ATP e glutamato dos terminais nervosos e astrócitos, responsável pela excitotoxicidade; Sob estas condições, ocorre uma diminuição dos níveis de BDNF e consequente diminuição da neurogênese, configurando um cenário bastante comum de doenças neurodegenerativas (Figura 12) (ZHANG et al., 2018).



Figura 12. Papel do P2X7 na neuroinflamação. Altos níveis de ATP liberados na fenda sináptica são suficientes para induzir a liberação de citocinas proinflamatórias através da ativação do receptors P2X7, reduzindo a neurogênese e caracterizando a neuroinflamação. Fonte: Adaptado de Ribeiro et. al, 2019.

Um grande número pesquisas apoiam a ideia de que o acúmulo de Al no hipocampo causa apoptose de neurônios, deposição anormal da proteína β amilóide e neuroinflamação, resultando em prejuízos na aprendizagem e na capacidade de memória dependentes do hipocampo (CAO et al., 2016; JUSTIN-THENMOZHI et al., 2018; OSHIMA et al., 2013; WANG et al., 2014; ZHANG et al., 2018).

Neste contexto, considerando as implicações da exposição ao Al que já estão bem descritas na literatura, este estudo visa investigar se o metal é capaz de influenciar a neurogênese embrionária *in vitro* e através de um modelo de intoxicação ao metal *in vivo*, avaliar se o Al modula a sinalização purinérgica, sendo um possível mecanismo para elucidar a relação entre o acúmulo do Al e doenças neurodegenerativas.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar os mecanismos neurotóxicos do Al em cultura de neuroesferas, e em seguida caracterizar as modificações comportamentais presentes em animais tratados com cloreto de alumínio (AlCl₃), podendo definir a capacidade do Al de alterar a sinalização purinérgica de modo a traçar um mecanismo de ação para a neurointoxicação conferida pela exposição ao Al.

3.2 Objetivos específicos

Em modelo de neuroesferas expostas a diferentes concentrações de Al:

- Investigar o efeito do Al sobre a proliferação, diferenciação, migração, morte e destino neural (neurogênese).
- Avaliar o efeito do Al sobre o ciclo celular e ensaio de apoptose celular.
- Quantificar os níveis de ATP.
- Analisar o efeito do Al sobre a atividade das enzimas NTPDase, 5'-NT e ADA.
- Investigar o efeito do Al sobre a densidade dos receptores P2Y1, A1 e A2A.

Em hipocampo de camundongos Swiss expostos a diferentes concentrações de Al:

- Avaliar o desempenho em testes de aprendizagem e memória.
- Avaliar a genotoxicidade do metal no modelo animal utilizado.
- Quantificar os níveis de Al em hipocampo.
- Avaliar a hidrólise de nucleotídeos a partir da atividade das enzimas NTPDase,

5'-NT e ADA.

- Avaliar a densidade dos purinoreceptores P2X7, A1 e A2A.
- Avaliar marcadores neuroinflamatórios (citocinas pró e antiinflamatórias).

4. ARTIGOS E MANUSCRITOS

Artigo 1: Publicado

Aluminum affects neural phenotype determination of embryonic neural progenitor cells

Dados sobre o periódico: Archives of Toxicology ISSN: 0340-5761 Fator de Impacto: 5.74 Qualis Capes: A1 Endereço eletrônico:_https://link.springer.com/journal/204



Archives of Toxicology https://doi.org/10.1007/s00204-019-02522-6

INORGANIC COMPOUNDS



Aluminum affects neural phenotype determination of embryonic neural progenitor cells

Karine P. Reichert¹ · Maria Rosa C. Schetinger¹ · Micheli M. Pillat^{1,2} · Nathieli B. Bottari¹ · Tais V. Palma¹ · Jessie M. Gutierres³ · Henning Ulrich² · Cinthia M. Andrade¹ · Christopher Exley⁴ · Vera M. M. Morsch¹

Received: 18 December 2018 / Accepted: 18 July 2019 © Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2019

Abstract

Aluminum (Al) is a neurotoxin and is associated with the etiology of neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's disease (AD). The Al-free ion (Al³⁺) is the biologically reactive and toxic form. However, the underlying mechanisms of Al toxicity in the brain remain unclear. Here, we evaluated the effects of Al³⁺ (in the chloride form—AlCl₃) at different concentrations (0.1–100 μ M) on the morphology, proliferation, apoptosis, migration and differentiation of neural progenitor cells (NPCs) isolated from embryonic telencephalons, cultured as neurospheres. Our results reveal that Al³⁺ at 100 μ M reduced the number and diameter of neurospheres. Cell cycle analysis showed that Al³⁺ had a decisive function in proliferation inhibition of NPCs during neural differentiation. Flow cytometry and immunocytochemistry analysis showed that Al³⁺ promoted a decrease in immature neuronal marker β 3-tubulin expression and an increase in co-expression of the NPC marker nestin and glial fibrillary acidic protein. Thus, our findings indicate that Al³⁺ caused cellular damage and reduced proliferation and migration, resulting in global inhibition of NPC differentiation and neurogenesis.

Keywords Aluminum · Aluminum-free ion (Al³⁺) · Neurospheres · Neurogenesis · Neural phenotype · Neurodegenerative disorder

Introduction

Aluminum (Al) is a non-essential metal and is considered ubiquitous in the environment, which makes exposure to it nearly inevitable (Exley 2013). Al is widely applied in daily

Karine P. Reichert kakareichert@yahoo.com.br

Vera M. M. Morsch veramorsch@gmail.com

- ¹ Post-Graduate Program in Toxicological Biochemistry, Laboratory of Toxicological Enzymology, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS 97 105-900, Brazil
- ² Department of Biochemistry, Institute of Chemistry, University of São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brazil
- ³ Laboratory of Research in Pathology, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, RS, Brazil
- ⁴ Lennard-Jones Laboratories, Birchall Centre, Keele University, Staffordshire ST5 5BG, UK

life and diet, e.g., in food additives, drinking water is one of the main sources of Al in humans (Saiyed and Yokel 2005). The trivalent cationic form of Al (Al³⁺) is the biologically reactive, hence toxic form of Al in biological systems. When absorbed, Al³⁺ can accumulate in various body tissues and organs, including the brain (Becaria et al. 2002).

Al³⁺ is a neurotox ic agent to the central nervous system (CNS). Epidemiological studies let to suggest that the concentration of total Al in the human brain is associated with the etiology and/or progression of neurodegenerative diseases, in particular Alzheimer's disease (AD) (Bakar et al. 2010; Exley 2017). Al³⁺ enters the CNS through the blood-brain barrier (BBB) and targets neurons and glial cells. Al³⁺ may also accumulate in neurons, which suffer degeneration in the form of neurofibrillary tangles and senile plaques, common in AD (Yokel 2006).

It has also been reported that Al^{3+} promotes similar characteristics of degeneration in brains of patients with AD, including amyloid- β peptide aggregation, tau protein hyperphosphorylation and conformational changes in β -amyloid (Ricchelli et al. 2005; Chong and Suh 1995;

Abstract

Aluminum (Al) is a neurotoxin and is associated with the etiology of neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's disease (AD). The Al free ion (Al³⁺) is the biologically reactive and toxic form. However, the underlying mechanisms of Al toxicity in the brain remain unclear. Here, we evaluated the effects of Al³⁺ (in the chloride form - AlCl₃) at different concentrations (0.1 - 100 μ M) on the morphology, proliferation, apoptosis, migration and differentiation of neural progenitor cells (NPCs) isolated from embryonic telencephalons, cultured as neurospheres. Our results reveal that Al³⁺ at 100 μ M reduced the number and diameter of neurospheres. Cell cycle analysis showed that the Al³⁺ had a decisive function in proliferation inhibition of NPCs during neural differentiation and induced apoptosis on neurospheres. In addition, 1 μ M Al³⁺ resulted in deleterious effects on neural phenotype determination. Flow cytometry and immunocytochemistry analysis revealed that Al³⁺ promoted a decrease in immature neuronal marker β3-tubulin expression and an increase in co-expression of the NPC marker nestin and glial fibrillary acidic protein. Thus, our findings indicate that Al³⁺caused cellular damage and reduced proliferation and migration, resulting in global inhibition of NPC differentiation and neurogenesis.

Key-words: Aluminum; Aluminum free ion (Al^{3+}) ; neurospheres; neurogenesis; neural phenotype; neurodegenerative disorder.

Introduction

Aluminum (Al) is a non-essential metal and is considered ubiquitous in the environment, which makes exposure to it nearly inevitable (EXLEY, 2013). Al is widely applied in daily lifeand diet, e.g., in food additives, drinking water is one of the main sources of Al in humans (SAIYED; YOKEL, 2005). The trivalent cationic form of Al (Al³⁺) is the biologically reactive, hence toxic form of Alin biological systems. When absorbed, Al³⁺can accumulate in various body tissues and organs, including the brain (BECARIA; CAMPBELL; BONDY, 2002).

Al³⁺ is a neurotoxic agent to the central nervous system (CNS). Epidemiological studies let to suggest that the concentration of total Al in the human brain is associated with the etiology and/or progression of neurodegenerative diseases, in particular Alzheimer's disease (AD) (BAKAR et al., 2010; EXLEY, 2017). Al³⁺ enters the CNS through the blood brain barrier (BBB) and targets nerve and glial cells. Al³⁺ may also accumulate in neurons, which suffer degeneration in the form of neurofibrillary tangles and senile plaques, common in AD (YOKEL, Robert A., 2006).

It has also been reported that Al^{3+} promotes similar characteristics of degeneration in brains of patients with AD, including amyloid- β peptide aggregation, tau protein hyperphosphorylation and conformational changes in A β -amyloid (ABDEL-GHANY; EL-SEBAE; SHALLOWAY, 1993; CASTORINA et al., 2010; CHEN et al., 2011; CHONG; SUH, 1995; EXLEY et al., 1993; HOLLÓSI et al., 1994; KAWAHARA et al., 1994; RICCHELLI et al., 2005). However, the mechanisms underlying accumulation of Al³⁺ and the development of AD remain unclear and controversial (EXLEY, 2014).

On the other hand, recent studies have found that neurogenesis occurs continuously in adulthood and declines with age (CAMERON.; MCKAY, 1999; GAGE, 2000; LOIS; ALVAREZ-BUYLLA, 1993). These findings may bring new perspectives in preventing the progression of neurodegenerative diseases by induction of neural precursor cells (NPCs). Thus,

it is necessary to investigate how Al³⁺ interferes with neurogenesis to define mechanisms involved in the pathophysiology of Al exposure and its relationship with AD.

Neural progenitor cells (NPCs) are multipotent cells and able to differentiate into neuronal and glial cells, which represents one of the most important steps during CNS development and maintenance of adult brain integrity (ALTMAN; DAS, 1965b; GAGE, 2000). NPCs can be isolated from the brain during their development and, under specific conditions, can multiply in culture and form cell aggregates, called neurospheres (LAMEU et al., 2012; MCKAY, 1997; NEGRAES et al., 2012). Neurosphere differentiation reflect cortex development in a simplified way and thus represent a simple and potent experimental model to evaluate the influence of external factors on NPC proliferation and differentiation (HUTTON; PEVNY, 2008; NEGRAES et al., 2012).

This study investigated the effects of Al³⁺ (in the chloride form - AlCl₃) exposure *in vitro* on neural differentiation and possible connections between Al and neurodegeneration. This model can be used in future investigations of the mechanisms of Al neurotoxicity in the CNS.

Material and Methods

Aluminum

Al³⁺ in the chloride form (AlCl₃; molecular weight 133.34 g mol⁻¹; purity 99%, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) was diluted in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Life Technologies, Carlsbad, CA) and added into NPC culture at 0.1, 1, 10, 50 and 100 μ M Al³⁺ before growth and differentiation induction (FU et al., 2003). All laboratory ware (pipet tips, volumetric flasks, stock bottles, plates, etc.) was immersed for 48 h in 10% (v/v) HNO₃/ethanol solution and washed with Milli-Q purified water to control contamination by Al. The solutions were prepared using only decontaminated materials as well as cell culture processes were performed in a class 100 clean bench to avoid air contamination.

Animal experiments for NPC isolation

Ten Swiss female mice and five male mice (45–60 days, 25–30 g) were provided by the Federal University of Santa Maria (UFSM). The animals underwent a 10-day period of adaptation in boxes ($30 \times 20 \times 13$ cm³) containing five animals each at a constant temperature ($23\pm1^{\circ}$ C) with a 12 h light/dark cycle with free access to food and water. All animal procedures were approved by the Institutional for Animal Care and Use of the UFSM (protocol number: 2712020517/2017). Following the adaptation period, female mice were mated with the male mice. Timed-pregnant animals were obtained by overnight mating and the efficiency of mating was confirmed by the appearance of the vaginal plug were used for NPC isolation and neurosphere formation.

NPC culture

NPCs were obtained from embryonic day 13 (E13) telencephalons of embryonic mice as previously described (HUTTON; PEVNY, 2008). The embryos were removed from the female mice following anesthetization with isoflurane and decapitation by cervical dislocation. Brains were kept in a petri dish containing frozen DMEM for further isolation of the telencephalon.

Embryonic telencephalons were dissected and incubated with 0.1% trypsin for 5 min at 37°C, and fetal bovine serum (FBS) was added to inactivate trypsin. The cells were further mechanically dissociated. Plating was performed with 2×10^5 cells/mL in DMEM/Ham's F-12 culture medium supplemented with 2% B-27 (Life Technologies), 20 ng/mL epidermal growth factor (EGF) and fibroblast growth factor (FGF)-2 (both from Sigma-Aldrich), 100 units/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin. Cells were cultured in the presence or absence of Al³⁺ (0.1–100 µM) and cultured at 37°C in a water-saturated atmosphere and 5% of CO₂ for 5 days to form neurospheres.

Cell cycle analysis

Cell cycle analysis of undifferentiated cells at a density of 2×10^5 cells/well treated with different concentrations of Al³⁺ were grown for 5 days was performed as previously described (WILLIAM-FALTAOS et al., 2006). Before differentiation, cells were harvested with trypsin, washed in PBS, centrifuged at 400 × g for 10 min, and fixed with 75% ethanol at 4°C. Cell pellets were then collected by centrifugation at 400 × g for 10 min and incubated with propidium iodide (PI; Sigma-Aldrich) solution (PBS with 100 µg/mL RNase A, 0.1% Triton X-100, 0.5% Tween 20 and 1µg/mL PI) for 24 h. Cell cycle phases were determined by flow cytometry using a BD FACS Calibur cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA) and results were quantified by FlowJo Software V10 (FlowJo, Ashland, OR).

MTT assay

Functionality of mitochondria was assessed by the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay (MOSMANN, 1983). MTT was dissolved in phosphate-buffered saline (PBS) at 5 mg/mL and added to a 96-well plate containing the sample, and the samples were incubated for 1 h at 37°C. After incubation, the supernatant was removed and the cells were suspended in 200 μ L of dimethyl sulfoxide. Plates were read at 570 nm using a spectrophotometer.

Apoptosis assay

Apoptosis and necrosis rates were assessed by using the FITC-Annexin-V and propidium iodide (PI) staining kit. After cell seeding and exposure to Al³⁺ in comparison to untreated control cells, samples were runon a flow cytometer and the results were analyzed

using the FlowJo V10 software. The results are reported as percentages of viable, apoptotic or necrotic cells (VERMES et al., 1995).

NPC migration and differentiation

Neurospheres were plated into adherent poly-L-lysine- and laminin-precoated cell-culture grade dishes and cultured without growth factors in the absence or presence of 1, 10, or 50 μ M Al³⁺ for neural differentiation. Migration assays were performed on day 7 of differentiation, and distances of foremost cells to the neurospheres were determined using differential interference contrast microscopy (HUTTON; PEVNY, 2008; PILLAT et al., 2016; TRUJILLO et al., 2012).

Immunofluorescence staining

For immunofluorescence, plated neurospheres were fixed in 4% PFA for 20 min at 37°C and permeabilized for 20 min with PBS plus 3% FBS and 0.1% Triton X-100 (NEGRAES et al., 2012). An incubation of 2 h with primary antibodies against GFAP (1:300; Cell Signaling Technology) and β 3-tubulin (1:500; Sigma-Aldrich), NPCs was followed by a washing step with PBS and incubation for another hour at room temperature with secondary Alexa Fluor 488- or 647-conjugated secondary antibodies (1:1,000; Life Technologies). Samples were then stained with DAPI solution (0.3 µg/mL; Sigma-Aldrich). Coverslips were mounted on the slides. Images were obtained using a fluorescence microscope (Axiovert 200, Zeiss, Jena, Germany), equipped to a digital camera and immunostaining was analyzed with NIS Elements software (Nikon).

Flow cytometry analysis

Flow cytometry was performed as previously described (MCLAREN et al., 2001; PILLAT et al., 2015). Neurospheres were dissociated and fixed for 20 min in ice-cold 1% PFA in PBS, washed with PBS supplemented with 2% FBS, and incubated for 30 min with primary antibodies against Nestin (1:500; Sigma-Aldrich), Glial fibrillary acidic protein (GFAP, 1:300; Cell Signaling Technology, Danvers, MA) and β 3-tubulin (1:500; Sigma-Aldrich). After washing with PBS, cells were incubated with Alexa Fluor 488- or 647-conjugated secondary antibodies (1:500) (Life Technologies) and analyzed by flow cytometry (BD FACS Calibur; BD Biosciences). Forty-thousand events were acquired per sample. Forward and side light-scatter signals were used to exclude dead cells and debris. Data were analyzed using the FlowJo V10 software (FlowJo) and plotted in a histogram format.

Statistical analysis

One-way analysis of variance followed by Tukey's post-test or Student's *t*-test using Graph Pad Prism (Version 5.0) software was used to assess statistical differences between groups. p < 0.05 was considered to represent significant difference. All data were expressed as mean values + standard deviation.

Results

Inhibitory effects of Al^{3+} on neurosphere growth

NPCs isolated from telencephalons of E13 mice were cultured under defined conditions to induce proliferation and formation of neurospheres (Fig 2). Cell morphology analysis revealed that Al^{3+} interferes with the aggregation of NPCs to form neurospheres, which was determined by measuring the number (Fig. 2A) and cell diameter (Fig. 2C) on day 5 of culture. Only a concentration of 100 μ M Al³⁺ resulted in diminished numbers of neurospheres compared to control cells (Fig. 2B). Further, only 100 μ M Al³⁺ reduced neurospheres diameters compared to untreated cells. On the other hand, Al³⁺ at 0.1, 1, 10, and 50 μ M did not have any significant effects on numbers and diameters of neurospheres (p>0.05).

Al^{3+} reduced proliferation of NPCs

Cell cycle distributions of NPCs were analyzed using PI staining, which measures proliferation effects by DNA content present in cells (Fig. 3). Al^{3+} increased the sub G1 phase and reduced the G2/M cell population when compared to control (p < 0.05). Thus, the results revealed the neurotoxic effects of highest concentrations of Al^{3+} influence neurosphere proliferation by affecting of the cell cycle.

Al³⁺ decreased mitochondrial functionality of neurospheres

Mitochondrial function of differentiated neurospheres was determined by the MTT assay after 24 h of cultured in the presence or absence of Al^{3+} . Figure 4 shows that 0.1 and 1 μ M Al^{3+} did not significantly affect mitochondrial function of cells. However, 10 and 50 μ M Al^{3+} significantly decreased the functionality of mitochondria compared to the control group. In addition, 100 μ M Al^{3+} reduced mitochondrial function of neurospheres by 55.7% compared to untreated cells.

Al^{3+} induced apoptosis in neurospheres

Cell death measurements were performed to complement shown alterations cell cycle and MTT results found in the previous sections. Figure 5 shows that Al^{3+} at 1, 10 and 50 μ M promoted apoptosis in neurospheres exposed to Al^{3+} compared to control cells (p < 0.05).

Al³⁺reduced migration of NPCs

NPC migration is an important process in defining neural fate. It is known that NPCs elongate radially. We analyzed neurosphere images after 7 days of differentiation. Figure 6A shows images of neurosphere migration in the presence or absence of Al^{3+} , where the region

enclosed by the dotted lines comprises 95% of migrating cells. As shown in Figure 6B, treatment with 1, 10, and 50 μ M Al³⁺ significantly decreased neural migration when compared to untreated neurospheres (p<0.05).

Al^{3+} compromised neural differentiation of NPCs

As shown above, neurospheres exposed to 1 μ M Al³⁺ reduced neurite elongation. Thus, we decided to use only the lower concentration of Al³⁺ (1 μ M) to analyze its effects on neurogenesis. Neurosphere differentiation fate studied as population frequencies expressing specific glial and neural cells markers (GFAP and β 3-tubulin, respectively). Through immunohistochemistry analysis confirmed that neurospheres treated with 1 μ M Al³⁺ exhibited augmented GFAP and reduced β 3-tubulin staining intensity compared to control neurospheres (Fig. 7A), indicating that Al³⁺ inhibits neurogenesis.

To confirm results of immunohistochemistry analysis and progress in the differentiation of neurospheres, cells were analyzed for neural stem/progenitor cel lmarker (Nestin) expression, once undifferentiated NPCs may express both GFAP and Nestin (FUKUDA et al., 2018). The results presented in Figure 7B show that neurospheres express Nestin, indicating the neural precursor nature of the spheres. After confirming an increase in the number of Nestin-positive cells, expression of the immature neuron marker β 3-tubulin and glial protein marker GFAP was assessed by flow cytometry. The results revealed that 1 μ M Al³⁺ decreased the β 3-tubulin⁺ cell population and augmented the number of GFAP-positive cells in relation to control neurospheres (Fig 7B). Thus, Al³⁺ affected neural fate by inhibiting NPC differentiation during brain development.

Discussion

The CNS is composed of a complex neuronal network which must be in perfect harmony under normal physiological conditions to prevent cognitive impairment (NOCTOR et al., 2004;RAKIC, 1988). Neuronal loss and incapacity of regeneration belong to the main features of neurodegenerative diseases. In this work, we performed an *in vitro* study to evaluate if Al³⁺ exposure at different concentrations affects neurogenesis to elucidate the effects of Al toxicity in the CNS.

