



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Alterações dos receptores A1 e A2a da adenosina num modelo animal da doença de Parkinson: Função neuroprotectora?

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular. O trabalho foi realizado sob a orientação científica da Professora Doutora Emilia Duarte (Departamento de Ciências de Vida e Centro de Neurociências e Biologia Celular da Universidade de Coimbra)

Patrícia Celeste Soares Rebelo

2010

Agradecimentos

É com muita satisfação que expresso aqui o mais profundo agradecimento a todos aqueles que tornaram a realização deste trabalho possível. A execução de uma tese não é uma tarefa exclusivamente solitária. Para a sua realização convergem inúmeras vontades que, num esforço colectivo, nos permitem chegar ao fim.

À Professora Doutora Emília Duarte, orientadora desta tese, desejo manifestar o meu profundo agradecimento pelo apoio, incentivo, ensinamentos e disponibilidade demonstrada em todas as etapas que levaram à concretização deste trabalho e não só. O meu muito obrigada!

Gostaria ainda de agradecer, aos meus colegas de laboratório, Gabriel, Joana Vindeirinho, Magda, Joana Salgado, Ana Rita, Patrícia Marques, Bruno Carreira, Inês Morte, Vera, Ana Carvalho, por proporcionarem um excelente ambiente de trabalho. Jamais irão cair no meu esquecimento.

À Diana e à Dona Isabel também não posso deixar de realçar a disponibilidade e ajuda que sempre manifestaram.

Ao Manuel por me ter ajudado na cirurgia estereotáxica, principalmente a anestesiar os animais, à Doutora Inês Araújo pelos seus ensinamentos práticos (perfusão e imunohistoquímica) e à Dra. Luísa Cortes agradeço o auxílio que me deu na microscopia, sem os quais seria impossível realizar parte do meu trabalho.

Aos meus amigos, em especial ao “Fabiano”, o meu mais sincero agradecimento pelo apoio e incentivo incondicional.

Para finalizar, gostaria de expressar um sentimento especial para com a minha família, pais, irmã e cunhado, pelo conforto e a motivação que me deram sempre nos momentos mais difíceis e pelo incentivo recebido ao longo deste tempo.

Do fundo do coração o meu muito obrigada a todas as pessoas aqui mencionadas, pois contribuíram de certa forma para a concretização deste trabalho, estimulando-me intelectual e emocionalmente.

Índice

Abreviaturas.....	V-VI
Resumo	1
Capítulo 1. Introdução	3
1.1 Doença de Parkinson	5
1.1.1 Patogénese da doença de Parkinson	5
1.1.2 Degeneração dos neurónios dopaminérgicos e sintomas motores da doença de Parkinson	9
1.2 Modelos animais da doença de Parkinson	11
1.3 Factor neurotrófico GDNF e neuroprotecção na doença de Parkinson	15
1.4 Receptores de adenosina e doença de Parkinson.....	18
1.4.1 O neurotransmissor adenosina: síntese e metabolismo.....	18
1.4.2 Os receptores de adenosina.....	20
1.4.3 Os receptores de adenosina no controlo motor e neuroprotecção na doença de Parkinson	24
1.4.3.1 Controlo motor pelos receptores de adenosina	24
1.4.3.2 Os receptores de adenosina e a sobrevivência dos neurónios dopaminérgicos em modelos da doença de Parkinson	26
1.5 Objectivos do trabalho.....	28
Capítulo 2. Material e Métodos	29
2.1 Modelos biológicos	31
2.1.1 Modelo animal da doença de Parkinson induzido pela 6-OHDA	31
2.1.2 Culturas primárias de neurónios da <i>substantia nigra</i>	32
2.1.2.1 Cultura de astrócitos do encéfalo médio	33
2.1.1.2 Co-cultura de neurónios da <i>substantia nigra</i>	35
2.2 Imunohistoquímica	35
2.2.1 Imunohistoquímica com revelação pelo método DAB-peroxidase	36
2.2.2 Imunofluorescência	37
2.3 Imunocitoquímica	39
2.4 Análise de catecolaminas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC, <i>High Performance Liquid Chromatography</i>)	40
2.4.1 Preparação das amostras	40