NPCs grow under specific conditions to form neurospheres, which represent an *in vitro* model in which it is possible to evaluate their development against extrinsic factors (e.g., Al). One of the major advantages of the use of neurospheres is the representation of a specific model for studying neurogenesis (proliferation, migration, and differentiation), as well as the basic mechanisms involved in CNS disorders induced by excitotoxic stimuli. Furthermore, neurospheres from a fetal tissue sample proliferate and then differentiate in basal medium, generating a high number of glial cells and neurons [16, 20, 21]. The role of Al in neurodegeneration has been discussed for decades, but still generates considerable controversy. Studies with respect to the effects of Al in the brain remain unclear. Thus, neurospheres represent a simple way to elucidate the mechanisms involved in neurogliogenesis mimicking events occurring *in vivo*.

The morphology of neurospheres represents a parameter to evaluate the effects of Al^{3+} exposure of cell growth. Our data indicate that only the highest concentration of Al^{3+} used in this study (100 µM) decreased the number of neurospheres formed and their diameter (Fig. 2). Thus, we suggest that Al^{3+} affects cell morphology, preventing cell aggregation and inhibiting their ability to form neurospheres.

NPCs are continually generated during adult life, undergoing proliferation, migration, and differentiation to define their neural fate (MCKAY, 1997). One important process in neural fate and CNS formation is the cell cycle. It has been reported that environmental factors may

regulate cellular division, include physical and chemical factors, subsequently influencing the expansion and differentiation of NPCs, contributing to CNS physiopathology (SALOMONI; CALEGARI, 2010).

In our cell cycle analysis of undifferentiated cells, we observed thatAl³⁺ increased the cell population in the sub G1 phase, suggesting that Al³⁺ may cause apoptosis in the neurospheres at highest Al³⁺ concentrations. In addition, Al³⁺ decreased the number of cells in G2/M phase, indicating that this ion has a decisive function in proliferation inhibition of NPCs during neuronal development and regeneration following injury (Fig. 3). This reduction in symmetric or asymmetric capability directly affects the cell's decision to differentiate into neurons or glial cells.

Al is a neurotoxin that enters the CNS through the BBB and diffuses into most nerve cells, including NPCs. As NPCs play a key role in the development and regeneration of the adult brain, this metal may contribute to neuropathological conditions. Our results showed that Al^{3+} -treated neurospheres diminished their mitochondrial function. The highest used concentration of 100 μ M Al^{3+} reduced functionality of mitochondria by 55.7% following 24h of differentiation induction (Fig. 4). In addition, these results were confirmed by apoptosis assay, indicating that Al^{3+} at 1, 10 and 50 μ M concentrations induced apoptosis of neurospheres (Fig. 5). Thus, further experiments were performed at 1, 10, and 50 μ M concentrations of Al^{3+} , according to results obtained with mitochondrial function of cells and apoptosis induction.

In addition, effects of Al^{3+} at 1, 10 and 50 μ M concentrations were assessed on neurite migration, as the first step for neural fate determination. Our results reveal that these concentrations of Al^{3+} decreased neurosphere migration (Fig. 6). Abnormal cell migration may occur due to mitochondrial dysfunction, as shown in Fig 4. In addition, due to its small atomic radius and high charge, Al^{3+} is a reactive metal ion that can access the intracellular machinery of the CNS as a free ion or complexed with high affinity to amino acids or proteins (e.g.,

transferrin), affecting the homeostasis of other cations essential forcerebral metabolism, such as i.e. Fe³⁺ (GUO; LIANG, 2001; YOKEL, 2006;YOKEL et al., 2001). Thus, our findings suggest that Al³⁺ may inhibit cell migration, there by affecting the CNS and contributing to neurodegeneration, as observed in the pathology of brains of AD patients (CHONG; SUH, 1995; EXLEY, C et al., 1993; KAWAHARA et al., 1994; RICCHELLI et al., 2005).

Since neurospheres exposed to $1 \mu M Al^{3+}$ reduced elongation of neurite, we then assessed neural fate determination only at lower concentration ($1 \mu M Al^{3+}$). It is known that daily Al absorption is very low (BERTHON, 2002b), thus, the use of a smaller concentration more closely resembles reality.

Cells migrate to form a gradient of cell maturation and cellular fates that can be analyzed by staining with specific markers for glial cells and neurons (GAGE, 2000). Neurospheres exposed to Al^{3+} resulted in an increase in the percentages of GFAP⁺ cells and reduction of β 3tubulin⁺ cells (Fig. 7A). However, we observed that Al^{3+} also increased the number of Nestin⁺ -positive cells, shown by flow cytometry, indicating that Al^{3+} impairs cell differentiation (coexpression of Nestin⁺ and GFAP⁺). By mimicking neurogenesis *in vitro* using the mouse embryonic telencephalon neurosphere model, our findings indicate that augmented double labeling of cells for Nestin and GFAP by Al^{3+} may come from a global inhibition of differentiation and neurogenesis. Thus, Al^{3+} -induced neurotoxicity might in a reduced ability to form neurons, interfering with neural development and adult brain repair mechanisms (NAM et al., 2016; SERGENT-TANGUY et al., 2006).

In summary, our data reveal that Al^{3+} causes significant effects on the cell cycle, reducing neurosphere proliferation and inducing apoptosis in these cells. Neurogenesis was severely affected in the presence of Al^{3+} , and we suggest that neuronal regeneration may be compromised in the brain. In addition, Al^{3+} supports the maintenance of undifferentiated neural progenitor cells, indicating a possible link with neurodegeneration by differentiation inhibition
and subsequently reduced neurogenesis. Thus, our study reveals that the neurosphere model is scientifically useful for studying effects of Al^{3+} on the formation of NPCs and neurons.

Conflict of interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgments

This study was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – process number: 306238/2017-9), Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS/PRONEX – process number: 16/2551-0000499-4) and Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/- process number: 88882.182146/2018-01). HU acknowledges Grant support by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (São Paulo Research Foundation FAPESP project no. 2012/50880-4). MMP is grateful for a post-doctoral fellowship from FAPESP (project No. 2015/19478-3).

References

Abdel-Ghany M, El-Sebae AK, Shalloway D (1993) Aluminum induced nonenzymatic phospho-incorporation into human tau and other proteins. J Biol Chem 268:11976–11981

Altman J, Das GD (1965) Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. J Comp Neurol 124:319–335. https://doi.org/10.1002/cne.90124 0303

Bakar C, Karaman HIÖ, Baba A, Şengünalp F (2010) Effect of high aluminum concentration in water resources on human health, case study: Biga Peninsula, northwest part of Turkey. Arch Environ Contam Toxicol 58:935–944. https://doi.org/10.1007/ s0024 4-009-9435-3

Becaria A, Campbell A, Bondy S (2002) Aluminum as a toxicant. Toxicol Ind Health 18:309–320. https://doi.org/10.1191/0748233702 th1570a

Berthon G (2002) Aluminium speciation in relation to aluminium bioavailability, metabolism and toxicity. Coord Chem Rev 228:319–341.https://doi.org/10.1016/S0010 -8545(02)00021-8

Cameron HA, McKay RDG (1999) Restoring production of hippocampal neurons in old age. Nat Neurosci 2:894–897. https://doi.org/10.1038/13197

Castorina A, Tiralongo A, Giunta S et al (2010) Early effects of aluminum chloride on betasecretase mRNA expression in a neuronal model of ß-amyloid toxicity. Cell Biol Toxicol 26:367–377. https://doi.org/10.1007/s1056 5-009-9149-3

Chen WT, Liao YH, Yu HM et al (2011) Distinct effects of Zn2+, Cu2+, Fe3+, and Al3+ on amyloid- β stability, oligomerization, and aggregation: amyloid- β destabilization promotes annular protofibril formation. J Biol Chem 286:9646–9656. https://doi.org/10.1074/jbc.M110.17724 6

Chong YH, Suh YH (1995) Aggregation of amyloid precursor proteins by aluminum in vitro. Brain Res 670:137–141. https://doi.org/10.1016/0006-8993(94)01304 -Z

Exley C (2013) Human exposure to aluminium. Environ Sci Process Impacts 15:1807–1816. https://doi.org/10.1039/C3EM0 0374D

Exley C (2014) Why industry propaganda and political interference cannot disguise the inevitable role played by human exposure to aluminium in neurodegenerative diseases, including Alzheimer's disease. Front Neurol 5:1-5

Exley C (2017) Aluminum should now be considered a primary etiological factor in Alzheimer's disease. J Alzheimers Dis Rep 1:23–25. https://doi.org/10.3233/ADR-170010

Exley C, Price NC, Kelly SM, Birchall JD (1993) An interaction of beta-amyloid with aluminium in vitro. FEBS Lett 324:293–295. https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)80137 -j

Fu H, Hu Q, Lin Z et al (2003) Aluminum-induced apoptosis in cultured cortical neurons and its effect on SAPK/JNK signal transduction pathway. Brain Res 980:11–23

Fukuda S, Kato F, Tozuka Y et al (2018) Two distinct subpopulations of nestin-positive cells in adult mouse dentate gyrus. J Neurosci 23:9357–9366. https://doi.org/10.1523/jneurosci.23-28-09357 .2003

Gage FH (2000) Mammalian Neural Stem Cells. Science 287:1433–1438. https://doi.org/10.1126/scien ce.287.5457.1433

Guo G-W, Liang Y-X (2001) Aluminum-induced apoptosis in cultured astrocytes and its effect on calcium homeostasis. Brain Res 888:221–226. https://doi.org/10.1016/S0006 - 8993(00)03057 -2

Hollósi M, Shen ZM, Perczel A, Fasman GD (1994) Stable intrachain and interchain complexes of neurofilament peptides: a putative link between Al3+ and Alzheimer disease. Proc Natl Acad Sci USA 91:4902–4906. https://doi.org/10.1073/pnas.91.11.4902

Hutton SR, Pevny LH (2008) Isolation, culture, and differentiation of progenitor cells from the central nervous system. Cold Spring Harb Protoc 3:1–5. https://doi.org/10.1101/pdb.prot5 077

Kawahara M, Muramoto K, Kobayashi K et al (1994) Aluminum promotes the aggregation of Alzheimer's amyloid β -protein in vitro. Biochem Biophys Res Commun 198:531–535. https://doi.org/10.1006/bbrc.1994.1078 Lameu C, Trujillo CA, Schwindt TT et al (2012) Interactions between the NO-citrulline cycle and brain-derived neurotrophic factor in differentiation of neural stem cells. J Biol Chem 287:29690–29701. https://doi.org/10.1074/jbc.M111.33809 5

Lois C, Alvarez-Buylla A (1993) Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. Proc Natl Acad Sci USA 90:2074–2077. https://doi.org/10.1073/pnas.90.5.2074

McKay R (1997) Stem cells in the central nervous system. Science 276:66–71. https://doi.org/10.1126/scien ce.276.5309.66

McLaren FH, Svendsen CN, Van der Meide P, Joly E (2001) Analysis of neural stem cells by flow cytometry: cellular differentiation modifies patterns of MHC expression. J Neuroimmunol 112:35–46. https://doi.org/10.1016/j.brain resbu ll.2008.08.019

Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods 65:55–63. https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303 -4

Nam SM, Kim JW, Yoo DY et al (2016) Effects of aluminum on the reduction of neural stem cells, proliferating cells, and differentiating neuroblasts in the dentate gyrus of d-galactose-treated mice via increasing oxidative stress. J Vet Sci 17:127–136. https://doi.org/10.4142/jvs.2016.17.2.127

Negraes PD, Schwindt TT, Trujillo CA, Ulrich H (2012) Neural differentiation of P19 carcinoma cells and primary neurospheres: cell morphology, proliferation, viability, and functionality. Curr Protoc Stem Cell Biol. https://doi.org/10.1002/97804 70151 808.sc02d 09s20

Noctor SC, Martinez-Cerdeño V, Ivic L, Kriegstein AR (2004) Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. Nat Neurosci 7:136–144. https://doi.org/10.1038/nn117 2

Pillat MM, Cheffer A, de Andrade CM et al (2015) Bradykinininduced inhibition of proliferation rate during neurosphere differentiation: Consequence or cause of neuronal enrichment? Cytom Part A 87:929–935. https://doi.org/10.1002/cyto.a.22705

Pillat MM, Lameu C, Trujillo CA et al (2016) Bradykinin promotes neuron-generating division of neural progenitor cells through ERK activation. J Cell Sci 129:3437–3448. https://doi. org/10.1242/jcs.19253 4

Rakic P (1988) Specification of cerebral cortical areas. Science 241:170–176. https://doi.org/10.1126/scien ce.32911 16

Ricchelli F, Drago D, Filippi B et al (2005) Aluminum-triggered structural modifications and aggregation of β -amyloids. Cell Mol Life Sci 62:1724–1733. https://doi.org/10.1007/s00018-005-5141-0

Saiyed SM, Yokel RA (2005) Aluminium content of some foods and food products in the USA, with aluminium food additives.

77

Food Addit Contam 22:234-244. https://doi.org/10.1080/0265203050 00735 84

Salomoni P, Calegari F (2010) Cell cycle control of mammalian neural stem cells: putting a speed limit on G1. Trends Cell Biol 20:233–243

Sergent-Tanguy S, Michel DC, Neveu I, Naveilhan P (2006) Longlasting coexpression of nestin and glial fibrillary acidic protein in primary cultures of astroglial cells with a major participation of nestin +/GFAP- cells in cell proliferation. J Neurosci Res 83:1515–1524. https://doi.org/10.1002/jnr.20846

Trujillo CA, Negraes PD, Schwindt TT et al (2012) Kinin-B2 receptor activity determines the differentiation fate of neural stem cells. J Biol Chem 287:44046–44061. https://doi.org/10.1074/jbc.M112.40719 7

Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutellingsperger C (1995) A novel assay for apoptosis Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. J Immunol Methods 184:39–51. https://doi.org/10.1016/0022-1759(95)00072 -I

William-Faltaos S, Rouillard D, Lechat P, Bastian G (2006) Cell cycle arrest and apoptosis induced by oxaliplatin (L-OHP) on four human cancer cell lines. Anticancer Res 26:2093–2099

Yokel Ra (2006) Blood-brain barrier flux of aluminum, manganese, iron and other metals suspected to contribute to metal-induced neurodegeneration. J Alzheimers Dis 10:223–253. https://doi.org/10.3233/JAD-2006-102-309

Yokel RA, Rhineheimer SS, Sharma P et al (2001) Entry, half-life, and desferrioxamineaccelerated clearance of brain aluminum after a single26Al exposure. Toxicol Sci 64:77–82. https://doi.org/10.1093/toxsc i/64.1.77



Figure 1. Experimental Design. NPCs obtained from embryonic day 13 telencephalons of embryonic mice were mechanically dissociated and plating with 2×105 cells / mL in DMEM/Ham's F-12 culture medium supplemented with 2% B-27, 20 ng/mL epidermal growth factor (EGF) and fibroblast growth factor (FGF)-2, 100 units/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin. Cells were cultured in the presence or absence of Al³⁺ (0.1–100 µM) for 5 days to form neurospheres. After, the EGF and FGF-2 were removed to induced neurospheres differentiation for 7 days.





[Al³⁺] μM

Figure 2. Effects of Al³⁺ (in the AlCl₃ form) on neurospheres morphology of embryonic mouse NPCs. A. Neurosphere formation upon NPC treatment with Al³⁺ at concentrations from 0 μ M to 100 μ M. Scale bar: 100 μ m. B. Quantification of neurosphere number per well. C. Diameter of neurospheres following Al³⁺ treatment. Scale bar: 100 μ m. D. Quantification of neurosphere diameter was done using the ImageJ software. Values are expressed as mean + S.D. (p <0.05; n = 3 by ANOVA Tukey's post test).

Al³⁺ 100 μM

79



Figure 3. Effect of Al³⁺ (in the AlCl₃ form) on cell cycle distribution in neurospheres. Flow cytometry analysis demonstrated the fractions of phases (Sub G₁, G₀/G₁, S and G₂/M) of cell cycle of neurospheres treated with Al³⁺. Quantification of cell cycle distribution was done by the FlowJo software. Values are expressed as mean + S.D. (p < 0.05; n = 3 by ANOVA Tukey's post test).



Figure 4. Effects of Al³⁺ (in the AlCl₃ form) treatment on mitochondrial functionality of neurospheres determined by the MTT assay. Values are expressed in percentage in relation to the control. Bars represent mean + S.D. (p < 0.05; n = 3 by ANOVA Tukey's post test).





Figure 5. Evaluation of cell death by apoptosis using annexin V-FITC/PI staining of neurospheres treated with Al^{3+} (in the AlCl₃ form). A. Dot-plot profile of untreated cells and cells treated with Al^{3+} . B. Quantitative analysis of the live and apoptotic cells from (A). Values are expressed as mean + S.D. (p < 0.05; n = 3 by ANOVA Tukey's post test).





Figure 6. Effects of Al³⁺ (in the AlCl₃ form) on neurosphere migration. A. Phase contrast images representing migration pattern after 7 days of neural differentiation in the presence or absence of Al³⁺. The region comprised by the dotted lines corresponds to approximately 95% of migrating cells. Scale bar: 100 μ m. B. Quantification of neural migration was done using ImageJ software and expressed as fold change. Values are expressed as mean + S.D. (p <0.05; n = 3 by ANOVA Tukey's post test).



С		
	Mean ± S.D. (%)	
Marker	Control	$Al^{3+} 1 \mu M$
Nestin	29.5 ± 5.2	$76.6 \pm 2.2*$
β3-Tubulin	72.0 ± 2.1	31.7 ± 5.5*
GFAP	32.8 ± 8.5	$68.3 \pm 6.7*$

Figure 7. Al³⁺ (in the AlCl₃ form) affects NPCs differentiation A. Immunostaining of neurospheres differentiated in the presence of Al³⁺ 1 μ M, for β 3-tubulin and GFAP expression. n=3. Scale bar: 20 μ m (n=3). B. Histogram of expression analysis of Nestin, β 3-Tubulin and GFAP by flow cytometry in differentiated embryonic neurospheres for 7 days in the presence (blue) or absence of Al³⁺ (gray). C. Quantification of the percentage of cells expressing Nestin, β 3-tubulin and GFAP. Values are expressed as mean + S.D. of three independent trials performed in triplicate. Statistical analysis was performed using Student's t-test. n = 3. * p < 0.05 compared to the control group.

Artigo 2: Publicado

Aluminum-induced alterations of purinergic signalling in embryonic neural progenitor

cells

Dados sobre o periódico: Chemosphere ISSN: 0045-6535 Fator de Impacto: 5.10 Qualis Capes: A2 Endereço eletrônico:_https://www.journals.elsevier.com/chemosphere

Volume 244, April 2020 ISSN 0045-6535

Chemosphere



ARTICLE IN PRESS

Chemosphere xxx (xxxx) xxx



Aluminum-induced alterations of purinergic signalling in embryonic neural progenitor cells

Karine P. Reichert 4 ", Micheli M. Pillat b, Maria Rosa C. Schetinger 4, Nathieli B. Bottari 4, Tais V. Palma ^a, Charles E, Assmann ^a, Jessie M. Gutierres ^c, Henning Ulrich ^b, Cinthia M. Andrade ^a, Christopher Exley ^d, Vera M.M. Morsch ^a, ^a

² Post-Graduate Program in Biobolical Sciences: Taxicological Biochemistry, CCNE, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of

Santa Maria (UFSM). Santa Maria, RS, Brazil ^b Department of Microbiology and Panaltology, Health Sciences Center, Federal University of Santa Maria RS, Brazil

^c Laboratory of Research in Pathology, Federal University of Health Sciences of Forto Megre (URCSPA), Porto Alegre, RS, Brazil ^d Birchall Contre, Lennard-Jones Laboratories, Keele University, Staffordshire, ST5 5BG, UK

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history: Received 18 December 2019 Received in revised form 17 March 2020 Accepted 27 March 2020 Available online xxx

Handling Editor: A Gies

Keywords: Aluminum **IPCs**

ABSTRACT

The ubiquitous presence of aluminum in the environment leads to a high likelihood of human exposure, Neurotoxicity of the trival ent cationic form of this metal (Al3+) occurs in the central nervous system via ulation of Al in cells of neural origin, including neural progenitor cells (NPCs). NPCs play a key role acoun in the development and regeneration of the brain throughout life; therefore, this metal may contribute to neuropathological conditions. Here, we evaluated the effects of different Al3+ concentrations (0-50 µM) on the purinergic system of NPCs isolated from embryonic telencephalons, cultured as neurosphe A¹³⁺ adhered to the cell surface of neurospheres reducing extracel ular ATP release, as well as ATP, ADP, and AMP hydrolysis by NTPDase and 5^o-nucleotidase, respectively. In addition, impaired nucleotide release by Al¹⁴ reduced P2V1 and adenosine A2A receptors expression in differentiated neurospheres. These receptors are crucial for NPC proliferation during brain development and self-repair against external stimuli, such as metal exposure. Thus, Al3+ represents an environmental agent linked to

Abbreviations: Al²⁶, Al trivalent cationic form; NPG, Neural progenitor cells; ATP, Adenosine triphosphate; ADP, Adenosine diphosphate; AMP, Adenosine doaminase; NPDase, Nucleoside triphosphate diphosphotae; ADR, Adenosine ADA receptor; ALR, Adenosine AT re-ceptor; P2Y1R, P2Y1 receptor; P2, ATP/ADP receptors; P1, Adenosine receptors; OKS, Central Nervous System; DMEM, Dulbecco's Modified Eagle's Medium; FRS, Fetal Bovine Serum; B-27, B-27 supplement; EGF, Epidemail Corverb Factor; FRS-2, Ribrohas Corverb Factor; FRA, Ra formaldeyde; DAPI, 4, 6-diam dilno-2-phenylindole. • Corresponding author; Laboratory of Toxicological Enzymology, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Santa María, 97 105-900, Santa María, S-2, Brevia

Maria, RS, Brazil. Corresponding author, Laboratory of Toxicological Bizymology, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Santa Maria, 97 105–900, Santa Maria, RS, Bizzil.

E-mail addresses kakareichert@yahoo.com.hr (K.P. Reichert), veramorsch@gmail.com (V.M.M. Morsch).

//doi.org/10.1016/jzhemosphere,2020.126642 0045-6535/0 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Please cite this article as: Reichert, KP et al., Aluminum-induced alterations of purinergic signalling in embryonic neural progenitor cells, Chemosphere, https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126642

Abstract

The ubiquitous presence of aluminum in the environment leads to a high likelihood of human exposure. Neurotoxicity of the trivalent cationic form of this metal (Al³⁺) occurs in the central nervous system via Al-induced accumulation in cells of neural origin, including neural progenitor cells (NPCs). NPCs play a key role in the development and regeneration of the brain throughout life; therefore, this metal may contribute to neuropathological conditions. Here, we evaluated the effects of different Al³⁺ concentrations (0-50 µM) on the purinergic system of NPCs isolated from embryonic telencephalons, cultured as neurospheres. Al³⁺ adhered to the cell surface of neurospheres reducing extracellular ATP release, as well as ATP, ADP, and AMP hydrolysis by NTPDase and 5'-nucleotidase, respectively. In addition, impaired nucleotide release by Al³⁺ reduced P2Y1R and A2AR expression in differentiated neurospheres. These receptors are crucial for NPC proliferation during brain development and self-repair against external stimuli, such as metal exposure. Thus, Al³⁺ represents an environmental agent linked to neurological disease development by alterations in ATP signal pathway represent an important mechanism associated synergistically with NPC proliferation and brain degeneration.

Keywords: Aluminum, NPCs, neurospheres, ATP, purinoreceptors.

Introduction

Aluminum (Al) is the third most abundant element in the Earth's crust and represents an environmental risk factor for neurodegeneration (BONDY, 2016; EXLEY, 2012, 1999). Al exposure occurs through food additives, utensils, drugs, vaccines, cosmetics, and drinking water; thus, this metal is absorbed and may be distributed throughout the central nervous system (CNS) (EXLEY, 2013; SCHAEFER; JAHREIS, 2006; TIETZ et al., 2019).

Previous studies by our research group have shown that Al may contribute to neurodegeneration by reducing proliferation and differentiation of neural progenitor cells (NPCs) (REICHERT et al., 2019). Embryonic NPCs are multipotent stem cells with the capacity to differentiate into the three major cell types of the CNS: neurons, oligodendrocytes, and astrocytes (GAGE, 2000). NPCs are the key to embryonic development and the maintenance of CNS integrity during adulthood (BOLDRINI et al., 2018).

NPCs express enzymes and other biomolecules essential to cerebral metabolism (OLIVEIRA; ILLES; ULRICH, 2016; ULRICH; ABBRACCHIO; BURNSTOCK, 2012). One important class of these biomolecules is extracellular purine and pyrimidine compounds, which are associated with a multiplicity of cellular signaling pathways. Evidence exists for the participation of ATP-activated purinergic receptor subtypes purinergic signaling in multiple trophic events, which are necessary for embryonic brain development, including progenitor proliferation, migration, neural differentiation and cell survival (BURNSTOCK; DALE, 2015; OLIVEIRA; ILLES; ULRICH, 2016; RODRIGUES; MARQUES; CUNHA, 2018).

Extracelllular nucleotides act by binding to cell-surface receptors, such as ATP/ADPreceptors, which are known as P2 receptors and include (P2X₁₋₇) and (P2Y₁₋₁₄) receptors (ZIMMERMANN, 2011). *In vitro* studies of gene expression have shown that some purine receptor subtypes are expressed during CNS development, such as P2X2, P2X5, P2X7, P2Y1, P2Y2, and P2Y6 receptors (KHAIRA; POUTON; HAYNES, 2009; LV; SHAO; GAO, 2018; OLIVEIRA; ILLES; ULRICH, 2016).

Similarly, the ATP nucleoside derivate adenosine is also involved in neuromodulation of the CNS by mitogenic effects linked to activation of specific receptors and interacts in the neural network with other neurotransmitters (BURNSTOCK; DALE, 2015; RATHBONE et al., 1999). Adenosine acts on P1 receptors, which can be subdivided into four types: A1, A2A, A2B, and A3 subtypes, coupled to different G proteins that are associated with various intracellular transduction cascades (BURNSTOCK, 2007a; CIRUELA et al., 2010).

Purine receptor activation plays crucial roles in proliferation induction of NPCs, (OLIVEIRA; ILLES; ULRICH, 2016). Purinergic receptors participate in calcium-dependent neuron-glia communication controlling NPC behavior and play a crucial role in regeneration and self-repair in the adult brain after injury (CHADWICK; GOODE, 2008; RODRIGUES; MARQUES; CUNHA, 2018; ULRICH; ABBRACCHIO; BURNSTOCK, 2012).

ATP is released from cells by exocytosis or through membrane channels, and the extracellular levels of its bioavailable form are controlled by cell surface-located ectoenzymes that catalyze its degradation (ZIMMERMANN, 2001). The enzymes involved in this signaling cascade include NTPDase/CD39, which hydrolyzes ATP to ADP and/or AMP, followed by 5'-NT/CD73, which converts AMP into adenosine, and finally, this molecule is deaminated to inosine by adenosine deaminase (E-ADA) (ZIMMERMANN, 2001; 2008b).

In this way, the purinergic pathway may be a target for the development of new strategies to treat neurodevelopmental conditions and neurodegeneration. Therefore, this study identifies for the first time Al-promoted effects on the purinergic signaling systems during embryonic development (in the AlCl₃ form), by an NPC-based *in vitro* model of neurogenesis.

Material and Methods

Aluminum

Al in the form of aluminum chloride (AlCl₃; molecular weight 133.34 g mol⁻¹; purity 99%, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) was diluted in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Life Technologies, Carlsbad, CA) and added to NPC cultures in the presence of 1, 10, and 50 μ M Al³⁺ during differentiation, according to previous studies (FU et al., 2003; REICHERT et al., 2019). All laboratory ware was immersed for 48 h in 10% (v/v) HNO₃/ethanol solution and washed with Milli-Q purified water for elimination of contamination with Al. All procedures were carried out with decontaminated materials in a class 100 clean bench to avoid air contamination.

Animal experiments for NPC isolation

Swiss mice (45–60 days, 25–30 g) provided by the Federal University of Santa Maria (UFSM) were used for NPC isolation and neurosphere formation. Animals were maintained at a constant temperature ($23 \pm 1^{\circ}$ C) with a 12 h light/dark cycle with free access to food and water. Timed-pregnant animals were obtained by overnight mating. The efficiency of pregnancy was confirmed by the appearance of vaginal plugs. Following 13 days of gestation, females were anesthetized with isoflurane and decapitated by cervical dislocation. All animal procedures were approved by the Institutional for Animal Care and Use of the Federal University of Santa Maria, Brazil (protocol number: 2712020517/2017).

NPC culture

NPCs were obtained from embryonic day 13 (E13) telencephalons of embryonic mice as previously described (HUTTON; PEVNY, 2008). Embryonic telencephalons were kept in Petri dishes containing frozen DMEM and, following dissection, incubated with 0.1% trypsin at 37 °C. Fetal bovine serum (FBS) was added for trypsin inactivation. Cells were mechanically dissociated and plated at a concentration of 2×10^5 cells/mL in DMEM/Ham's F-12 culture medium supplemented with 2% B-27 (Life Technologies), 20 ng/mL each of epidermal growth factor (EGF) and fibroblast growth factor (FGF)-2 (both from Sigma-Aldrich), 100 units/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin. Cells were cultured for 5 days to form neurospheres in the presence or absence of Al (1, 10, and 50 µM), and differentiation was induced for 7 days at 37 °C in a water-saturated atmosphere with 5% CO₂.

Al accumulation in neurospheres by Lumogallion staining

For immunofluorescence, whole differentiated neurospheres were prepared on polylysine-coated slides as described by Mold and co-workers (MOLD et al., 2014; 2018). Subsequently, cell sections were incubated with 100 μM lumogallion [4-chloro-3-(2,4dihydroxyphenylazo)-2-hydroxybenzene-1-sulphonic acid] (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX) for 24 h at 37 °C in the dark. After 24 h slides were washed in ultrapure water, air-dried and fixed in 4% para-formaldehyde (PFA). Cell nuclei were stained with DAPI solution (0.3 mg/mL, Sigma-Aldrich), and coverslips were mounted on slides. Images were obtained using a fluorescence microscope (Axiovert 200, Zeiss, Jena, Germany) equipped with a digital camera, and immunostaining was analyzed with the NIS Elements software (Nikon).

Measurement of extracellular ATP in cell supernatants

The extracellular ATP concentration was quantified in cell supernatants by bioluminescence using a Molecular Probes® ATP determination assay kit (Cat. No. A22066, Invitrogen, Carlsbad, CA), according to the manufacturer's instructions. The ATP concentration was determined with recombinant firefly luciferase and its substrate, D-Luciferin. The assay is based on the absolute requirement of luciferase for ATP to produce light ($\lambda em \approx$

560 ηm at pH 7.8). This assay is extremely sensitive and can detect as little as 0.1 picomoles of pre-existing ATP or ATP as it is being formed in kinetic systems (MORCIANO et al., 2017).

E-NTPDase, E-5'-nucleotidase and E-ADA assays

For enzymatic assays, differentiated neurospheres were centrifuged for 5 min at 200 x g and dissociated into a single cell suspension in saline (NaCl 0.9%). Twenty microliters of cell suspension (0.8–1.0 mg/mL protein) were added to the reaction mixture of E-NTPDase or E-5'-nucleotidase and preincubated for 10 min at 37 °C in a final volume of 200 µL. E-NTPDase activity was determined by the method of Schetinger et al. (SCHETINGER et al., 2000). The reaction was started by addition of ATP or ADP as the substrate at a final concentration of 1.0 mM. E-5'-nucleotidase activity was determined by the method of Heymann et al. (HEYMANN; REDDINGTON; KREUTZBERG, 1984a). Phosphate released by hydrolysis of ATP, ADP, and AMP was measured by using KH₂PO₄ as standard. Protein levels were measured according to Bradford (BRADFORD, 1976). Enzyme specific activities are reported as nmol Pi released/min/mg of protein.

ADA activity assays were performed in differentiated neurospheres and quantified spectrophotometrically by a method previously described, as the measurement of ammonia produced when adenosine deaminase acts in excess of adenosine (GIUSTI G; GALANTI B, 1984). For the assay, 50 μ L of cell suspension was reacted for 60 min with 21 mmol/L of adenosine, pH 6.5, at 37 °C. The reaction was stopped with 106.2 mM phenol and 167.8 mM sodium nitroprusside and a hypochlorite solution. The amount of ammonia produced was measured by absorption at 620 nm, and results were expressed in U / mg of protein.

Flow cytometry analysis

Flow cytometry was performed as previously described (MCLAREN et al., 2001;PILLAT et al., 2015). Neurospheres were dissociated and fixed for 20 min in ice-cold 1% PFA in PBS, washed with PBS supplemented with 2% FBS, and incubated for 30 min with primary antibodies against A1, A2A, P2Y1, CD 39, CD 73, and ADA1 (1:200; Santa Cruz Biotechnology). After washing with PBS, cells were incubated with Alexa Fluor 488- or 647- conjugated secondary antibodies (1:500) (Life Technologies, Carlsbad, CA) and analyzed by flow cytometry (BD FACS Calibur; BD Biosciences, La Jolla, CA). Forty thousand events were acquired per sample. Forward and side light-scatter signals were used to exclude dead cells and debris. Data were analyzed by using the FlowJo V10 software (FlowJo, BD Biosciences) and plotted in histogram format.

Statistical analysis

One-way analysis of variance followed by Tukey's post-test using Graph Pad Prism (Version 5.0) software was used to assess statistically significant differences between experimental groups. P < 0.05 was considered to represent a significant difference. All data were expressed as mean values and standard error of the mean (+ S.E.M.) and represents three independent trials performed in triplicate.

Results

Al^{3+} accumulation in neurospheres measured by Lumogallion fluorescence

Control neurospheres cultured in the absence of Al^{3+} only emitted blue fluorescence (DAPI), indicating the cell nuclei. This result was confirmed by merging images taken with Lumogallion and DAPI, in which blue light channels prevailed. In addition, neurospheres cocultured with Al^{3+} at concentrations of 1, 10, and 50 µM revealed a concentration-dependent intensity of Lumogallion labelling (orange), as an intense intracellular blue fluorescence (DAPI) was observed. Neurospheres are clusters of NPCs, and an overlay of representative images showed Lumogallion-Al complexes, confirming that neurospheres internalized free Al ion, predominantly in the cytoplasm (Fig 2).

*Al*³⁺ *diminished extracellular ATP levels*

Extracellular ATP concentration measurement using recombinant luciferase is a sensitive and selective in vitro assay. Figure 2A shows the ATP levels, in percentage of control, calculated in cell supernatants, indicating a small ATP release of 0.0141 pmol in the control group and 0.088 pmol at the highest Al^{3+} concentrations. These results reveal that chronic exposure of Al^{3+} at concentrations of 10 and 50 µM reduced ATP levels by 33.1% and 32.8%, respectively (Fig. 3A). In addition, we prepare the standard curve of the assay in the presence of Al^{3+} , to demonstrate if this metal may affect the assay. Our results presented in Figure 3B shown that in the presence of Al^{3+} at concentrations of 1, 10 and 50 µM, the levels of ATP diminished, by bioluminescence intensity of luciferase using ATP as substrate.

Al³⁺ reduced nucleotide hydrolysis of NPCs

Al³⁺ affected extracellular nucleotide and nucleoside hydrolysis in NPCs (Fig. 4A–D). As observed in Figure 4A, neurospheres treated with Al³⁺ at concentrations of 1, 10, and 50 μ M reduced ATP hydrolysis (p < 0.05) to 18.0%, 29.6%, and 22.8%, respectively, when compared with untreated cells. Similar results were observed for ADP hydrolysis (p < 0.05), which was reduced in neurospheres exposed to 1, 10, and 50 μ M Al³⁺ to 27.4%, 30.6%, and 26.6%, respectively, when compared with the control group (Fig. 4B). Following the ectoenzyme cascade, AMP hydrolysis decreased by 39.8%, 51.3%, and 39.4%, respectively, in neurospheres treated with Al³⁺ at concentrations of 1, 10, and 50 μ M (p < 0.05), compared with cells

maintained in the absence of Al³⁺ (Figure 4C). Finally, exposure to Al³⁺ did not alter E-ADA activity (Fig 4D).

Al^{3+} did not alter ectoenzyme expression

Since we found that Al^{3+} reduces purine nucleotide hydrolysis by ectoenzymes, we evaluated whether this was due to a concomitant reduction in the expression of these enzymes on NPCs. Figure 5 shows that Al^{3+} did not cause significant differences in enzyme expression at any of the tested concentrations. Regarding ATP and ADP hydrolysis, we analyzed NTPDase 1 and 2 expression, as it has been described that NTPDase 2 expression prevails in NPCs. Regarding AMP hydrolysis, flow cytometry revealed that Al^{3+} at different concentrations did not alter 5'-nucleotidase expression. Furthermore, Al^{3+} did not reveal any significant effect on ADA expression.

Reduction of purinoreceptor expression by Al^{3+}

Differential expression of purinergic receptors during embryonic development lets to suggest the importance of these receptors (Burnstock and Ulrich, 2011). Flow cytometry experiments shown in Figure 6 clearly confirmed that exposure of NPCs to Al^{3+} at concentrations of 1, 10, and 50 µM decreased P2Y1R expression by 39.1%, 58.5%, and 66.4%, respectively (p > 0.05) (Fig. 6A).

Further, regarding adenosine receptors, it was observed that Al^{3+} did not alter A1 receptor expression, when compared with the untreated control (Fig. 6B). On the other hand, 1, 10, and 50 μ M Al³⁺ diminished the frequency of A2A receptor expression in turn by 43.6%, 72.8%, and 79.3%, respectively, compared with control cells (p < 0.05) (Fig. 6C).

Discussion

Al is considered to be neurotoxic for the CNS due to its high capacity of crossing the blood-brain barrier and bioaccumulating in the brain (BONDY, 2016; EXLEY, 2013; YOKEL, 2006). Long-term Al exposure has been implicated in the development of neurodegenerative disorders and downregulation of neurogenesis (BONDY, 2010; MCLACHLAN et al., 2019; REICHERT et al., 2019). In this study, we propose a mechanism of Al toxicity involving the purinergic signaling affecting embryonic NPC differentiation, which is essential for brain development.

The accumulation of Al in the CNS from environmental sources reaches a considerable number of nervous cell phenotypes, including NPCs. NPCs play an important role during brain development and maintenance of CNS integrity in adulthood (BOLDRINI et al., 2018). In this way, one crucial question was whether intracellular Al free ion *in vitro* adhere to these primary cultures of NPCs exposed to Al. To clarify this hypothesis, free Al ion accumulation in neurospheres exposed to different concentrations of this metal, in the form of AlCl₃, by lumogallion fluorescence.

Lumogallion is a well-established and sensitive fluorescent molecular probe for the identification of aluminum in both cells and tissues. Lumogallion has been suggested to bind to soluble ionic Al^{3+} (most toxic form of Al) with complex formation establishing a 1:1 stoichiometry, resulting in orange fluorescence (MOLD et al., 2018). Our data demonstrate that Al adheres to the cytoplasm of neurospheres treated with 1, 10, and 50 μ M of Al, in a concentration-dependent manner, as it was possible to observe in the representative images of Figure 2.

Once we had demonstrated Al adsorption by NPCs qualitatively, we evaluated whether the metal could alter extracellular ATP-induced signaling. Previous *in vitro* findings pointed to a role of nucleotides (ATP and UTP) and adenosine in the stimulation of progenitor cell migration, perhaps as central regulators of cell expansion and embryonic neurogenesis (OLIVEIRA; ILLES; ULRICH, 2016; RODRIGUES; MARQUES; CUNHA, 2018; ULRICH; ABBRACCHIO; BURNSTOCK, 2012). These molecules converge in intracellular signaling pathways, which act in synergism to control NPC proliferation and survival (OLIVEIRA; ILLES; ULRICH, 2016). In this way, Al^{3+} at concentrations of 10 and 50 µM diminished extracellular ATP levels by around 33.0%. We suggest that due the high affinity between Al^{3+} and phosphate groups of ATP results in reduction of ATP concentration (Fig 3A). This hypothesis was confirmed when it was added Al^{3+} in ATP standard curve, indicating a reduced bioluminescence on luciferase, which requires ATP in producing light (Fig 3B).

Extracellular ATP is quickly hydrolyzed by ectoenzymes located on the cell surface of NPCs, that can mediate signaling pathways associated with neural development (MISHRA, 2006; RODRIGUES; MARQUES; CUNHA, 2018). Our findings demonstrated that neurospheres exposed to Al³⁺ reduced NTPDase and 5'-nucleotidase activities when compared with control groups (Fig 4). This result may reflect: a) diminished ATP release induced by Al³⁺, which reduces ectoenzymes activities as there are fewer substrate molecules available, and b) the capacity of Al³⁺ to form complexes with ATP, reducing free ATP and altering global ectoenzyme cascades. Similarly, our researcher group has been reported that the enzymes involved in the ATP metabolism in the cortex synaptosomes of rats are inhibited by aluminum ion (SCHETINGER et al., 1995). On the other hand, ectoenzymes expression remained unaltered by Al³⁺ exposure let to suggest that Al³⁺ affects only NTPDase and 5'-nucleotidase activities, reducing the extracellular release of nucleotides (Fig 5).

Purinergic signaling has crucial importance in brain development during cell proliferation, migration, differentiation and apoptosis (OLIVEIRA; ILLES; ULRICH, 2016; ULRICH; ABBRACCHIO; BURNSTOCK, 2012). ATP acts by binding to specific purinoreceptors, and almost every cell expresses these receptor subtypes, including NPCs. The P2Y1 receptor has been associated with an essential role in NPC migration and embryonic brain development via ATP-mediated purinergic signaling (RIBEIRO et al., 2019; SCEMES; DUVAL; MEDA, 2003).

Our results indicate downregulation of P2Y1 receptor protein expression by Al³⁺, suggesting that this metal affects protein expression in NPCs and brain development, indicating a potential regulatory mechanism in the neurogenic microenvironment (Fig 6A). It is known that during brain development, ATP by binding to the P2Y1 receptor on NPCs, regulates proliferation, migration and brain cortex development (BURNSTOCK; ULRICH, 2011; RIBEIRO et al., 2019; RUBINI et al., 2009; WEISSMAN et al., 2004).

Overall, Al³⁺ reduced P2Y1 receptor expression, which may directly affect neurogenesis, possibly via changes in calcium signaling and migration of NPCs, and may constitute a critical regulatory checkpoint for modulating the mobilization and differentiation of NPCs in the embryo and during adulthood. In addition, biologically available Al³⁺ can act in a complex with ATP, which could exert latent toxicity as a result of altered activity of receptors involved in important functions during brain development and neurotransmission (CARDIANO et al., 2018).

Similarly to ATP receptors, adenosine also express specific receptors on cultured neurospheres and plays a role during brain development (LV; SHAO; GAO, 2018; RODRIGUES; MARQUES; CUNHA, 2018). Our results indicate diminished A2A receptor expression in neurospheres treated with Al³⁺ compared with untreated cells (Fig 6C). Recent studies demonstrated that activation of adenosine receptors promotes NPC proliferation (LV; SHAO; GAO, 2018; RIBEIRO et al., 2019). These reports are in line with our findings, suggesting that Al³⁺ could also affect proliferation and differentiation of NPCs via the A2A and possibly further adenosine receptors.

Taken together, our results demonstrate that Al³⁺ promotes negative regulation of P2Y1 and A2A receptor expression and activity downregulation by impaired nucleotide release, which can induce changes in neural phenotype determination of embryonic NPCs, as previously described by Reichert et al. (2019).

Conclusion

In summary, our findings provide, for the first time, some of the possible mechanisms associated with Al^{3+} toxicity on primary cultured neurospheres, especially in relation to purinergic signaling pathway enzymes and receptors. Here, we report that Al^{3+} alters ATP signaling, resulting in diminished ATP levels and hydrolysis by ectoenzymes, as well as purinoreceptors expression. These events might be linked to cellular damage and reduced proliferation and migration, resulting in global inhibition of NPC differentiation and neurogenesis, as previously demonstrated by our research group. Thus, modulation of the purinergic system may be an emerging target of CNS repair in the pathophysiology of neurological diseases, associated with molecular-based on Al^{3+} exposure.

Acknowledgements

This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq—Process No. 306238/2017-9), Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS/PRONEX—Process Number: 16/2551-0000499-4) and Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/—Process Number: 88882.182146/2018-01). HU acknowledges grant support by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (São Paulo Research Foundation FAPESP Project No. 2012/50880-4). MMP is grateful for a post-doctoral fellowship from FAPESP (Project No. 2015/19478-3). Capes PrInt 88881.310287/2018-01.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

Boldrini, M., Fulmore, C.A., Tartt, A.N., Simeon, L.R., Pavlova, I., Poposka, V., Rosoklija, G.B., Stankov, A., Arango, V., Dwork, A.J., Hen, R., Mann, J.J., 2018. Human hippocampal neurogenesis persists throughout aging. Cell Stem Cell. https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.03.015.

Bondy, S.C., 2016. Low levels of aluminum can lead to behavioral and morphological changes associated with Alzheimer's disease and age-related neurodegeneration. Neurotoxicology. https://doi.org/10.1016/j.neuro.2015.12.002.

Bondy, S.C., 2010. The neurotoxicity of environmental aluminum is still an issue. Neurotoxicology. https://doi.org/10.1016/j.neuro.2010.05.009.

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein dye binding. Anal. Biochem. 72, 248e254. https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3.

Burnstock, 2007. Purine and pyrimidine receptors. Cell. Mol. Life Sci. 64, 1471e1483. https://doi.org/10.1007/s00018-007-6497-0.

Burnstock, G., 2007. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. Physiol. Rev. 87, 659e797. https://doi.org/10.1152/physrev.00043.2006.

Burnstock, G., Dale, N., 2015. Purinergic signalling during development and ageing. Purinergic Signal. https://doi.org/10.1007/s11302-015-9452-9.

Burnstock, G., Ulrich, H., 2011. Purinergic signaling in embryonic and stem cell development. Cell. Mol. Life Sci. https://doi.org/10.1007/s00018-010-0614-1.

Cardiano, P., Foti, C., Giacobello, F., Giuffr_e, O., Sammartano, S., 2018. Study of Al³⁺ interaction with AMP, ADP and ATP in aqueous solution. Biophys. Chem. 234, 42e50. https://doi.org/10.1016/j.bpc.2018.01.003.

Chadwick, D.J., Goode, J., 2008. Purinergic signalling in neuron-glia interactions. Purinergic Signalling in Neuron-Glia Interactions. https://doi.org/10.1002/9780470032244.

Ciruela, F., Albergaria, C., Soriano, A., Cuffí, L., Carbonell, L., S_anchez, S., Gandía, J., Fern_andez-Due~nas, V., 2010. Adenosine receptors interacting proteins (ARIPs): behind the biology of adenosine signaling. Biochim. Biophys. Acta Biomembr. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2009.10.016.

Exley, C., 2013. Human exposure to aluminium. Environ. Sci. Process. Impacts 15, 1785e1970. https://doi.org/10.1039/c3em00374d.

Exley, C., 2012a. The coordination chemistry of aluminium in neurodegenerative disease. Coord. Chem. Rev. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.02.020.

Exley, C., 2012b. Elucidating aluminiums exposome. Curr. Inorg. Chem. https://doi.org/10.2174/1877944111202010003.

Exley, C., 1999. A molecular mechanism of aluminium-induced Alzheimer's disease? Journal of Inorganic Biochemistry, pp. 133e140. https://doi.org/10.1016/S0162-0134(99)00125-7.

Exley, C., Mold, M.J., 2019. Aluminium in human brain tissue: how much is too much? J. Biol. Inorg. Chem. https://doi.org/10.1007/s00775-019-01710-0.

Fu, H., Hu, Q., Lin, Z., Ren, T., Song, H., Cai, C., Dong, S., 2003. Aluminum-induced apoptosis in cultured cortical neurons and its effect on SAPK/JNK signal transduction pathway. Brain Res. 980, 11e23.

Gage, F.H., 2000. Mammalian neural stem cells. Science 287 (80), 1433e1438. https://doi.org/10.1126/science.287.5457.1433.

Giusti, G., Galanti, B., 1984. Adenosine deaminase: colorimetric method. Methods Enzym. Anal. https://doi.org/10.1590/S0074-02761998000400014.

Hartmann, L., Bauer, M., Bertram, J., Gube, M., Lenz, K., Reisgen, U., Schettgen, T., Kraus, T., Brand, P., 2014. Assessment of the biological effects of welding fumes emitted from metal inert gas welding processes of aluminium and zinc-plated materials in humans. Int. J. Hyg Environ. Health. https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2013.04.008.

Heymann, D., Reddington, M., Kreutzberg, G.W., 1984. Subcellular localization of 5'nucleotidase in rat brain. J. Neurochem. 43, 971e978. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1984.tb12832.x.

Hutton, S.R., Pevny, L.H., 2008. Isolation, culture, and differentiation of progenitor cells from the central nervous system. Cold Spring Harb. Protoc. 3, 1e5. https://doi.org/10.1101/pdb.prot5077.

Khaira, S.K., Pouton, C.W., Haynes, J.M., 2009. P2X2, P2X4 and P2Y1 receptors elevate intracellular Ca 2b in mouse embryonic stem cell-derived GABAergic neurons. Br. J. Pharmacol. https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00479.x.

Lunkes, G.I., Lunkes, D., Stefanello, F., Morsch, A., Morsch, V.M., Mazzanti, C.M., Schetinger, M.R.C., 2003. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in diabetes and associated pathologies. Thromb. Res. 109, 189e194. https://doi.org/10.1016/S0049-3848(03)00178-6.

Lv, J., Shao, Y.L., Gao, Y., 2018. Activation of A1 and A2a adenosine receptors promotes neural progenitor cell proliferation. Brain Res. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.02.028.

McLaren, F.H., Svendsen, C.N., Van der Meide, P., Joly, E., 2001. Analysis of neural stem cells by flow cytometry: cellular differentiation modifies patterns of MHC expression. J. Neuroimmunol. 112, 35e46. https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2008.08.019.

Mishra, S.K., 2006. Extracellular Nucleotide Signaling in Adult Neural Stem Cells: Synergism with Growth Factor-Mediated Cellular Proliferation. Development. https://doi.org/10.1242/dev.02233.

Mold, M., Eriksson, H., Siesj€o, P., Darabi, A., Shardlow, E., Exley, C., 2014. Unequivocal identification of intracellular aluminium adjuvant in a monocytic THP-1 cell line. Sci. Rep. https://doi.org/10.1038/srep06287.

Mold, M., Kumar, M., Mirza, A., Shardlow, E., Exley, C., 2018. Intracellular tracing of amyloid vaccines through direct fluorescent labelling. Sci. Rep. https://doi.org/ 10.1038/s41598-018-20845-9.

Morciano, G., Sarti, A.C., Marchi, S., Missiroli, S., Falzoni, S., Raffaghello, L., Pistoia, V., Giorgi, C., Di Virgilio, F., Pinton, P., 2017. Use of luciferase probes to measure ATP in living cells and animals. Nat. Protoc. https://doi.org/10.1038/nprot.2017.052.

Oliveira, A., Illes, P., Ulrich, H., 2016. Purinergic receptors in embryonic and adult neurogenesis. Neuropharmacology. https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.10.008.

Pillat, M.M., Cheffer, A., de Andrade, C.M., Morsch, V.M., Schetinger, M.R.C., Ulrich, H., 2015. Bradykinin-induced inhibition of proliferation rate during neurosphere differentiation: consequence or cause of neuronal enrichment? Cytometry 87, 929e935. https://doi.org/10.1002/cyto.a.22705.

Polizzi, S., Ferrara, M., Bugiani, M., Barbero, D., Baccolo, T., 2007. Aluminium and iron air pollution near an iron casting and aluminium foundry in Turin district (Italy). J. Inorg. Biochem. https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2007.06.012.

Rathbone, M.P., Middlemiss, P.J., Gysbers, J.W., Andrew, C., Herman, M.A.R., Reed, J.K., Ciccarelli, R., Di Iorio, P., Caciagli, F., 1999. Trophic effects of purines in neurons and glial cells. Prog. Neurobiol. https://doi.org/10.1016/S0301-0082(99) 00017-9.

Reichert, K.P., Schetinger, M.R.C., Pillat, M.M., Bottari, N.B., Palma, T.V., Gutierres, J.M., Ulrich, H., Andrade, C.M., Exley, C., Morsch, V.M.M., 2019. Aluminum affects neural phenotype determination of embryonic neural progenitor cells. Arch. Toxicol. https://doi.org/10.1007/s00204-019-02522-6.

Ribeiro, D.E., Glaser, T., Oliveira-Giacomelli, Ulrich, H., 2019. Purinergic receptors in neurogenic processes. Brain Res. Bull. https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2018.12.013.

Rodrigues, R.J., Marques, J.M., Cunha, R.A., 2018. Purinergic signalling and brain development. Semin. Cell Dev. Biol. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2018.12.001.

Rubini, P., Milosevic, J., Engelhardt, J., Al-Khrasani, M., Franke, H., Heinrich, A., Sperlagh, B., Schwarz, S.C., Schwarz, J., N€orenberg, W., Illes, P., 2009. Increase of intracellular Ca²⁺ by adenine and uracil nucleotides in human mid brain derived neuronal progenitor cells. Cell Calcium. https://doi.org/10.1016/j.ceca.2009.03.008.

Scemes, E., Duval, N., Meda, P., 2003. Reduced expression of P2Y1 receptors in connexin43null mice alters calcium signaling and migration of neural progenitor cells. J. Neurosci. Schaefer, U., Jahreis, G., 2006. Exposure, bioavailability, distribution and excretion of aluminum and its toxicological relevance to humans. Trace Elem. Electrolytes 23, 162e172.

Schetinger, M.R., Wyse, A.T.S., Da Silva, L.B., Barcellos, C.K., Dias, R.D., Sarkis, J.J.F., 1995. Effects of aluminum chloride on the kinetics of rat cortex synaptosomal ATP diphosphohydrolase 9EC 3.6.1.5). Biol. Trace Elem. Res. https://doi.org/10.1007/BF02785411.

Tietz, T., Lenzner, A., Elena, A., Sebastian, K., Christian, Z., Gürtler, R., Jung, C., Kappenstein, O., Tentschert, J., Giulbudagian, M., Merkel, S., Pirow, R., Lindtner, O., Tralau, T., Sch€afer, B., Laux, P., Greiner, M., Lampen, A., Luch, A., Wittkowski, R., Hensel, A., 2019. Aggregated aluminium exposure : risk assessment for the general population. Arch. Toxicol. 56, 275e281. https://doi.org/10.1007/s00204-019-02599-z.

Ulrich, H., Abbracchio, M.P., Burnstock, G., 2012. Extrinsic purinergic regulation of neural stem/progenitor cells: implications for CNS development and repair. Stem Cell Rev. Reports. https://doi.org/10.1007/s12015-012-9372-9.

Weissman, T.A., Riquelme, P.A., Ivic, L., Flint, A.C., Kriegstein, A.R., 2004. Calcium waves propagate through radial glial cells and modulate proliferation in the developing neocortex. Neuron. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.08.015.

Yokel, R.A., 2012. Aluminum in food e the nature and contribution of food additives. In: Food Additive. https://doi.org/10.5772/30847.

Yokel, R.A., 2006. Blood-brain barrier flux of aluminum, manganese, iron and other metals suspected to contribute to metal-induced neurodegeneration. J. Alzheim. Dis. https://doi.org/10.3233/JAD-2006-102-309.

Zimmermann, H., 2011. Purinergic signaling in neural development. Semin. Cell Dev. Biol. 22, 194e204. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2011.02.007.

Zimmermann, H., 2008. Ectonucleotidases in the nervous system. In: Purinergic Signalling in Neuron-Glia Interactions. https://doi.org/10.1002/9780470032244.ch10.

Zimmermann, H., 2001. Ectonucleotidases: some recent developments and a note on nomenclature. In: Drug Development Research. https://doi.org/10.1002/ddr.1097.

Graphical Abstract:



Figure 1. Experimental Design. NPCs obtained from embryonic day 13 telencephalons of embryonic mice were mechanically dissociated and plating with 2×105 cells / mL in DMEM/Ham's F-12 culture medium supplemented with 2% B-27, 20 ng/mL epidermal growth factor (EGF) and fibroblast growth factor (FGF)-2, 100 units/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin. Cells were cultured for 5 days to form neurospheres. After, the EGF and FGF-2 were removed to induced neurospheres differentiation for 7 days, in the presence or absence of Al³⁺ (1 – 50 µM). The biochemistry assays were performed on differentiated neurospheres.



Figure 2. Representative fluorescence microscopy of whole differentiated neurospheres treated with Al^{3+} at concentrations from 0 to 50 µM for Lumogallion staining (orange) and DAPI-staining (blue). A) Control neurospheres, B) Neurospheres treated with 1 µM, C) 10 µM and D) 50 µM of Al^{3+} . Magnification X 10, scale bars: 20 µm. n=3.





Figure 3. Al³⁺ reduced extracellular ATP levels in differentiated neurospheres treated with Al³⁺ at concentrations 0 to 50 μ M. A) ATP levels were expressed as percentage to the control group, and B) ATP standard curve using ATP bioluminescence by recombinant luciferase (RLU) in the presence or absence of Al³⁺, using Molecular Probes® ATP Determination Kit. Values are expressed as mean + S.E.M. (*p < 0.05; n = 3). ANOVA followed by Tukey's post hoc test.



Figure 4. Effects of Al^{3+} on nucleotide hydrolysis of differentiated neurospheres treated whit Al^{3+} at concentrations from 0 to 50 μ M. A) NTPDase activity using ATP as substrate, and B) ADP as substrate C) 5'-Nucleotidase activity using AMP as substrate, and D) Adenosine deamination by e-ADA activity. Values are expressed as mean + S.E.M. (*p < 0.05; n = 3). ANOVA followed by Tukey's post hoc test.



Figure 5. Effects of Al³⁺ on ectoenzymes expression in differentiated neurospheres at concentrations from 0 to 50 μ M. A, B, C, D) Representative flow cytometry histograms of NTPDase1, NTPDase2, 5'-Nucleotidase and ADA expression, respectively. E). Quantification of percentages of cells expressing NTPDase1, NTPDase2, 5'-Nucleotidase and ADA, respectively. Values are expressed as mean + S.E.M. (*p < 0.05; n = 3 by ANOVA followed by Tukey's post hoc test).



Figure 6. Effects of Al³⁺ on purinoreceptors expression in differentiated neurospheres at concentrations from 0 to 50 μ M. A, B, C) Representative flow cytometry histogram of P2Y1, A1, A2A receptors expression, respectively. E, F, G). Quantification of percentages of cells expressing P2Y1, A1, A2A receptors expression, respectively. Values are expressed as mean + S.E.M. (*p < 0.05; n = 3 by ANOVA followed by Tukey's post hoc test).

Manuscrito 2: Em fase de submissão

Aluminum impairs short and long-term memory and alters purinergic signaling

in hippocampus of mice

Dados sobre o periódico: Toxicology ISSN: 0300-483X Fator de Impacto: 3.54 Qualis Capes: A2 Endereço eletrônico:_https://www.journals.elsevier.com/toxicology



Aluminum impairs short and long-term memory and alters purinergic signaling in hippocampus of mice

Karine P. Reichert^a, Nathieli B. Bottari^a, Maria Rosa C. Schetinger^a, Anielen Dutra^a, Charles E. Assmann^a, Pauline da Costa^a, Thauan Faccin Lopes^a, Graciela Heidrich, Valderi Dressler^a, Vera M. Morsch^{a*}

^aGraduate Program in Biological Sciences: Toxicological Biochemistry, CCNE, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil.

*Corresponding authors:

Vera Maria Melchiors Morsch

E-mail address: veramorsch@gmail.com (V.M.M.Morsch)

Laboratory of Toxicological Enzimology, Departament of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil.

Karine Paula Reichert

E-mail address: kakareichert@yahoo.com.br (K.P.Reichert)

Laboratory of Toxicological Enzimology, Departament of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil. Tel./fax: + 55-55 3220 6139

Aluminum (Al) is considered a neurotoxic agent for biological systems and is recognized as a risk factor to neurodegenerative diseases when accessing the brain. Al exposure occurs through the environment, water and human diet. The Al cationic form (Al^{3+}) has been associated with major deleterious effects on the central nervous system. Thus, the aim of this study was to investigate a possible mechanism, which links Al and neurodegeneration in vivo. Here, we evaluated memory tests, purinergic signaling and inflammatory markers during long-term oral exposure to Al of mice in the total hippocampus. For this study, swiss mice were divided into three groups: control (CT) group, AlCl₃ 50 mg/kg group and AlCl₃ 100 mg/kg group. The animals were orally treated with saline or Al^{3+} at $AlCl_3$ form during 30 days. The memory parameters, body and brain weight, Al levels, DNA damage, enzymes activities, P2X7, A1 and A2A receptors density and IL-1 β and IL-10 cytokines density were assessment on the hippocampus of mice intoxicated with Al³⁺. Our results reveal that Al³⁺ was able to reduce brain weight and accumulate on hippocampus of animals treated with 100 mg/kg of salt. In addition, Al³⁺ caused memory deficits and DNA damage. The ATP hydrolysis also was affected by Al³⁺, our results point to an increase in NTPDase, 5'-nucleotidase and ADA activities. In addition, Al³⁺ increased P2X7 and A2A receptors density, as IL-1 β proinflammatory cytokine. Taken the results together, we suggested that Al³⁺ was able to causes memory loss by DNA damage and alterations on the purinergic system by the proinflammatory process.

Keywords: Aluminum, memory, P2X7 receptor, A2A receptor, cytokines.
1. Introduction

Aluminum (Al) is one of the most abundant elements in Earth's crust, and did not has a biological function defined (YOKEL, 2012). Compounds containing Al are ubiquitous on environment and have been used in the manufacturing industry for centuries, including consumer goods, kitchen utensils, food additives, water treatment, medicaments and cosmetics (EXLEY, 2013; SCHAEFER; JAHREIS, 2006a). The mainly body metal absorption occur by oral ingestion and can be excreted and/or bioaccumulate in various organs, including the central nervous system (CNS) (BONDY; CAMPBELL, 2017).

Al³⁺, bioavailable and most toxic form of Al, may cross to the blood-brain barrier, resulting in risk factor to neurodegeneration, once this metal is considered a neurotoxin (BONDY, 2010). Several studies pos-mortem in Alzheimer's disease (AD) patients shown the high content of Al³⁺ in brain, triggers characteristic lesions as senile plaques and neurofibrillary tangles (RUSINA et al., 2011; YOKEL, 2006). In addition, others neurodegenerative diseases such as Parkinson's disease (PD), dialysed encephalopathy (DE) and amyotrophic lateral sclerosis are also closely associated with chronic accumulation of Al³⁺ (CAMPBELL, 2004; JIANG, 2017; 2006).

The hippocampus is considered Al-accumulation vulnerable region Al exposure and could induce cognitive impairments, affecting the memory and learning in animal model, similarly to early symptoms related with AD patients (BONDY, 2016; CAO et al., 2016; FATTORETTI et al., 2003). However, the mechanisms by Al-induced memory deficits and neurodegeneration remain unclear. In this way, we propose investigate pathways can be involved of this process.

One important step to the memory consolidation is the neurotransmission. It has been reported that ATP is considered a fast excitatory neurotransmitter, being co-released with others neurotransmitters, as acetylcholine(ZIMMERMANN, 2008a). Extracellular ATP is involved in

several pathophysiological events, including neurotransmission and neuromodulation (GORDON, 1986). The specific role of ATP on biological systems depends to the binding with specific receptors and plays different crucial functions in the CNS (BURNSTOCK, 2007b; WOODS et al., 2016).

The levels of nucleotide are controlled by cell surface enzymes, known as ectonucleotidases (ZIMMERMANN, 2001). The enzymes involved in this signaling cascade include the ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase), which hydrolyzes ATP to ADP and/or AMP, followed by 5'-nucleotidase (5'-NT), which hydrolyzes AMP to adenosine, and finally, this molecule is deaminated to inosine by adenosine deaminase (E-ADA) (ZIMMERMANN, 2001; 2008b).

Signaling through P2 and P1 receptors are finished by hydrolysis of ATP by ectonucleotidases (ZIMMERMANN, 2008b). The role of ATP acting via P2X₇ receptor emerge the inflammatory condition, by pro-inflammatory cytokines release, as IL-1 β and has been associated to cause damage and/or apoptosis induction to cells (SAVIO et al., 2018).

Additionally, ATP nucleoside derivate, adenosine, is a signaling molecule involved in neuroprotection and neuromodulation of CNS (SACHDEVA; GUPTA, 2013). These effects were observed by the A1 receptor binding, once is the predominant subtype in cerebral areas (FREDHOLM et al., 2005). However, in brain impairments conditions, studies leads point the increased regulation of A2A receptors, being responsible for the cognitive decline in memory performance (DUARTE et al., 2006).

In this way, we evaluated the possible effects of long-term exposure of Al on animal model in memory parameters and purinergic signaling of animals treated with AlCl₃. This study contributes to plot a mechanism, insufficiently investigated on the effects of Al³⁺ on the CNS.

2. Material and Methods

2.1. Animals

For this study, thirty Swiss male mice with a mean age of 60 days weighing 25 ± 5 g were kept in boxes (30 x 20 x 13cm) containing five animals each, under a 12h light/dark cycle with controlled temperature and humidity (25°C, 70%, respectively). The animals went through an adaptation period of 10 days and were fed with commercial feed and water *ad libitum*. All animal procedures were approved by the Institutional of Animal Care and Use from the UFSM (protocol number: 2712020517/2017).

2.2. Aluminum treatment

Aluminum in the chloride form (AlCl₃; molecular weight 133.34 g/mol; purity >99%) was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), and it was diluted in ultrapure water to a final dose of 50 and 100 mg/kg of AlCl₃, which is equivalent to 10 and 20 mg/kg of Al³⁺, respectively. Note that when referred to effects of Al, we used Al³⁺ form, since it is the metal of interest and not the salt as a whole. Al³⁺ was chronically administered via oral for 30 consecutive days followed by 2 days of no treatment each week. The dose used was selected following the literature (KASBE; JANGRA; LAHKAR, 2015). In addition, the daily intake of Al³⁺ corresponds to 2 - 40 mg / kg / day, when considered an adult (60 kg), these values are equivalent to 3.4 - 68 mg / kg / day of Al³⁺ in mice (REAGAN-SHAW; NIHAL; AHMAD, 2008).

2.3. Experimental design

Mice were randomly divided into three experimental groups: control (CT), AlCl₃ 50 mg/kg, and AlCl₃ 100 mg/kg. Aluminum or vehicle (0.9% NaCl) was administered via gavage between 11 and 12 a.m. once a day, at a volume not exceeding 10 mL/kg. After the treatment,

the animals were anesthetized under isoflurane atmosphere before cardiac puncture and euthanized. The brain was removed and the hippocampus was isolated to consecutive analyses.

2.4. Behavioral tests

On days 27–30, the animals performed the behavioral tests as shown in Fig. 1: day 27 - habituation to object recognition test (ORT) arena; day 28 - training of test, day 29 - mice performed training and after that they were subjected to short-term memory test (STM), long-term memory test (LTM), and Y-maze test and day 30 the animals were euthanized.

2.4.1. Open field

The open field was used to identify motor disabilities, which might influence the object recognition performance. During the habituation of novel object recognition task, the animals were transferred to a 45 x 45-cm open field, with the floor divided into nine squares. During the 5-min open field session, the number of crossing responses was recorded, speed and average speed by ANY-maze 6.1 software.

2.4.2. Object recognition task

The object recognition test was performed according to Dao et. al (2013) with some modifications. After habituation by open field test, two objects were added in the box. Chambers and objects were cleaned with 30% ethanol immediately before and at the end of each behavioral evaluation. Subsequently, the training and testing sessions were evaluated for 5 minutes. In the training session, the animals were exposed to two of the same objects (object A), and the exploration time was recorded with two stopwatches. The test session was carried out 4hs (short-term memory – STM) and 24hs (long-term memory – LTM) after training. In the test session, mice were placed back in the behavioral chamber and one of the familiar objects

(object A) was replaced by a novel object (object B/C). The time spent in exploring the familiar and the novel object was recorded. The percentage of the total exploration time that the animal spent in investigating the novel object was the measure of recognition memory. Recognition memory for both tests (STM and LTM) was evaluated by recognition index (%): Time in the novel object / (Time in familiar object + Time in the novel object) x 100 (DAO et al., 2013).

2.4.3. Y- maze test

The Y- maze is a well-recognized memory test, whith three-arm maze of equal angles (120°) between all arms, which were 30 cm long and 5 cm wide with 12 cm high walls. Mice were initially placed within at the center of Y-maze, and after 2 min of habituation, the sequence and number of arm entries were recorded for each mouse over a 6-min period by ANY-maze 6.1 software. The percentage of trials in which the mice entered all three arms (ABC, CAB, or BCA) was recorded as an alternation to estimate short-term memory. The alternation score (%) for each mouse was defined by the equation: % Alternation = [(Number of alternations)/(Total arm entries-2)]×100. The number of arm entries per trial was used as an indicator of locomotor activity (GÖTZ, J.; ITTNER, 2008).

2.5. Brain tissue preparation

Adult mice were anesthetized with isoflurane inside an anesthetic chamber. The total hippocampus homogenate was weighed and allocated into test tubes. The hemisphere was homogenized 1:10 in Tris–HCl 10 mM, pH 7.2 buffer to verify enzymatic activities. All procedures described above were performed under refrigeration temperature (4 °C).

2.6. Al³⁺ concentration on hippocampus and serum

The total concentration of total Al^{3+} on serum and hippocampus of swiss male mice were measured according to the method previously described (MORAES FLORES, DE et al., 2001). Briefly, 100 µL of serum and 2 mL of HNO₃ (14 mol/L) were mixed in a 15 mL polypropylene tube. The mixture was heated in a water bath (70 °C) during 10 min. After sample mineralization deionized (18.2 M Ω cm) water was added to the tube on a final volume of 10 mL right before reading by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP OES). Al³⁺ emission line selected was at 213,856 µm and the results were expressed in µg/L.

2.7. DNA comet assay

The alkaline comet assay was performed as described by Singh et al. (1988) in accordance with the general guidelines for use of the comet assay. One hundred cells (50 cells from each of the two replicate slides) were selected and analyzed. Cells were visually scored according to tail length and received scores from 0 (no migration) to 4 (maximal migration) (SINGH et al., 1988). Therefore, the damage index for cells ranged from 0 (all cells with no migration) to 400 (all cells with maximal migration). Slides were analyzed under blind conditions by at least two individuals.

2.8. Enzymatic assays

The E-NTPDase and 5'-NT enzymatic activities of the hippocampus were determined by the methods of Schetinger et al. (2000) and Heymann et al. (1984), respectively. The enzymatic preparation (20 μ L; 8–12 μ g of protein) was added to the reaction mixture and preincubated at 37°C for 10 min. The reaction was initiated by the addition of substrate (ATP, ADP, or AMP). Enzyme activities were reported as nmol Pi released/min/mg protein (HEYMANN; REDDINGTON; KREUTZBERG, 1984b; SCHETINGER et al., 2000). ADA activity of hippocampus was determined according to Guisti and Galanti (1984). Samples of the total hippocampus (50 uL) were incubated with 21 mM/L of adenosine pH 6.5 and incubated at 37°C for 60 min. The results were expressed as U/mg protein.

2.9. Western blot

Samples hippocampus homogenized of the total ice-cold were in radioimmunoprecipitation assay buffer (RIPA buffer) with 1mM protease and phosphatase inhibitors and centrifuged at 12,000 rpm at 4°C for 10 min. The protein concentration was determined using the BCA Protein Assay Kit (Sigma-Aldrich, EUA). The diluted samples were separated by sodium dodecyl sulfate (SDS) polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to nitrocellulose membranes (Amersham Biosciences, UK). After blocking, the membranes samples were incubated overnight at 4°C with the primary antibodies: P2X₇ (dilution 1:500, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), A1 (dilution 1:500, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), A_{2A} (1:800, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), IL-1β (dilution 1:1000, Cell Signaling, MA, USA) and IL-10 (dilution 1:1000, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) membranes were incubated with anti-rabbit or anti-mouse secondary antibodies (dilution 1:10.000, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) for 90 min at room temperature. The membranes were incubated with an enhanced chemifluorescent substrate (Amersham Biosciences) and analyzed with an Amersham Imager 600 (GE Healthcare Life Sciences, EUA). The membranes were reprobed and tested for β -actin immunoreactivity as a control for protein concentration (REBOLA et al., 2005).

2.10. Protein determination

Protein levels were measured by Coomassie blue method as previously described by Bradford using bovine albumin serum as standard (BRADFORD, 1976).

2.11. Statistical analysis

Results were expressed as mean values + standard error of the mean (SEM). Statistical analysis was assessed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey's post-hoc test using the GraphPad Prism (Version 5.0) software. Differences between mean values were considered statistically significant at *p < 0.05.

3. Results

3.1. Effects of Al³⁺ on brain and body weight

To verify the effects of Al^{3+} on mice, we measured body and brain weight at the onset and the end of experiment. The results present in Fig 2A, for the body weight, were not different among the groups (p < 0.05). For the brain weight (Fig 2B), we observed a reduced in turn of 0.230 g on brain of mice treated with AlCl₃ at 50 and 100 mg/kg when compared to control group (p < 0.05).

3.2. Al³⁺ levels on serum and hippocampus

One crucial question on the experimental model of Al exposure, used in this study, is whether the ion was able to across the gastrointestinal tract and access the brain. Thus, the serum and hippocampal Al^{3+} levels were quantified. As can be observed in Figure 3, that the Al^{3+} concentration in the serum, of nimals treated with 50 and 100 mg/kg increased to values of 0.98 µg/g and 0.56 µg/g, respectively, when compared to control group. In addition, the animals treated with 100 mg/kg increased the hippocampal Al^{3+} levels (0.27 µg/g) when compared to the control group (p < 0.05).

3.3. Al³⁺ induced memory impairment in mice

Before analyses of memory tests, it was necessary to evaluate the locomotor activity of mice to verify if the treatment did not affect this parameter. Fig 4 demonstrates that AlCl₃ unaltered numbers of crossing, speed and average speed after the treatment when compared to the control group. In memory tests, Fig 5 shows that AlCl₃ only at 100 mg/kg induced impairments on short and long-term memory by a novel object recognition test. In addition, AlCl₃ was able to cause short-term memory loss in the Y-maze test as observed in Fig 6 (p < 0.05).

3.4. Al³⁺ causes genotoxicity

Genotoxicity of Al^{3+} during chronic metal exposure was measured by DNA damage using the Comet Assay. Figure 7A shows that Al^{3+} elongated the DNA tail. In this analyze the cells with DNA damaged had the appearance of a comet, while undamaged cells had an intact nucleus without a tail. Different damages class was quantified in Figure 7B. As can be observed the group treated with 100 mg/kg of AlCl₃ reduced DNA cells undamaged and increased the class of damage until the apoptosis stage (maximally damaged) (p < 0.05).

3.5. Al³⁺ alters NTPDase, 5'-NT and ADA enzymes activities in the hippocampus of mice

The results obtained for E-NTPDase, E-5'-NT, and ADA activities are shown in Figure 8. ATP (Fig. 8A) hydrolysis by NTPDase and AMP (Fig. 8C) hydrolysis by 5'-NT was significantly increased (35% and 22.3 %, respectively) in the group treated only at AlCl₃ 100 mg/kg compared with the control group. For ADP hydrolysis were no observed differences among the groups (p < 0.05). Following the ectonucleotidase cascade, AlCl₃ only at 100 mg/kg concentration was able to increase the ADA activity (55.8%) when compared to the control group (Fig. 8D).

3.6. Al^{3+} modulates the purinoreceptors density on hippocampus of mice

Considering the alterations observed in the ATP metabolism, we evaluate the purinoreceptors density in hippocampus of mice. Western blot analysis of P2X7, A1 and A2A receptors is shown in Figure 9. AlCl₃ only at 100 mg/kg augmented the P2X7 receptor density (Fig 9A) compared to control group (p < 0.05). In relation to adenosine receptors, the A1 receptor density had no significant differences among the groups (Fig 9B). However, animals exposed to 100 mg / kg of AlCl₃ increased the A2A receptor density (Fig 9C) when compared to control group (p < 0.05).

3.7. Al^{3+} affects the cytokines density on hippocampus of mice

Proinflammatory cytokines release play a crucial response by P2X7 receptor. In view of that, we evaluated pro and anti-inflamatory markers, to identify the possible neuroinflammation induced by $A1^{3+}$. The western blot cytokines density was presented in Figure 10, indicating an augmented on IL-1 β , proinflammatory cytokine, in animals treated with 100 mg /kg of AlCl₃ when compared to the control group. On the other hand, anti-inflammatory IL-10 also was determined and it is decreased on $A1^{3+}$ exposure animals when compared to the control group (p < 0.05).

4. Discussion

Al is a non-essential metal prevalent in the environment and, daily exposure for Al by biological systems is uncontrollable (EXLEY, 2013). Epidemiological studies about the Al clinical neurotoxicity point that chronic exposure to metal ion can induce cognitive deficits similar to occur in dementia condition (CAO et al., 2016; NAMPOOTHIRI et al., 2017; SWEGERT; DAVE; KATYARE, 1999; ZHANG et al., 2014). The brain is the most vulnerable

organ to Al accumulation and toxicity (BONDY, 2016). Thus, we evaluate mechanisms linked to Al toxicity and memory parameters by the animal model of chronic exposure to the metal.

The Al³⁺ form, can be easily accessed to SNC by crossing the blood-brain barrier (BBB), and it is deposited into brain regions (YOKEL, 2006). The hippocampus is an important structure responsible for memory formation and consolidation, as well as neurogenesis and neural plasticity and represents one target of Al³⁺ accumulation (BONDY; CAMPBELL, 2017). Our results shown that AlCl₃ at 100 mg/kg concentration was able to decrease de brain weight of mice, which is a typically reduced in DA, result of cerebral atrophy.

In addition, an increase the Al³⁺ concentration in the serum and hippocampus was observed. The concentration of Al³⁺ in adult brain considered as pathologically significant is \geq 3.00 µg/g dry wt (EXLEY; MOLD, 2019). In our study, we found a hippocampal Al³⁺ concentration of 0.274 µg / g, followed by chronic administration during 30 days. In fact, the presence of aluminum in brain tissue is an intoxication and inevitably exert toxicity at a local level. Similar studies by our researcher group have demonstrated that Al³⁺ exerts toxicity in neural progenitor cells as well as synaptossomes obtained from rats (KAIZER et al., 2007, REICHERT et al. 2019).

Several studies have been demonstrated a possible relation with Al accumulation in brain and development of neurodegenerative disorders (BONDY; CAMPBELL, 2017). Once showed quantitatively that our model of Al exposure by oral administration was sufficient to reach the CNS, we evaluate short and long-memory tests. Our findings showed that mice treated with 100 mg/kg of AlCl₃ do not alters locomotor activity and diminished the short and longterm memory, as observed by novel object recognition and Y-maze tests. We suggest that Al toxicity can induces to irreversible cognitive deficits, possibly by changes in the hippocampal functions, as demonstrated by CAO, 2016 and colleagues (CAO et al., 2016). In addition, Comet Assay indicates that AlCl₃ treatment at 100 mg/kg caused DNA damage in blood cells detected in our experimental approaches. We suggest that genotoxicity conferred by Al³⁺ can causes mutations and apoptosis contributing to cellular dysfunction, once blood cells represent a periphery marker of damage. Moreover, Al³⁺ can interact with the plasma membrane, affecting the structure and function of DNA and important proteins (BORNEMANN; HERZOG; WINTER, 2019).

One important class of cell-surface proteins the ectonucleotidases are (ZIMMERMANN, 2008b). We evaluate the NTPDase, 5'-NT and ADA on total hippocampus. Our data shown an augmented activity of these enzymes in mice treated with 100 mg/kg of AlCl₃. We suggest that, in this condition, ATP acts as a proinflammatory agent, with elevated hydrolysis of nucleotide in response to possible high levels of ATP. In concordance with data, CRUZ et al., (2007) showed similar results, associated the toxicity of Al³⁺ with support a neuroinflammation process (CRUZ et al., 2007). In addition, these results are according to Kaizer et. al (2007), indicating an increased on ectonucleotidases activities in synaptossomal fraction obtained from cerebral cortex and hippocampus of rats (KAIZER et al., 2007). In contrast, Schetinger et. al (1995) demonstrated that the metal ion significantly inhibited ATPase and ADPase activities in vitro of rat cortex synaptossomes and, more recently, Reichert et. al (2019) shows a reduced NTPDase in vitro in neural progenitor cells. This fact may occur due to the different time and manner of exposure to Al.

High levels of ATP are sufficient to activate specific receptors, as P2X7 (SKAPER; DEBETTO; GIUSTI, 2010). Here, we demonstrate that AlCl₃ at 100 mg/kg was able to increase this receptor expression, possibly characterizing the inflammation induced by Al³⁺. Followed the results observed from P2X7 receptor, we analyzed the pro and anti-inflammatory cytokines. Our results indicate that AlCl₃ at 100 mg/kg was able to elevate IL-1 β proinflammatory cytokine. In addition, was observed that AlCl₃ at the same concentration reduced IL-10, anti-

inflammatory cytokine. Taken together, this data configure the neuroinflammatory process according to Cao et al. (2016), which can directly affect neuronal survival, inducing cognitive deficits, as observed in this study (CAO et al., 2016).

In addition, adenosine is a molecule related to neuromodulatory effects by binding to specific receptors (FREDHOLM et al., 2005). The increased on adenosine deaminase activity can be represent reduced levels of adenosine on the hippocampus. Thus, we evaluated the adenosine receptors A1 and A2A densities for clarifying the effects of this molecule on the CNS. Our data had no show significant differences on A1 receptor density among the groups. However, we observed an increase in A2A receptor on animals treated with 100 mg/kg of AlCl₃. We can suggest that adenosine acts binding to A2A receptor can explain results observed on behavior tests, since this receptor is associated with cognitive decline and enhancing neurotoxicity (CUNHA, 2005; FRANCO; NAVARRO, 2018; STOCKWELL; JAKOVA; CAYABYAB, 2017).

In summary, our study point to the importance of purinergic system during Al long-term exposure. ATP and adenosine signalling represent two important molecules susceptible to metal ion metabolism, contributing to memory impairments by neuroinflammation process, via P2X7 and A2A receptors. Moreover, this study contributes to elucidating possible mechanisms of aluminum on CNS inducing neurodegeneration associated to the environment factors.

5. Conclusion

In conclusion, this study reveals some mechanisms involved with neurotoxic effects of Al³⁺ induced cognitive impairments after long-term exposure of Al in Swiss mice. We also showed that Al³⁺ alters the purinergic cascade in the hippocampus of mice, stimulating the proinflammatory process. Thus, the explanation of the role played purinergic signaling against

external stimuli could be a powerful tool for the development of new strategies of neuroprotection.

Acknowledgements

This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq—Process No. 306238/2017-9), Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS/PRONEX—Process Number: 16/2551-0000499-4) and Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/—Process Number: 88882.182146/2018-01). Capes PrInt 88881.310287/2018-01.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

Bondy, S.C., 2016. Low levels of aluminum can lead to behavioral and morphological changes associated with Alzheimer's disease and age-related neurodegeneration. Neurotoxicology. https://doi.org/10.1016/j.neuro.2015.12.002

Bondy, S.C., 2010. The neurotoxicity of environmental aluminum is still an issue. Neurotoxicology. https://doi.org/10.1016/j.neuro.2010.05.009

Bondy, S.C., Campbell, A., 2017. Aluminum and Neurodegenerative Diseases. https://doi.org/10.1016/bs.ant.2017.07.008

Bornemann, S., Herzog, M., Winter, R., 2019. Impact of Y 3+ -ions on the structure and phase behavior of phospholipid model membranes. Phys. Chem. Chem. Phys. 21, 5730–5743. https://doi.org/10.1039/c8cp07413e

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein dye binding. Anal. Biochem. 72, 248–254. https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3

Burnstock, G., 2007. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. Physiol. Rev. 87, 659–797. https://doi.org/10.1152/physrev.00043.2006

Campbell, A., 2004. Inflammation, neurodegenerative diseases, and environmental exposures,

in: Annals of the New York Academy of Sciences. https://doi.org/10.1196/annals.1332.008

Cao, Z., Yang, X., Zhang, H., Wang, H., Huang, W., Xu, F., Zhuang, C., Wang, X., Li, Y., 2016. Aluminum chloride induces neuroinflammation, loss of neuronal dendritic spine and cognition impairment in developing rat. Chemosphere. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.02.092

Cruz, C.M., Rinna, A., Forman, H.J., Ventura, A.L.M., Persechini, P.M., Ojcius, D.M., 2007. ATP activates a reactive oxygen species-dependent oxidative stress response and secretion of proinflammatory cytokines in macrophages. J. Biol. Chem. https://doi.org/10.1074/jbc.M608083200

Cunha, R.A., 2005. Neuroprotection by adenosine in the brain: From A1 receptor activation to A2A receptor blockade. Purinergic Signal. https://doi.org/10.1007/s11302-005-0649-1

Dao, A.T., Zagaar, M.A., Levine, A.T., Salim, S., Eriksen, J.L., Alkadhi, K.A., 2013. Treadmill Exercise Prevents Learning and Memory Impairment in Alzheimer's Disease-Like Pathology. Curr. Alzheimer Res. https://doi.org/10.2174/1567205011310050006

De Moraes Flores, E.M., Saidelles, A.P.F., Barin, J.S., Mortari, S.R., Martins, A.F., 2001. Hair sample decomposition using polypropylene vials for determination of arsenic by hydride generation atomic absorption spectrometry. J. Anal. At. Spectrom. https://doi.org/10.1039/b107910g

Duarte, J.M.N., Oliveira, C.R., Ambrósio, A.F., Cunha, R.A., 2006. Modification of adenosine A1 and A2A receptor density in the hippocampus of streptozotocin-induced diabetic rats. Neurochem. Int. 48, 144–150. https://doi.org/10.1016/j.neuint.2005.08.008

Exley, C., 2013. Human exposure to aluminium. Environ. Sci. Process. Impacts 15, 1785–1970. https://doi.org/10.1039/c3em00374d

Fattoretti, P., Bertoni-Freddari, C., Balietti, M., Mocchegiani, E., Scancar, J., Zambenedetti, P., Zatta, P., 2003. The effect of chronic aluminum(III) administration on the nervous system of aged rats: clues to understand its suggested role in Alzheimer's disease. J. Alzheimers. Dis. 5, 437–44.

Franco, R., Navarro, G., 2018. Adenosine A2A receptor antagonists in neurodegenerative diseases: Huge potential and huge challenges. Front. Psychiatry. https://doi.org/10.3389/fpsyt.2018.00068

Fredholm, B.B., Chen, J.F., Cunha, R.A., Svenningsson, P., Vaugeois, J.M., 2005. Adenosine and Brain Function. Int. Rev. Neurobiol. https://doi.org/10.1016/S0074-7742(05)63007-3

Gordon, J.L., 1986. Extracellular ATP: effects, sources and fate. Biochem. J. 233, 309–319.

Götz, J., Ittner, L.M., 2008. Animal models of Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. Nat. Rev. Neurosci. https://doi.org/10.1038/nrn2420

Heymann, D., Reddington, M., Kreutzberg, G.W., 1984. Subcellular Localization of 5' Nucleotidase in Rat Brain. J. Neurochem. 43, 971–978. https://doi.org/10.1111/j.1471-

4159.1984.tb12832.x

Jiang, H., 2017. Metal Transporters in Neurodegeneration, in: Biometals in Neurodegenerative Diseases: Mechanisms and Therapeutics. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804562-6.00016-6

Kaizer, R.R., Maldonado, P.A., Spanevello, R.M., Corrêa, M.C., Gonçalves, J.F., Becker, L.V., Morsch, V.M., Schetinger, M.R.C., 2007. The effect of aluminium on NTPDase and 5'-nucleotidase activities from rat synaptosomes and platelets. Int. J. Dev. Neurosci. https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2007.06.002

Kasbe, P., Jangra, A., Lahkar, M., 2015. Mangiferin ameliorates aluminium chloride-induced cognitive dysfunction via alleviation of hippocampal oxido-nitrosative stress, proinflammatory cytokines and acetylcholinesterase level. J. Trace Elem. Med. Biol. https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2015.04.002

Nampoothiri, M., Kumar, N., Ramalingayya, G.V., Kutty, N.G., Krishnadas, N., Rao, C.M., 2017. Effect of insulin on spatial memory in aluminum chloride-induced dementia in rats. Neuroreport. https://doi.org/10.1097/WNR.000000000000799

Rebola, N., Rodrigues, R.J., Lopes, L. V., Richardson, P.J., Oliveira, C.R., Cunha, R.A., 2005. Adenosine A1 and A2A receptors are co-expressed in pyramidal neurons and co-localized in glutamatergic nerve terminals of the rat hippocampus. Neuroscience 133, 79–83. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.01.054

Rusina, R., Matěj, R., Kašparová, L., Kukal, J., Urban, P., 2011. Higher aluminum concentration in Alzheimer's disease after box-cox data transformation. Neurotox. Res. https://doi.org/10.1007/s12640-011-9246-y

Sachdeva, S., Gupta, M., 2013. Adenosine and its receptors as therapeutic targets: An overview. Saudi Pharm. J. https://doi.org/10.1016/j.jsps.2012.05.011

Savio, L.E.B., Mello, P. de A., da Silva, C.G., Coutinho-Silva, R., 2018. The P2X7 receptor in inflammatory diseases: Angel or demon? Front. Pharmacol. https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00052

Schaefer, U., Jahreis, G., 2006. Exposure, bioavailability, distribution and excretion of aluminum and its toxicological relevance to humans. Trace Elem. Electrolytes 23, 162–172. Schetinger, M.R.C., Porto, N.M., Moretto, M.B., Morsch, V.M., Da Rocha, J.B.T., Vieira, V., Moro, F., Neis, R.T., Bittencourt, S., Bonacorso, H.G., Zanatta, N., 2000. New benzodiazepines alter acetylcholinesterase and ATPDase activities. Neurochem. Res. 25, 949–955. https://doi.org/10.1023/A:1007500424392

Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Exp. Cell Res. https://doi.org/10.1016/0014-4827(88)90265-0

Skaper, S.D., Debetto, P., Giusti, P., 2010. The P2X 7 purinergic receptor: from physiology to neurological disorders . FASEB J. https://doi.org/10.1096/fj.09-138883 Stockwell, J., Jakova, E., Cayabyab, F.S., 2017. Adenosine A1 and A2A receptors in the brain:

Current research and their role in neurodegeneration. Molecules. https://doi.org/10.3390/molecules22040676

Swegert, C. V., Dave, K.R., Katyare, S.S., 1999. Effect of aluminium-induced Alzheimer like condition on oxidative energy metabolism in rat liver, brain and heart mitochondria. Mech. Ageing Dev. https://doi.org/10.1016/S0047-6374(99)00051-2

Woods, L.T., Ajit, D., Camden, J.M., Erb, L., Weisman, G.A., 2016. Purinergic receptors as potential therapeutic targets in Alzheimer's disease. Neuropharmacology. https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.10.031

Yokel, R.A., 2012. Aluminum, in: Encyclopedia of Human Nutrition. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-375083-9.00008-8

Yokel, R.A., 2006. Blood-brain barrier flux of aluminum, manganese, iron and other metals suspected to contribute to metal-induced neurodegeneration. J. Alzheimer's Dis. https://doi.org/10.3233/JAD-2006-102-309

Zhang, L., Jin, C., Lu, X., Yang, J., Wu, S., Liu, Q., Chen, R., Bai, C., Zhang, D., Zheng, L., Du, Y., Cai, Y., 2014. Aluminium chloride impairs long-term memory and downregulates cAMP-PKA-CREB signalling in rats. Toxicology. https://doi.org/10.1016/j.tox.2014.06.011

Zimmermann, H., 2008a. ATP and acetylcholine, equal brethren. Neurochem. Int. https://doi.org/10.1016/j.neuint.2007.09.004

Zimmermann, H., 2008b. Ectonucleotidases in the Nervous System, in: Purinergic Signalling in Neuron-Glia Interactions. https://doi.org/10.1002/9780470032244.ch10

Zimmermann, H., 2001. Ectonucleotidases: Some recent developments and a note on nomenclature, in: Drug Development Research. https://doi.org/10.1002/ddr.1097



Figure 1. Experimental design. Schematic representation of the experimental design of this study. 1 - CT - control group, 2 - group treated with 50 and, 3 - 100 mg / kg of AlCl₃, STM - short-term memory and LTM - long-term memory.

Groups	Body weight (g)		Brain weight (g)
	Onset	End	End
Control/saline	44.6 + 3.6	42.4 + 2.1	0.501 + 2.5
AlCl ₃ 50 mg/kg	42.5 + 2.1	43.0 + 4.0	0.482 + 1.8
AlCl ₃ 100 mg/kg	41.7 + 1.7	41.3 + 3.1	0.475 + 3.0*

Figure 2. Effects of Al³⁺ on body and brain weight of mice at the onset and after 30 days of experiment. A) Body weight, and B) Brain weight. Data are expressed as the mean + S.E.M. (p<0.05; n = 10). ANOVA and Tukey's post-hoc test.



Figure 3. Al³⁺ concentration ($\mu g / g$) in the serum and hippocampus of mice by ICP-OES. Each column represent the + S.E.M., n = 4 for each group (*p < 0.05).



Figure 4. Al³⁺ did not alter locomotor activity measured by open field test. (A) Number of crossing, (B) speed, (C) average speed and (D) Track plots of animal way on apparatus exploration. The following symbols have been used in these plots: • Track start, and • Track end. Data are expressed as the mean + S.E.M. (p<0.05; n = 10). ANOVA and Tukey's post-hoc test.



Figure 5. Effects of Al³⁺ on the recognition index in novel object recognition task. Oral administration of AlCl₃ at 50 and 100 mg/kg decreased the short-term memory – 4hs (A) and long-term memory -24 hs (B) as measures of recognition index in the object recognition task. Data are expressed as the mean + S.E.M. (p<0.05; n = 10). ANOVA and Tukey's post-hoc test.



Figure 6. Effects of Al³⁺ on spontaneous alternation in the Y-maze test. (A) Percentage of alternation, (B) Total number of arm entries. (C) Pooled heatmap representing the normalized mean time spent within the maze during the test. Data are expressed as the mean + S.E.M. (p<0.05; n = 10). ANOVA and Tukey's post-hoc test.

A





Figure 7. Effects of Al³⁺ on DNA damage assessed using the comet assay. Mean comet score and comet classes in control and exposed groups. The cells were assessed visually and received class 0 (undamaged) to apoptosis (maximally damaged), according to the size and shape of the tail. Data are expressed as the mean + S.E.M. (p<0.05; n = 3). ANOVA and Tukey's post-hoc test.



Figure 8. Effects of Al³⁺ on nucleotide hydrolysis and adenosine deaminase (ADA) activity in hippocampus from mice treated with saline or AlCl₃ at 50 and 100 mg/kg. A) ATP hydrolysis by NTPDase, B) ADP hydrolysis by NTPDase, C) AMP hydrolysis by 5'-NT, and D) adenosine deamination by ADA. Data are expressed as the mean + S.E.M. (p<0.05; n = 10). ANOVA and Tukey's post-hoc test.



Figure 9. Al³⁺ modulates purinoreceptors density after chronic exposure of mice. A) Western blot quantification of P2X7 receptors in total membranes of the hippocampus of mice treated with saline or AlCl₃ at 50 and 100 mg/kg. β -actin was used as a loading control to normalize protein levels. Data are expressed as the mean + S.E.M. (p<0.05; n = 5). ANOVA and Tukey's post-hoc test.



Figure 10. Al³⁺ alters inflammatory cytokine markers density after chronic exposure of mice. A) Western blot quantification of IL-1 β proinflammatory cytokine, and B) IL-10 anti-inflammatory cytokine densities in total membranes of the hippocampus of mice treated with saline or AlCl₃ at 50 and 100 mg/kg. β -actin was used as a loading control to normalize protein levels. Data are expressed as the mean + S.E.M. (*p*<0.05; n = 5). ANOVA and Tukey's post-hoc test.

5. DISCUSSÃO

A formação do SNC envolve a proliferação, a migração e a diferenciação de célulastronco neurais de modo a formar uma diversidade de estruturas complexas com funções específicas, responsáveis pela manutenção da integridade do SNC durante o desenvolvimento embrionário e também na fase adulta (BOLDRINI et al., 2018; LEE; CLEMENSON; GAGE, 2012). A comunicação célula-célula representa um fator determinante neste processo, de forma que fatores extrínsecos e / ou intrínsecos podem influenciar direta e indiretamente no êxito do desenvolvimento cortical (AIMONE et al., 2014).

Um fator extrínseco que vem despertando bastante interesse nos últimos anos é a exposição a metais, como o Al. Apesar de não pertencer a classe de metais pesados, o Al é considerado um agente tóxico, principalmente no que se refere ao SNC (COLOMINA; PERIS-SAMPEDRO, 2017). Diversos estudos têm demonstrado seus efeitos em linhagens celulares, em modelo animal bem como em estudos *pós mortem* em humanos (CAO et al., 2016; GROCHOWSKI et al., 2019; NAM et al., 2016; ZHANG et al., 2018).

Nesta tese, buscamos investigar os efeitos da exposição ao Al em cultura de neuroesferas e posteriormente em modelo de exposição crônica ao metal *in vivo*. As neuroesferas são aglomerados de CPNs, extraídas do telencéfalo de embriões no 13° dia de gestação, que em condições específicas e na presença de fatores de crescimento (EGF e FGF-2) proliferam e formam as neuroesferas (NEGRAES et al., 2012). Após este período, estas células são induzidas a se diferenciarem nas linhagens neurais já descritas: neurônios, astrócitos e oligodendrócitos (NEGRAES et al., 2012). As neuroesferas representam um modelo simples que reúne características semelhantes aos processos fisiológicos *in vivo*, além de ser de fácil obtenção, manuseio e manutenção *in vitro*, representando modelo apresenta inúmeras características que permitem avaliar a influência de fatores externos sobre a diferenciação neural de forma ampla e eficiente (TRUJILLO et al., 2012). A partir das imagens feitas após o período de proliferação da CPNs, constatamos que o Al³⁺ apenas na concentração de 100 μ M reduziu o número e o diâmetro das neuroesferas quando comparadas as células controle, indicando que o metal impede a aglomeração das CPNs em formar as neuroesferas, reduzindo a proliferação destas células.

Além disso, o sucesso na migração e destino neural das CPNs está relacionado ao ciclo celular, responsável por divisões simétricas e assimétricas da célula (HOMEM; REPIC; KNOBLICH, 2015). Fatores ambientais químicos e físicos podem alterar a divisão celular, influenciando a expansão e diferenciação das CPNs (SEKI et al., 2007). Assim sendo, as fases

do ciclo celular sub G₁, G₀/G₁, S e G₂/M foram avaliadas por citometria de fluxo. O Al³⁺ aumentou a população de células na fase sub G1, indicando apoptose celular. Além disso, o Al³⁺ diminuiu o número de células na fase G2 / M, fase responsável pela divisão celular, afetando diretamente o destino celular de se diferenciar em neurônios ou células da glia.

Neste sentido, para avaliar parâmetros relacionados ao destino neural, como migração e diferenciação, a escolha de uma concentração de Al que não se torne excessivamente tóxica para as células é essencial. Para isto, avaliamos a função mitocondrial através de ensaio do MTT em neuroesferas, expostas a diferentes concentrações do metal (0-100 μ M), administrado na forma de seu sal, AlCl₃. Nossos resultados mostraram que o Al³⁺ foi capaz de reduzir a função mitocondrial em neuroesferas expostas a 10, 50 e 100 μ M de Al³⁺. A mitocôndria possui um papel fundamental na viabilidade celular, estando relacionada com a funcionalidade da célula, e representa a principal fonte de energia para mobilidade e homeostase celular, sendo a sua disfunção amplamente relacionada a sobrevivência celular em processos patofisiológicos (SPIKINGS; ALDERSON; JOHN, 2006; SURIN et al., 2017).

Ainda, a marcação de células apoptóticas por Anexina V comprovaram os resultados encontrados na análise do ciclo celular. Anexina V é uma proteína que se liga a fosfolipídeos de membrana, permitindo analisar mudanças na assimetria da membrana, através da medida da aderência de Anexina V à membrana celular. O início da apoptose pode ser detectado antes de observar alterações morfológicas na célula e antes da perda da integridade da membrana (SCHUTTE et al., 1998). O Al³⁺ causou apoptose (em torno de 15%) nas neuroesferas nas concentrações de 1, 10 e 50 μ M. Este resultado permite concluir que o Al³⁺ induziu uma baixa percentagem de células em apoptose, indicando sua baixa citotoxidade através de mecanismos apoptóticos. Acreditamos que o principal mecanismo da toxidade do Al³⁺ não seja causar apoptose na maioria das células, uma vez que foi observada uma redução na formação da neuroesferas apenas na concentração de 100 μ M. Mas, afetar o metabolismo celular como um todo, ao internalizar as células e então causar seus efeitos deletérios.

Posteriormente, avaliamos uma etapa decisiva para a diferenciação neural e formação do SNC, a migração das CPNs (KANEKO; SAWADA; SAWAMOTO, 2017). Após a remoção dos fatores de crescimento, dá-se início a indução da diferenciação neural, em que, primeiramente, as neuroesferas exibem um padrão de migração radial relacionado a um gradiente de maturação celular (TRUJILLO et al., 2012). Este parâmetro foi avaliado, através de imagens e mostram que o Al³⁺ foi capaz de reduzir os prolongamentos dos dendritos em todas as concentrações nas quais as neuroesferas foram expostas.

Por conseguinte, o destino neural das neuroesferas foi observado utilizando marcadores específicos correspondentes a cada estágio de maturação e linhagem celular (ZHANG; JIAO, 2015). Cabe ressaltar, que neste ensaio utilizamos apenas a menor concentração testada (1 μ M), já que obteve efeitos semelhantes as demais (10 e 50 μ M). Constatou-se que o Al aumentou a percentagem de células positivas para GFAP e Nestina, as quais determinam o padrão radial de migração e, essa dupla marcação indica a prevalência de células precursoras indiferenciadas (WEI et al., 2002). Por outro lado, verificamos uma diminuição na percentagem de células positivas para β 3-tubulina, indicando uma redução do microambiente neurogênico. Também é possível observar uma rede de migração radial mais próxima ao núcleo, constituída principalmente por progenitores neurais e uma rede mais difusa, composta por neurônios localizados em regiões distais.

Com base nestes resultados apresentados no artigo 1, sugerimos que o Al³⁺ diminui a neurogênese, devido a uma inibição global na diferenciação neural, comprovada pela diminuição do fenótipo glial e neuronal em oposição a um aumento da quantidade de células precursoras. Desta forma, em concordância com estudos anteriores, as neuroesferas se mostram um modelo científico bastante útil e altamente sensível para avaliar a influência de estímulos externos na modulação da diferenciação neural, assim como investigar mecanismos subjacentes que possam estar envolvidos na exposição ao Al³⁺, como a via purinérgica (TRUJILLO et al., 2012).

Dentre a grande variedade de receptores de neurotransmissores, os purinérgicos desempenham um papel crucial no desenvolvimento embrionário, principalmente no que se refere a interação neurônio-glia associada a diferenciação neural (BURNSTOCK; ULRICH, 2011). A importância do sistema purinérgico durante o desenvolvimento embrionário se dá pela identificação da expressão de diversos subtipos de receptores purinérgicos, ativados por ATP, nos primeiros estágios do desenvolvimento neural. Estes receptores estão envolvidos em muitos eventos tróficos necessários para o desenvolvimento do cérebro embrionário, incluindo proliferação de progenitores, migração, diferenciação neural e sobrevivência celular (BURNSTOCK; DALE, 2015; OLIVEIRA; ILLES; ULRICH, 2016).

Desta forma, no primeiro manuscrito contido nesta tese, propomos um mecanismo de toxicidade do Al ao afetar a diferenciação das CPNs embrionárias, envolvendo a sinalização purinérgica, a qual é essencial para o desenvolvimento cortical. No intuito de compreender e propor algum mecanismo para a toxicidade do Al³⁺ sobre as CPNs, investigamos como este elemento se comporta ao ser adicionado ao meio de cultivo contendo as CPNs. Verificamos

que o Al^{3+} se adere ao citoplasma das neuroesferas tratadas com 1, 10 e 50 μ M de Al^{3+} , de maneira dependente da concentração. Este resultado sugere que o Al^{3+} possui um grande poder de internalizar as células, causar danos a membrana celular, e consequentemente, afetar a homeostase de íons essenciais para a função fisiológica celular normal.

Uma vez demonstrada qualitativamente a adsorção de Al^{3+} pelas CPNs, avaliamos se o metal poderia alterar a sinalização induzida pelo ATP extracelular. Estudos anteriores apontam para um papel dos nucleotídeos (ATP e UTP) e adenosina na estimulação da migração de células progenitoras, como reguladores centrais da expansão celular e da neurogênese embrionária (OLIVEIRA; ILLES; ULRICH, 2016). O Al³⁺ nas concentrações de 10 e 50 μ M diminuiu os níveis extracelulares de ATP, possivelmente devido à alta afinidade entre o Al³⁺ e os grupos fosfato do ATP. Esta hipótese foi confirmada pela presença de Al³⁺ na curva padrão do ensaio para quantificar ATP, indicando uma bioluminescência reduzida na luciferase, que requer ATP para a produção do sinal luminoso.

O ATP extracelular é rapidamente hidrolisado por ectoenzimas localizadas na superfície da célula, que podem mediar as vias de sinalização associadas ao desenvolvimento neural (MISHRA, 2006; RODRIGUES; MARQUES; CUNHA, 2018). Observamos que as neuroesferas expostas ao Al³⁺ reduziram as atividades da NTPDase e 5'-nucleotidase quando comparadas aos grupos controle. Esse resultado pode refletir: a) uma liberação diminuída de ATP induzida por Al³⁺, o que reduz as atividades de ectoenzimas, pois há menos substrato disponível e, b) a capacidade do Al³⁺ de formar complexos com ATP, alterando as cascatas globais de ectoenzimas. Similarmente, foi observado por nosso grupo de pesquisa que as enzimas envolvidas no metabolismo do ATP em sinaptossomas do córtex de ratos são inibidas pelo íon alumínio (SCHETINGER et al., 1995). Por outro lado, a expressão destas ectoenzimas permaneceu inalterada após a exposição ao Al³⁺, sugerindo que o metal afeta apenas as atividades da NTPDase e da 5-nucleotidase, reduzindo a liberação extracelular de nucleotídeos.

O ATP atua ligando-se a purinoreceptores específicos, e quase todas as células expressam esses subtipos de receptores, incluindo as CPNs (OLIVEIRA; ILLES; ULRICH, 2016). Neste sentido, o receptor P2Y1 tem sido associado a um papel essencial na migração das CPNs e no desenvolvimento do cérebro embrionário através da sinalização purinérgica mediada pelo ATP (RIBEIRO et al., 2019; SCEMES; DUVAL; MEDA, 2003). Nossos resultados mostram que o Al³⁺ induziu uma regulação negativa da expressão do receptor P2Y1. Sabe-se que durante o desenvolvimento do cérebro, o ATP, ao se ligar ao receptor P2Y1 nas CPNs, regula a proliferação, a migração e o desenvolvimento do córtex cerebral

(BURNSTOCK; ULRICH, 2011; RIBEIRO et al., 2019; RUBINI et al., 2009). A redução na expressão do receptor P2Y1 pode afetar diretamente a neurogênese. Possivelmente isto ocorra através de alterações na sinalização de cálcio e na migração dos progenitores neurais e, pode constituir um ponto de regulação crítico para modular a mobilização e diferenciação das CPNs embrionárias e durante a vida adulta (HEINE et al., 2015).

Da mesma forma que os receptores de ATP, a adenosina também expressa receptores específicos nas neuroesferas e desempenha um papel importante durante o desenvolvimento cerebral (LV; SHAO; GAO, 2018; RODRIGUES; MARQUES; CUNHA, 2018). Nossos resultados mostram uma redução expressão do receptor A2A nas neuroesferas expostas ao Al³⁺, quando comparadas com as células controles. Estudos recentes demonstram que a ativação de receptores de adenosina promove a proliferação das CPNs (LV; SHAO; GAO, 2018; RIBEIRO et al., 2019). Em concordância com estes dados da literatura, sugerimos que o Al³⁺ também pode afetar a proliferação e diferenciação das CPNs por intermédio do receptor A2A.

Tomados em conjunto, os nossos resultados *in vitro* apontam para um efeito negativo do Al³⁺ sobre a neurogênese embrionária, através de alterações na sinalização purinérgica, como está esquematizado na Figura 13. A elucidação do mecanismo de ação do Al³⁺ nos sistemas biológicos constitui uma etapa crítica na compreensão de como este metal pode induzir a degeneração neuronal associada a patologias como DA.



Figura 13. Efeitos do Al³⁺ *in vitro*. O Al³⁺ reduz a proliferação e diferenciação de CPNs, assim como uma reduz a divisão celular, o que afeta diretamente o destino neural. Uma redução no metabolismo do ATP é observada, possivelmente pelo fato do Al³⁺ formar complexos com o ATP, como consequência ocorre uma redução na ativação dos receptores P2Y1 e A2A, importantes para o desenvolvimento neural. Fonte: Autor

Posteriormente aos resultados obtidos *in vitro*, avaliamos se essa via mecanística assemelha-se ao que ocorre *in vivo*. Para isto, utilizamos um modelo de exposição crônica ao Al³⁺, na forma de AlCl₃, via oral, durante 30 dias e analisamos parâmetros relacionados à memória, envolvimento do sistema purinérgico e neuroinflamação no hipocampo total de camundongos Swiss expostos ao metal.

Estudos epidemiológicos sobre a neurotoxicidade clínica do Al^{3+} demonstram que a exposição crônica ao íon metálico pode induzir déficits cognitivos semelhantes aos que ocorrem na demência (BONDY, 2010; BONDY; CAMPBELL, 2017). O cérebro é o órgão mais vulnerável à acumulação e toxicidade de Al^{3+} (MCLACHLAN et al., 2019). Assim, avaliamos mecanismos ligados aos parâmetros de toxicidade e memória do Al^{3+} *in vivo*.

A forma iônica do Al, Al³⁺, pode acessar facilmente o SNC na presença de contra-íons, como por exemplo o fosfato, citrato ou ao se ligar a proteínas específicas, como a transferrina, viabilizando sua passagem pela barreira hematoencefálica, onde deposita-se nas regiões do cérebro, como o hipocampo (YOKEL, 2006). O hipocampo é a estrutura responsável pela formação e consolidação da memória, bem como pela neurogênese e plasticidade neural, além de representar um alvo da acumulação de Al³⁺ (AIMONE et al., 2014). Nossos resultados mostraram que o AlCl₃ na concentração de 100 mg / kg foi capaz de diminuir o peso cerebral de camundongos, bem como aumentar a concentração de Al³⁺ no soro e no hipocampo. E, do Al³⁺ sérico total, 48,3% foi capaz de atingir a região hipocampal, indicando um considerável acúmulo do Al³⁺ através da forma de administração, período e modelo animal utilizado.

Uma vez demonstrado quantitativamente que nosso modelo de exposição ao Al^{3+} por administração oral foi suficiente para alcançar o SNC, avaliamos testes de memória de curta e longa duração. Nossos resultados mostram que o Al^{3+} não alterou a atividade locomotora dos animais. A memória de curta e longa duração foi afetada após o tratamento com AlCl₃ na concentração de 100 mg/kg, conforme observado pelos testes de reconhecimento de objetos e labirinto em Y. Sugerimos que a toxicidade de Al^{3+} pode induzir a déficits cognitivos irreversíveis, possivelmente por causar alterações nas funções hipocampais e morte neuronal, como demonstrado por CAO et. al (2016) e colaboradores (CAO et al., 2016).

Além disso, avaliamos a genotoxicidade do Al^{3+} pelo teste Cometa, o que indicou que o tratamento com AlCl₃ a 100 mg / kg causou danos ao DNA observados em nossas abordagens experimentais. Sugerimos que a genotoxicidade conferida pelo Al^{3+} pode causar mutações e apoptose, contribuindo para a disfunção celular. Além disso, o Al^{3+} pode interagir com a

membrana plasmática, afetando a estrutura e função do DNA e de proteínas importantes (BORNEMANN; HERZOG; WINTER, 2019).

Uma classe importante de proteínas da superfície celular são as ectonucleotidases (ZIMMERMANN, 2008). Avaliamos a NTPDase, a 5'-NT e a ADA em hipocampo total. Nossos dados mostraram uma atividade aumentada dessas enzimas em camundongos tratados com 100 mg / kg de AlCl₃. Sugerimos que, nessa condição, o ATP atue como um agente próinflamatório, com uma hidrólise elevada, possivelmente, em resposta a altos níveis de ATP (SKAPER; DEBETTO; GIUSTI, 2010). Estes resultados estão de acordo com Kaizer et. al (2007), indicando um aumento nas atividades das ectonucleotidases na fração sinaptossomal obtida do córtex cerebral e hipocampal de ratos (KAIZER et al., 2007). Em contraste, Schetinger et. al (1995) demonstraram que o aluminio inibiu significativamente as atividades de ATPase e ADPase *in vitro* em sinaptossomas do córtex de ratos e, mais recentemente, Reichert et. al (2019) mostraram que o Al³⁺ reduz a atividade da NTPDase em células precursoras neurais *in vitro* (REICHERT et al., 2019; SCHETINGER et al., 1995). Acreditamos que essa diferença de resultados ocorra pelo fato dos estudos abordarem diferentes formas e tempo de exposição ao metal.

Altos níveis de ATP são suficientes para ativar receptores específicos, como P2X7 (SAVIO et al., 2018). Aqui, demonstramos que o AlCl₃ na concentração de 100 mg / kg foi capaz de aumentar a expressão desse receptor, o que pode caracterizar uma condição inflamatória induzida pelo Al³⁺. Em concordância com os dados obtidos, analisamos a densidade de citocinas pró e anti-inflamatórias. Nossos resultados indicaram que o AlCl₃ a 100 mg / kg foi capaz de elevar a citocina pró-inflamatória IL-1 β , bem como reduzir a IL-10, citocina anti-inflamatória. Tomados em conjunto, esses dados configuram um cenário neuroinflamatório (CAO et al., 2016), podendo afetar diretamente a sobrevivência neuronal, induzindo déficits cognitivos, conforme observado neste estudo.

Além disso, a adenosina é uma molécula relacionada aos efeitos neuromodulatórios através da ligação a receptores específicos (RODRIGUES; MARQUES; CUNHA, 2018). O aumento da atividade da adenosina desaminase pode representar níveis reduzidos do seu substrato, adenosina, no hipocampo. Assim, avaliamos as densidades dos receptores de adenosina A1 e A2A para esclarecer os efeitos dessa molécula no SNC. Nossos dados não mostraram diferenças significativas na densidade do receptor A1 entre os grupos analisados. No entanto, observamos um aumento no receptor A2A em animais tratados com 100 mg / kg de AlCl₃. Estudos têm sugerido que uma ativação do receptor A2A no SNC de animais adultos

pode induzir ao declínio cognitivo. Assim sugerimos que a ação da adenosina ao se ligar a este receptor pode explicar os resultados observados nos testes comportamentais, uma vez que esse receptor está associado á perda de memória e neurotoxidade (FREDHOLM et al., 2005; STOCKWELL; JAKOVA; CAYABYAB, 2017).

Em resumo, nosso estudo aponta para a importância do sistema purinérgico durante a exposição prolongada ao Al, como mostra a Figura 13. A sinalização do ATP e da adenosina representa uma via suscetível ao desequilíbrio no metabolismo de íons metálicos. A sinalização induzida por estas moléculas contribui para o entendimento acerca da perda de memória após uma exposição prolongada ao metal. Nosso modelo de intoxicação por Al desencadeia um processo neuroinflamatório, conforme a literatura sugere. Aqui, propomos que o mecanismo envolvido no declínio cognitivo e na neuroinflamação ocorre através da ativação dos receptores P2X7 e A2A, o que ainda pode induzir a neurodegeneração quando associada a fatores ambientais.



Figura 14. Efeitos do Al³⁺ *in vivo*. O tratamento oral com Al³⁺, na forma de AlCl₃, durante 30 dias causou déficits de memória em camunondongos e dano ao DNA, possívelmente devido a um processo neuroinflamatório através de um aumento na hidrólise do ATP e ativação dos receptores A2A e P2X7 em hipocampo de camundongos expostos cronicamente ao Al. Fonte: Autor

De modo geral, esta tese fornece evidências para elucidar a influência do Al³⁺ na diferenciação neural. Além disso, propomos uma via mecanistica ainda pouco investigada na

exposição ao metal tanto *in vitro* quanto *in vivo*, que complementa seu papel na neuroinflamação. Cabe ressaltar que como o Al³⁺ inibiu a diferenciação das CPNs *in vitro*, o processo não caracterizou neuroinflamação, uma vez que carece de células gliais para tal. Porém, *in vivo* a interação das diversas vias de sinalização de forma a conter os prejuízos causados frente a um estímulo citotóxico, contribuem para um cenário mais complexo. Com isso, pretende-se encorajar novas pesquisas acerca da compreensão dos mecanismos moleculares que medeiam a inter-relação entre as mais diversas vias de sinalização e ampliar as possibilidades no entendimento da fisiopatologia de doenças neurodegenerativas com base na exposição ao Al.

6. CONCLUSÕES

Este estudo permitiu concluir que o Al³⁺ diminuiu a proliferação, induziu apoptose e diminuiu a divisão celular das CPNs. Consequentemente, o Al³⁺ provocou uma inibição global da diferenciação neural por aumentar a proliferação de células indiferenciadas, o que contribui para diminuir a neurogênese. Ainda, a exposição ao Al³⁺ diminuiu a atividade das enzimas NTPDase e 5'-Nucleotidase em CPNs, sugerindo que o ATP pode formar complexos com o Al³⁺ *in vitro*, o que afeta diretamente o seu metabolismo. Paralelamente, foi observada uma redução na expressão dos receptores P2Y1 e A2A, receptores importantes para o desenvolvimento cortical e auto-renovação celular frente a um estímulo excitotóxico em CPNs extraídas do telencéfalo de embriões de camundongos no 13° dia de gestação.

Por outro lado, a exposição crônica ao Al^{3+} reduziu o volume cerebral e aumentou nos níveis séricos e hipocampais de Al^{3+} , o que contribui para provocar os déficits de memória de curta e longa duração, avaliados através de testes comportamentais de reconhecimento de objetos e labirinto em Y em camundongos expostos cronicamente ao metal. Ainda, foram observados danos ao DNA em células sanguíneas pelo Al^{3+} , as quais representam um marcador sistêmico, que pode ser relacionado à possíveis danos no SNC. Simultaneamente, o tratamento com Al^{3+} causou um aumento na hidrólise do ATP, podendo representar um potencial proinflamatório deste nucleotídeo. Além disso, o Al^{3+} aumentou a expressão dos receptores P2X7 e A2A, podendo estar relacionado ao declínio cognitivo observado neste estudo, e induziu a liberação de citocina proinflamatória IL-1 β e diminuiu a densidade da citocina anti-inflamatória IL-10 no hipocampo de animais, caracterizando um processo neuroinflamatório.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Para complementar o trabalho desenvolvido nesta tese, torna-se relevante investigar os mecanismos de ação do Al sobre proliferação/auto-renovação, migração e neurogênese hipocampal adulta no giro denteado do hipocampo, bem como a interação do Al com outras vias de sinalização celular como do PI3K/Akt e MAPK/ERK1/2 a partir de uma possível relação do acúmulo deste metal no desenvolvimento da DA. O trabalho futuro visa elucidar melhor os mecanismos envolvidos na exposição ao Al, traçando perspectivas para o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos que possam evitar o surgimento e/ou progressão da doença, tratando não apenas a sintomatologia da DA, mas também fatores etiológicos que estão relacionados a ela.

8. REFERÊNCIAS

ABBRACCHIO, M. P.; BURNSTOCK, G. Purinergic signalling: pathophysiological roles. Japanese Journal of Pharmacology, vol. 78, p. 113-145, 1998.

AIMONE, James B. *et al.* Regulation and function of adult neurogenesis: from genes to cognition. **Physiological Reviews**, vol. 96, p. 991-1026, 2014.

ALFREY, A C; LEGENDRE, G. R.; KAEHNY, W. D. The dialysis encephalopathy syndrome. Possible aluminum intoxication. **The New England journal of medicine**, vol. 294, p. 184–8, 1976.

ALTMAN, J. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. Journal of Comparative Neurology, vol. 136, p. 269-293, 1969.

ANVISA. RESOLUÇÃO DE DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 11, DE 13 DE MARÇO DE 2014, 2014.

ARAI, Y.; HUTTNER, W. B.; CALEGARI, F. Neural stem cells. *Regenerative Medicine - from Protocol to Patient: 2. Stem Cell Science and Technology: Third Edition.* 2016.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DO ALUMÍNIO. História do Alumínio. 2019.

ATKINS, P. et al. Shriver & Atkins Química Inorgânica. Shriver and Atkin's inorganic chemistry. 2010.

ATSDR. A Toxicological Profile for Aluminum. In: Department of Health and Human Services, Public Health Service, 2008.

BAKAR, C. et al. Effect of high aluminum concentration in water resources on human health, case study: Biga peninsula, northwest part of turkey. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, vol. 58, p. 935–944, 2010.

BARRACK, D. S.; THUL, R.; OWEN, M. R. Modelling the coupling between intracellular calcium release and the cell cycle during cortical brain development. **Journal of Theoretical Biology**, 2014.

BARTUS, R. et al. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. **Science**, vol. 217, p. 408–414, 1982.

BAUMANN, J. et al. Comparative human and rat neurospheres reveal species differences in chemical effects on neurodevelopmental key events. **Archives of Toxicology**, vol. 346, p. 17-32, 2016.

BEARDMORE, J.; EXLEY, C. Towards a model of non-equilibrium binding of metal ions in biological systems. **Journal of Inorganic Biochemistry**, vol. 103, p. 205-209, 2009.

BERTHON, G. Aluminium speciation in relation to aluminium bioavailability, metabolism and toxicity. **Coordination Chemistry Reviews,** vol. 228, p. 319–341, 2002.

BIGNUCOLO, A. et al. The Molecular Connection Between Aluminum Toxicity, Anemia, Inflammation and Obesity: Therapeutic Cues. **Anemia**, vol. 25, p. 403-424, 2012.

BLURTON-JONES, M. et al. Neural stem cells improve cognition via BDNF in a transgenic model of Alzheimer disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, vol. 106, p. 13594-13599, 2009.

BOLDRINI, M. et al. Human Hippocampal Neurogenesis Persists throughout Aging. Cell Stem Cell, vol. 22, p. 589-599, 2018.

BOLLA, K. I. et al. Neurocognitive effects of aluminum. Archives of neurology, vol. 49, p. 1021–6, 1992.

BONDY, Stephen C. The neurotoxicity of environmental aluminum is still an issue. **Neurotoxicology**, vol. 31, p. 575-581, 2010.

BONDY, S. C.; CAMPBELL, A. Aluminum and Neurodegenerative Diseases. Advances in Neurotoxicology, vol. 1, p. 131-156, 2017.

BORNEMANN, S.; HERZOG, M.; WINTER, R. Impact of Y^{3+} -ions on the structure and phase behavior of phospholipid model membranes. **Physical Chemistry Chemical Physics**, vol. 21, no. 10, p. 5730–5743, 2019.

BURNSTOCK, G. et al. Evidence that adenosine triphosphate or a related nucleotide is the transmitter substance released by non-adrenergic inhibitory nerves in the gut. **British Journal of Pharmacology**, 1970.

BURNSTOCK, G. Purine and pyrimidine receptors. **Cellular and Molecular Life Sciences,** vol. 64, p. 1471–1483, 2007a.

BURNSTOCK, G. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. **Physiological** reviews, vol. 87, no. 2, p. 659–797, 2007b.

BURNSTOCK, G. Purinergic signalling and disorders of the central nervous system. **Nature Reviews Drug Discovery**, vol. 7, p. 575–590, 2008.

BURNSTOCK, G. Purinergic signalling: From discovery to current developments. **Experimental Physiology**, vol. 99, p. 16-34, 2014.

BURNSTOCK, G.; VERKHRATSKY, A. Purinergic signaling. Wiley Interdisciplinary Reviews: Membrane Transport and Signaling, 2012.

BURNSTOCK, Geoffrey; DALE, Nicholas. Purinergic signalling during development and ageing. **Purinergic Signalling**, vol. 11, p. 277- 305, 2015.

CAMERON, H. A. et al. Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. **Neuroscience**, vol. 56, p. 337-344, 1993.

CAMPBELL, A. Inflammation, neurodegenerative diseases, and environmental exposures. In: **Annals of the New York Academy of Sciences,** vol. 1035, p. 117-132, 2004.

CANALS, M. et al. Molecular mechanisms involved in the adenosine A1 and A 2A receptor-induced neuronal differentiation in neuroblastoma cells and striatal primary cultures. **Journal of Neurochemistry**, vol. 92, p. 337-348, 2005.

CANDY, J. M. et al. Aluminosilicates and senile plaque formation in alzheimer's disease. **The Lancet**, vol. 327, p. 354–356, 1986.

CAO, Z. et al. Aluminum chloride induces neuroinflammation, loss of neuronal dendritic spine and cognition impairment in developing rat. **Chemosphere**, vol. 151, p. 289-295, 2016.

CARDIANO, P. et al. Study of Al 3+ interaction with AMP, ADP and ATP in aqueous solution. **Biophysical Chemistry**, vol. 234, p. 42–50, 2018.

CHAPPARD, D.; BIZOT, P.; MABILLEAU, G.; HUBERT, L. Aluminum and bone: Review of new clinical circumstances associated with Al³⁺ deposition in the calcified matrix of bone. **Morphologie**, vol. 100, p. 95-105, 2016.

COLGAN, S. P.; ELTZSCHIG, H. K.; ECKLE, T.; THOMPSON, L. F. Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73). **Purinergic Signalling**, vol. 2, p. 351-360, 2006.

COLOMINA, M. T. et al. Influence of age on aluminum-induced neurobehavioral effects and morphological changes in rat brain. In: **NeuroToxicology**, vol. 23, p. 775-781, 2002.

COLOMINA, M. T.; PERIS-SAMPEDRO, F. Aluminum and Alzheimer's Disease. Advances in Neurobiology, vol. 18, p. 183-197, 2017.

DAVIS, K. Material Review: Alumina (Al2O3). School of Doctoral Studies European Union Journal, vol. 2, p. 109-114, 2010.

DELONCLE, R.; HUGUET, F.; BABIN, P.; et al. Chronic administration of aluminium l-glutamate in young mature rats: Effects on iron levels and lipid peroxidation in selected brain areas. **Toxicology Letters**, vol. 104, p. 65-73, 1999.

DEUCHARS, S. A. et al. Neuronal P2X7 receptors are targeted to presynaptic terminals in the central and peripheral nervous systems. **Journal of Neuroscience**, vol. 21, p. 7143–7152, 2001.

DEUTSCH, J. A. The Cholinergic Synapse and the Site of Memory. Science, vol. 174, p. 788–794, 1971.

DEVOTO, E.; YOKEL, R. A. The biological speciation and toxicokinetics of aluminum. *Environmental* **Health Perspectives,** vol. 102, p. 940-951, 1994.

DONOVAN, M. H. et al. Decreased adult hippocampal neurogenesis in the PDAPP mouse model of Alzheimer's disease. **The Journal of comparative neurology**, vol. 495, p. 70–83, 2006.

DRÜEKE, T. B. Intestinal absorption of aluminium in renal failure. Nephrology Dialysis Transplantation, vol. 17, p. 13-16, 2002.

DUARTE, J. M. N. et al. Modification of adenosine A1 and A2A receptor density in the hippocampus of streptozotocin-induced diabetic rats. **Neurochemistry International**, vol. 48, p. 144–150, 2006.

EXLEY, C. ATP-promoted amyloidosis of an amyloid beta peptide. **Neuroreports**, vol. 20, p. 3411–3414, 1997.

EXLEY, C. Does antiperspirant use increase the risk of aluminium-related disease, including Alzheimer's disease? **Molecular Medicine Today**, vol. 4, p. 107-109, 1998.

EXLEY, C. The pro-oxidant activity of aluminum. **Free Radical Biology and Medicine,** vol. 36, p. 380–387, 2004.

EXLEY, C. Human exposure to aluminium. **Environmental science. Processes & impacts,** vol. 15, p. 1785–1970, 2013.
EXLEY, C; SIESJÖ, P.; ERIKSSON, H. The immunobiology of aluminium adjuvants: how do they really work? **Trends in Immunology,** vol. 31, p. 103-109, 2010.

FAGUNDES, D. J.; TAHA, M. O. Animal disease model: choice's criteria and current animals specimens. Acta Cirúrgica Brasileira, vol. 19, p. 59-65, 2004.

FARKAS, L. M.; HUTTNER, W. B. The cell biology of neural stem and progenitor cells and its significance for their proliferation versus differentiation during mammalian brain development. **Current Opinion in Cell Biology**, vol. 20, p. 707-715, 2008.

FERRARI, D. et al. Mouse microglial cells express a plasma membrane pore gated by extracellular ATP. Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950), vol. 156, p. 1531–1539, 1996.

FLORIO, M.; HUTTNER, W. B. Neural progenitors, neurogenesis and the evolution of the neocortex. **Development (Cambridge)**, vol. 141, p. 2182-2194, 2014.

FREDHOLM, B. B. et al. Adenosine and Brain Function. **International Review of Neurobiology,** vol. 63, p. 191-270, 2005.

GAGE, F. H. Mammalian neural stem cells. Science, vol. 287, p. 1433–1438, 2000.

GÖTZ, M.; HUTTNER, W. B. The cell biology of neurogenesis. Nature Reviews Molecular Cell Biology, vol. 6, p. 777-788, 2005.

GRANT, P. Neurotransmitters. International Encyclopedia of the Social & Behavioral Sciences: Second Edition, 2015.

GROCHOWSKI, C. et al. Increased aluminum content in certain brain structures is correlated with higher silicon concentration in alcoholic use disorder. **Molecules**, vol. 24, 2019.

GUPTA, V. B.; ANITHA, S.; HEGDE, M. L.; et al. Aluminium in Alzheimer's disease: Are we still at a crossroad? **Cellular and Molecular Life Sciences,** vol. 62, p. 143-158, 2005.

HAMLEY, I. W. The amyloid beta peptide: A chemist's perspective. role in Alzheimer's and fibrillization. Chemical Reviews, vol. 112, p. 5147-5192, 2012.

HARDWICK, L. J. A. et al. Cell cycle regulation of proliferation versus differentiation in the central nervous system. **Cell and Tissue Research**, vol. 359, p. 187-200, 2015.

HAUGHEY, N. J. et al. Disruption of neurogenesis by amyloid beta-peptide, and perturbed neural progenitor cell homeostasis, in models of Alzheimer's disease. **Journal of Neurochemistry**, vol. 83, p. 1509–1524, 2002.

HE, J.; CREWS, F. T. Neurogenesis decreases during brain maturation from adolescence to adulthood. **Pharmacology Biochemistry and Behavior,** vol. 86, p. 327-333, 2007.

HEINE, C. et al. P2Y1 receptor mediated neuronal fibre outgrowth in organotypic brain slice cocultures. **Neuropharmacology**, vol. 93, p. 252-266, 2015.

HETNARSKI, B. et al. Central cholinergic activity in aluminum-induced neurofibrillary degeneration. **Annals of Neurology,** vol. 7, p. 489–490, 1980.

HOMEM, C. C. F.; REPIC, M.; KNOBLICH, J. A. Proliferation control in neural stem and progenitor cells. **Nature Reviews Neuroscience**, vol. 16, p. 647-659, 2015.

JAGANNATHA RAO, K. S.; RAO, G. V. Aluminium leaching from utensils - a kinetic study. International Journal of Food Sciences and Nutrition, vol. 46, p. 31-38, 1995.

JOHANSSON, C. B. et al. Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. **Cell**, vol. 96, p. 25-34, 1999.

JOUHANNEAU, P. et al. Gastrointestinal absorption, tissue retention, and urinary excretion of dietary aluminum in rats determined by using 26Al. **Clinical Chemistry**, vol. 43, p. 1023–1028, 1997.

JURINAK, J. J.; BAES, C. F.; MESMER, R. The Hydrolysis of Cations. Soil Science Society of America Journal, vol. 40, 287–312, 1976.

JUSTIN-THENMOZHI, A. et al. Attenuation of Aluminum Chloride-Induced Neuroinflammation and Caspase Activation Through the AKT/GSK-3 β Pathway by Hesperidin in Wistar Rats. **Neurotoxicity Research,** vol. 34, p. 463-476, 2018.

KAIZER, R. R. et al. The effect of aluminium on NTPDase and 5'-nucleotidase activities from rat synaptosomes and platelets. **International Journal of Developmental Neuroscience**, vol. 25, p. 381-386, 2007.

KANEKO, N.; SAWADA, M.; SAWAMOTO, K. Mechanisms of neuronal migration in the adult brain. **Journal of Neurochemistry**, vol. 6, p. 835-847, 2017.

KATSETOS, C. D.; LEGIDO, A.; PERENTES, E.; MÖRK, S. J. Class III β -tubulin isotype: A key cytoskeletal protein at the crossroads of developmental neurobiology and tumor neuropathology. **Journal of Child Neurology**, vol. 18, p. 851-866, 2003.

KIM, J. A. et al. Neural stem cell transplantation at critical period improves learning and memory through restoring synaptic impairment in Alzheimer's disease mouse model. Cell Death and Disease, vol. 6, p. 1-11, 2015.

KLOTZ, K. et al. The health effects of aluminum exposure. **Deutsches Arzteblatt International,** vol. 114, p. 653-659, 2017.

KORNACK, D. R.; RAKIC, P. Continuation of neurogenesis in the hippocampus of the adult macaque monkey. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, vol. 96, p. 5768-5763, 1999.

LAKE, D.; CORRÊA, S. A. L.; MÜLLER, J. Negative feedback regulation of the ERK1/2 MAPK pathway. **Cellular and Molecular Life Sciences**, vol. 73, p. 4397-4413, 2016.

LEE, J. D. Química inorgânica não tão concisa. Editora Edgard Blucher, 1999.

LEE, S. W.; CLEMENSON, G. D.; GAGE, F. H. New neurons in an aged brain. **Behavioural Brain Research**, vol. 227, p. 497-507, 2012.

LIAQUAT, L. et al. Acute aluminum chloride toxicity revisited: Study on DNA damage and histopathological, biochemical and neurochemical alterations in rat brain. **Life Sciences**, vol. 217, p. 202-211, 2019.

LIN, J. H. C. et al. Purinergic signaling regulates neural progenitor cell expansion and neurogenesis. **Developmental Biology**, vol. 302, p. 356-366, 2007.

LINDSEY, B. W.; TROPEPE, V. A comparative framework for understanding the biological principles of adult neurogenesis. **Progress in Neurobiology**, vol. 80, p. 281-307, 2006.

LIU, S.; KATHARINE HAMMOND, S.; ROJAS-CHEATHAM, A. Concentrations and potential health risks of metals in lip products. **Environmental Health Perspectives**, vol. 121, p. 705-710, 2013.

LV, J.; SHAO, Y. L.; GAO, Y. Activation of A 1 and A 2a adenosine receptors promotes neural progenitor cell proliferation. **Brain Research**, vol. 686, p. 65-71, 2018.

MARSHALL, G. P. et al. Production of neurospheres from CNS tissue. **Methods in Molecular Biology**, vol. 438, p. 135-150, 2008.

MARTYN, C. N. et al. Aluminum concentrations in drinking water and risk of Alzheimer's disease. **Epidemiology**, vol. 8, p. 281–286, 1997.

MATIGIAN, N. et al. Disease-specific, neurosphere-derived cells as models for brain disorders. *DMM* **Disease Models and Mechanisms,** vol. 3, p. 785-798, 2010.

MCDONALD, W. M. Neuromodulation Treatments for Geriatric Mood and Cognitive Disorders. American Journal of Geriatric Psychiatry, vol. 24, p. 1130-1141, 2016.

MCGINLEY, L. M. et al. Human neural stem cell transplantation improves cognition in a murine model of Alzheimer's disease. **Scientific Reports**, vol. 8, p. 1-10, 2018.

MCLACHLAN, D. R. C. et al. Aluminum in Neurological and Neurodegenerative Disease. *Molecular* **Neurobiology**, vol. 56, p. 1531-1538, 2019.

MILLER, M. W.; NOWAKOWSKI, R. S. Use of bromodeoxyuridine-immunohistochemistry to examine the proliferation, migration and time of origin of cells in the central nervous system. **Brain Research**, vol. 457, p. 44-52, 1988.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. PORTARIA Nº 2.914, DE 12 DE DEZEMBRO DE 2011. Padrão de potabilidade da água destinada ao consumo humano, 2011.

MING, G. LI; SONG, H. Adult Neurogenesis in the Mammalian Brain: Significant Answers and Significant Questions. **Neuron**, vol. 70, p. 687-702, 2011.

MINICHIELLO, L. TrkB signalling pathways in LTP and learning. Nature Reviews Neuroscience, vol. 10, p. 850-860, 2009.

MIRZA, A. et al. The Identification of Aluminum in Human Brain Tissue Using Lumogallion and Fluorescence Microscopy. Journal of Alzheimer's Disease, vol. 54, p. 1333-1338, 2016.

MISHRA, S. K. Extracellular nucleotide signaling in adult neural stem cells: synergism with growth factor-mediated cellular proliferation. **Developmen***t*, vol. 133, p. 675-684, 2006.

MOORE, K. L. Embriologia Básica, 8ª edição, 2013.

MUOTRI, A. R.; GAGE, F. H. Generation of neuronal variability and complexity. **Nature**, vol. 441, p. 1087-1093, 2006.

NAM, S. M. et al. Effects of aluminum on the reduction of neural stem cells, proliferating cells, and differentiating neuroblasts in the dentate gyrus of d-galactose-treated mice via increasing oxidative stress. **Journal of Veterinary Science**, vol. 17, p. 127–136, 2016.

NAYAK, P. Aluminum: Impacts and disease. Environmental Research, vol. 89, p. 101-115, 2002.

NEGANOVA, I.; LAKO, M. G1 to S phase cell cycle transition in somatic and embryonic stem cells. **Journal of Anatomy**, vol. 213, p. 30-44, 2008.

NEGRAES, P. D. et al. Neural differentiation of P19 carcinoma cells and primary neurospheres: Cell morphology, proliferation, viability, and functionality. **Current Protocols in Stem Cell Biology**, vol. 1, 2012.

NORTH, R. A. Molecular physiology of P2X receptors. **Physiological Reviews,** vol. 82, p. 1013-1067, 2002.

OLIVEIRA, Á.; ILLES, P.; ULRICH, H. Purinergic receptors in embryonic and adult neurogenesis. **Neuropharmacology**, vol. 104, p. 272-281, 2016.

OLIVEIRA, S. L. B.; PILLAT, M. M.; CHEFFER, A.; et al. Functions of neurotrophins and growth factors in neurogenesis and brain repair. Cytometry Part A, vol. 83, p. 76-89, 2013.

OGIMOTO, M. et al. Aluminium content of foods originating from aluminium-containing food additives. Food Additives and Contaminants: Part B Surveillance, vol. 9, p. 185-190, 2016.

OSHIMA, E. et al. Accelerated tau aggregation, apoptosis and neurological dysfunction caused by chronic oral administration of aluminum in a mouse model of tauopathies. **Brain Pathology**, vol. 23, p. 633-644, 2013.

PALMER, T. D.; WILLHOITE, A. R.; GAGE, F. H. Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. Journal of Comparative Neurology, vol. 425, p. 479-494, 2000.

PAOLO, C. DI et al. Chronic exposure to aluminum and melatonin through the diet: Neurobehavioral effects in a transgenic mouse model of Alzheimer disease. **Food and Chemical Toxicology**, vol. 69, p. 320-329, 2014.

PENNINGTON, J. A. T.; SCHOEN, S. A. Estimates of dietary exposure to aluminium. Food Additives and Contaminants, vol. 12, p. 119-128, 1995.

PINEAU, A. et al. In vitro study of percutaneous absorption of aluminum from antiperspirants through human skin in the Franz[™] diffusion cell. **Journal of Inorganic Biochemistry**, vol. 110, p. 116-228, 2012.

DEL PUERTO, A.; WANDOSELL, F.; GARRIDO, J. J. Neuronal and glial purinergic receptors functions in neuron development and brain disease. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, vol. 28, p. 1-15, 2013.

RALEVIC, V.; BURNSTOCK, G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacological reviews*, vol. 50, p. 413–492, 1998.

RAMÓN Y CAJAL, S.; DEFELIPE, J.; JONES, E. G.; MAY, R. M. Cajal's Degeneration and Regeneration of the Nervous System. 2012.

RATHBONE, M. P.; MIDDLEMISS, P. J.; GYSBERS, J. W.; et al. Trophic effects of purines in neurons and glial cells. **Progress in Neurobiology**, vol. 59, p. 663-690, 1999.

REICHERT, K. P. et al. Aluminum affects neural phenotype determination of embryonic neural

progenitor cells. Archives of Toxicology, vol. 93, p. 2515-2524, 2019.

RIVKEES, S. A. The ontogeny of cardiac and neural A1 adenosine receptor expression in rats. **Developmental Brain Research,** vol. 21, p. 202-213, 1995.

RODRIGUES, R. J.; MARQUES, J. M.; CUNHA, R. A. Purinergic signalling and brain development. Seminars in Cell and Developmental Biology, vol. 95, p. 34-41, 2018.

RONDEAU, V. et al. Relation between aluminum concentrations in drinking water and Alzheimer's disease: An 8-year follow-up study. **American Journal of Epidemiology**, vol. 152, p. 59–66, 2000.

RUBINI, P. et al. Increase of intracellular Ca2+ by adenine and uracil nucleotides in human midbrainderived neuronal progenitor cells. **Cell Calcium,** vol. 45, p. 485-498, 2009.

RUMMAN, M.; DHAWAN, J.; KASSEM, M. Concise Review: Quiescence in Adult Stem Cells: Biological Significance and Relevance to Tissue Regeneration. **Stem Cells**, vol. 10, p. 2903-2912, 2015.

SACHDEVA, S.; GUPTA, M. Adenosine and its receptors as therapeutic targets: An overview. *Saudi* **Pharmaceutical Journal**, vol. 21, p. 245-253, 2013.

SÁEZ-ORELLANA, F. et al. ATP leakage induces P2XR activation and contributes to acute synaptic excitotoxicity induced by soluble oligomers of β -amyloid peptide in hippocampal neurons. **Neuropharmacology**, vol. 100, p. 116–123, 2016.

SALOMONI, P.; CALEGARI, F. Cell cycle control of mammalian neural stem cells: Putting a speed limit on G1. **Trends in Cell Biology**, vol. 20, p. 233-243, 2010.

SAVORY, J.; WILLS, M. R. Trace metals: Essential nutrients or toxins. In: **Clinical Chemistry**, vol. 38, p. 1565-1573, 1992.

SCEMES, E.; DUVAL, N.; MEDA, P. Reduced Expression of P2Y1 Receptors in Connexin43-Null Mice Alters Calcium Signaling and Migration of Neural Progenitor Cells. **Journal of Neuroscience**, vol. 23, p. 11444-11452, 2003.

SCHAEFER, U.; JAHREIS, G. Exposure, bioavailability, distribution and excretion of aluminum and its toxicological relevance to humans. **Trace Elements & Electrolytes**, vol. 23, p. 162–172, 2006.

SCHETINGER, M. R. et al. Effects of aluminum chloride on the kinetics of rat cortex synaptosomal ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5). **Biological Trace Element Research**, vol. 50, p. 209-219, 1995.

SEKI, T. et al. Clustering, migration, and neurite formation of neural precursor cells in the adult rat hippocampus. **Journal of Comparative Neurology,** vol. 502, p. 275-290, 2007.

SENG YUE, C. et al. Aluminum toxicokinetics in peritoneal dialysis patients. **Clinical Toxicology**, vol. 49, p. 659-663, 2011.

SHARMA, D. R. et al. Quercetin protects against chronic aluminum-induced oxidative stress and ensuing biochemical, cholinergic, and neurobehavioral impairments in rats. **Neurotoxicity Research**, vol. 23, p. 336–357, 2013.

SHAW, C. A.; TOMLJENOVIC, L. Aluminum in the central nervous system (CNS): Toxicity in humans and animals, vaccine adjuvants, and autoimmunity. **Immunologic Research**, vol. 56, p. 304-316, 2013.

151

SHOHAYEB, B.; DIAB, M.; AHMED, M.; NG, D. C. H. Factors that influence adult neurogenesis as potential therapy. **Translational Neurodegeneration**, vol. 7, p. 1-19, 2018.

SOLINI, A. et al. Increased P2X7 receptor expression and function in thyroid papillary cancer: A new potential marker of the disease? **Endocrinology**, vol. 149, p. 389–396, 2008.

SONI, M. G. et al. Safety evaluation of dietary aluminum. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, vol. 33, p. 66-79, 2001.

SPALDING, K. L. et al. Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans. *Cell*, vol. 153, p. 1219-1227, 2013.

SPIKINGS, E. C.; ALDERSON, J.; ST. JOHN, J. C. Transmission of mitochondrial DNA following assisted reproduction and nuclear transfer. **Human Reproduction Update**, vol. 12, p. 401-415, 2006.

STAHL, T.; TASCHAN, H.; BRUNN, H. Aluminium content of selected foods and food products. **Environmental Sciences Europe**, vol. 23, p. 1-11, 2011.

STOCKWELL, J.; JAKOVA, E.; CAYABYAB, F. S. Adenosine A1 and A2A receptors in the brain: Current research and their role in neurodegeneration. **Molecules**, vol. 22, 2017.

SUSLOV, O. N. et al. Neural stem cell heterogeneity demonstrated by molecular phenotyping of clonal neurospheres. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, vol. 99, p. 14506-14511, 2002.

TIETZ, T. et al. Aggregated aluminium exposure : risk assessment for the general population. Archives of Toxicology, vol. 56, p. 275–281, 2019.

TRUJILLO, C. A. et al. Kinin-B2 receptor activity determines the differentiation fate of neural stem cells. **Journal of Biological Chemistry**, vol. 287, p. 44046-44061, 2012.

ULRICH, H.; ABBRACCHIO, M. P.; BURNSTOCK, G. Extrinsic Purinergic Regulation of Neural Stem/Progenitor Cells: Implications for CNS Development and Repair. **Stem Cell Reviews and Reports,** vol. 8, p. 755-767, 2012.

WANG, L. et al. Effects of aluminium on β -amyloid (1-42) and secretases (APP-cleaving enzymes) in rat brain. **Neurochemical Research**, vol. 39, p. 1338-1345, 2014.

WANG, R. et al. Presenilin 1 familial Alzheimer's disease mutation leads to defective associative learning and impaired adult neurogenesis. **Neuroscience**, vol. 126, p. 305–312, 2004.

WANG, X. et al. Chlorogenic acid protects against aluminium-induced cytotoxicity through chelation and antioxidant actions in primary hippocampal neuronal cells. **Food and Function**, vol. 8, p. 2924-2934, 2017.

WEI, L. C. et al. Nestin-containing cells express glial fibrillary acidic protein in the proliferative regions of central nervous system of postnatal developing and adult mice. **Developmental Brain Research**, vol. 15, p. 9-17, 2002.

WEIHS, A. M. et al. Shock wave treatment enhances cell proliferation and improves wound healing by ATP release-coupled Extracellular signal-regulated Kinase (ERK) activation. **Journal of Biological Chemistry**, vol. 289, p. 27090-27104, 2014.

WEISSMAN, T. A. et al. Calcium waves propagate through radial glial cells and modulate proliferation

in the developing neocortex. Neuron, vol. 43, p. 647-661, 2004.

WHO. Aluminium in drinking-water. Guidelines for Drinking-water Quality, 2010.

WISLET-GENDEBIEN, S.; LEPRINCE, P.; MOONEN, G.; ROGISTER, B. Regulation of neural markers nestin and GFAP expression by cultivated bone marrow stromal cells. **Journal of Cell Science**, vol. 116, p. 3295-3302, 2003.

WOODS, L. T.; AJIT, D.; CAMDEN, J. M.; ERB, L.; WEISMAN, G. A. Purinergic receptors as potential therapeutic targets in Alzheimer's disease. **Neuropharmacology**, vol. 104, p. 169-179, 2016.

YEGUTKIN, G. G. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research,** vol. 1783, p. 673-694, 2008.

YOKEL, R. A. Blood-brain barrier flux of aluminum, manganese, iron and other metals suspected to contribute to metal-induced neurodegeneration. **Journal of Alzheimer's Disease,** vol. 10, p. 223-253, 2006.

YOKEL, R. A. Aluminum. Encyclopedia of Human Nutrition. vol. 2, p. 69-76, 2012.

YOKEL, R. A. et al. Entry, half-life, and desferrioxamine-accelerated clearance of brain aluminum after a single26Al exposure. **Toxicological Sciences**, vol. 64, p. 77–82, 2001.

YOKEL, R. A. Aluminum in Food – The Nature and Contribution of Food Additives. **Food Additive**, vol. 12, p. 203-228, 2012.

YOUNG, S. Z.; TAYLOR, M. M.; BORDEY, A. Neurotransmitters couple brain activity to subventricular zone neurogenesis. **European Journal of Neuroscience**, vol. 33, p. 1123-1132, 2011.

ZATTA, P.; FAVARATO, M.; NICOLINI, M. Deposition of aluminium in brain tissues of rats exposed to inhalational of aluminium acetylacetonate. **NeuroReport**, vol. 4, p. 1119-1122, 1993.

ZHANG, J.; JIAO, J. Molecular Biomarkers for Embryonic and Adult Neural Stem Cell and Neurogenesis. **BioMed Research International**, vol. 2015, p. 1-15, 2015.

ZHANG, H. et al. Aluminum trichloride-induced hippocampal inflammatory lesions are associated with IL-1B-activated IL-1 signaling pathway in developing rats. **Chemosphere**, vol. 203, p. 170-178, 2018.

ZHAO, X.; SHEN, R. Aluminum-Nitrogen interactions in the soil-plant system. Frontiers in Plant Science, vol. 9, p. 1-15, 2018.

ZHU, H. et al. Impairments of spatial memory in an Alzheimer's disease model via degeneration of hippocampal cholinergic synapses. **Nature Communications**, vol. 8, p. 1-13, 2017.

ZIMMERMANN, H. Ectonucleotidases: Some recent developments and a note on nomenclature. In: **Drug Development Research**, vol. 52, p. 44-56, 2001.

ZIMMERMANN, H. Ectonucleotidases in the Nervous System. **Purinergic Signalling in Neuron-Glia Interactions,** vol. 276, p. 113-128, 2008.

ZIMMERMANN, H. Purinergic signaling in neural development. Seminars in cell & developmental biology, vol. 22, no. 2, p. 194–204, 2011.

ANEXOS



Comissão de Ética no Uso de Animais

Universidade Federal de Santa Maria

CERTIFICADO

da

Certificamos que a proposta intitulada "ESTUDO DOS MECANISMOS NEUROBIOLÓGICOS ENVOLVIDOS NA EXPOSIÇÃO AO ALUMÍNIO", protocolada sob o CEUA nº 2712020517, sob a responsabilidade de **Vera Maria Melchiors Morsch** *e equipe; Karine Paula Reichert; Luana Paula Pelinson; Vitor Bastianello Mostardeiro* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (CEUA/UFSM) na reunião de 29/06/2017.

We certify that the proposal "STUDY OF NEUROBIOLOGICAL MECHANISMS INVOLVED IN ALUMINUM EXPOSURE", utilizing 66 Heterogenics mice (50 males and 16 females), protocol number CEUA 2712020517, under the responsibility of **Vera Maria Melchiors Morsch** and team; Karine Paula Reichert; Luana Paula Pelinson; Vitor Bastianello Mostardeiro - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Maria (CEUA/UFSM) in the meeting of 06/29/2017.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: de 05/2017 a 12/2020

Área: Bioquímica E Biologia Molecular

Origem:	Biotério Central UFSM						
Espécie:	Camundongos heterogênicos	sexo:	Fêmeas	idade:	60 a 65 dias	N:	16
Linhagem:	Swiss			Peso:	25 a 30 g		
Origem:	Biotério Central UFSM						
Espécie:	Camundongos heterogênicos	sexo:	Machos	idade:	60 a 65 dias	N:	50
Linhagem:	Swiss			Peso:	25 a 30 g		

Resumo: O Alumínio (Al) é considerado o metal mais abundante na natureza. Desta forma, estamos susceptíveis a uma exposição constante a este elemento. A forma catiônica trivalente do Al é bem conhecida por ser a espécie mais tóxica para os sistemas biológicos. Inclusive, alguns estudos mostram que a concentração de Al em cérebro humano está associada com a etiologia de doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer (DA). O fato de o cérebro ser um órgão muito vulnerável as manifestações tóxicas do Al faz com que este metal possa prejudicar processos envolvidos no desenvolvimento neural como a proliferação e diferenciação celular, favorecendo o aparecimento de demências. A neurotoxicidade do Al se deve em grande parte, ao fato deste metal ter atividade pró-oxidante, potencializando a geração de espécies reativas de oxigênio. Pesquisas sugerem que a neurotransmissão purinérgica também está associada ao desenvolvimento da DA. O presente estudo irá investigar o efeito do Al se deve investigar o efeito do Al so de celulas precursoras neurais, bem como a interação do Al com o sistema purinérgico, a partir de uma possível relação do acúmulo deste metal no desenvolvimento da DA.

Local do experimento: Os animais serão mantidos no biotério setorial da bioquímica, prédio 19, em um ambiente com temperatura controlada $(23^{\circ}C \pm 1)$ e com um ciclo de 12 horas claro/escuro, o ambiente possui 2 exaustores de ar para uma completa renovação do ar interno do biotério. A ração que os animais recebem tem balanceamento de nutrientes essenciais, proteínas, carboidratos e lipídeos, componentes básicos e iguais aos utilizados no biotério central, sendo a água purificada e a ração sólida fornecidas ad libitum. Antes do início do experimento, os animais passarão por um período de adaptação de 10 dias e o fundo das caixas cobertos com maravalha, que após o uso, será descartada como contaminante. Além disso, os animais serão distribuídos em 05 camundongos por caixa, durante todo o período dos tratamentos, e todas as caixas receberão objetos (rolos de papel e/ou PVC) para enriquecimento ambiental.

Santa Maria, 22 de agosto de 2019

Avenida Roraima, 1000, Reitoria, 2º andar - CEP 97105-900 Santa Maria, RS - tel: 55 (55) 3220-9362 / fax: Horário de atendimento: das 8:30 ás 12h e 14h ás 17hs : e-mail: ceua.ufsm@gmail.com CEUA N 2712020517



Comissão de Ética no Uso de Animais

Prof. Dr. Denis Broock Rosemberg Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais Universidade Federal de Santa Maria

Universidade Federal de Santa Maria

Carlo Tacke

da

Prof. Dr. Saulo Tadeu Lemos Pinto Filho Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais Universidade Federal de Santa Maria