2.4.2 HPLC	41
2.5 Análise de proteínas por electroforese e <i>Western blotting</i>	42
2.5.1 Preparação das amostras	42
2.5.2 Electroforese, electrotransferência e revelação da membrana	43
Capítulo 3. Resultados	46
3.1 Lesão dos neurónios dopaminérgicos nigra-estriatais induzida por injeção estereotáxica de 6-OHDA no estriado	48
3.1.1 Injeção única de 6-OHDA no estriado dorsal	48
3.1.2 Injeção dupla de 6-OHDA no estriado dorsal	52
3.2 Efeito da lesão da via nigra-estriatal na expressão dos receptores A2a da adenosina	56
3.3 Efeito da lesão da via nigra-estriatal na expressão dos receptores A1 da adenosina	63
3.4 Efeito da lesão da via nigra-estriatal na expressão do factor neurotrófico GDNF	67
3.5 Efeito de ligandos dos receptores da adenosina na protecção de neurónios dopaminérgicos em culturas de células da <i>substantia nigra</i>	68
Capítulo 4. Discussão	72
4.1 Um modelo animal da doença de Parkinson em rato: degeneração dos neurónios dopaminérgicos nigra-estriatais induzida por 6-OHDA	74
4.2 A lesão dos neurónios dopaminérgicos aumentou a expressão dos receptores A2a no estriado	76
4.3 A lesão dos neurónios dopaminérgicos aumentou a expressão dos receptores A1 no estriado e na <i>substantia nigra</i>	79
4.4 Lesão dos neurónios dopaminérgicos nigra-estriatais e expressão de GDNF	81
4.5 Os receptores A1 e A2a da adenosina e a protecção dos neurónios dopaminérgicos em modelos da doença de Parkinson	82
Capítulo 5. Conclusões	86
Referências	90

Abreviaturas

AC – adenilciclase

ADA – adenosina desaminase

AK – adenosina cinase

CPu – caudado-putamen

DAT – transportador de dopamina (*dopamine transporter*)

DPCPX – 8-ciclopentil-1,3-dipropilxantina

DOPAC – ácido 3,4-dihidroxi-fenilacético

GABA – ácido γ -aminobutírico

GDNF – factor neurotrófico derivado duma linha celular de células da glia (*Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor*)

GFR- α – receptor α de ligandos da família do GDNF (*GDNF family receptor α*)

GPI – globo pálido interno

GPe – globo pálido externo

HVA – ácido 3-metoxi-4-hidroxi-fenilacético

KW-6002 – *istradefylline*

L-DOPA – L-3,4-di-hidroxi-fenilalanina

MAO – monoamina-oxidase

MFB – feixe cerebral medial (*medial forebrain bundle*)

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

MPDP⁺ – 1-metil-4-fenil-2,3-diidropiridina

MPP⁺ – 1-metil-4-fenilpiridina

NET – transportador membranar de noradrenalina (*norepinephrine transporter*)

ROS – espécies reactivas de oxigénio (*reactive oxygen species*)

SAH – S-adenosilhomocisteína

SAHH – S-adenosilhomocisteína hidrolase

SNC – sistema nervoso central

TH – tirosina hidroxilase

VMAT-2 – transportador vesicular 2 de monoaminas (*vesicular membrane amine transporter-2*)

VTA – área tegmental ventral

6-OHDA – 6-hidroxidopamina

Resumo

Os receptores A2a da adenosina são actualmente considerados um alvo terapêutico na doença de Parkinson pois, devido à co-localização e interacção funcional com os receptores D2 da dopamina nos neurónios do estriado, a modulação com antagonistas A2a tem um efeito compensatório do défice de dopamina causado pela degeneração dos neurónios dopaminérgicos que projectam da *substantia nigra* para o estriado, melhorando a disfunção motora. Por outro lado, os antagonistas dos receptores A2a também mostraram efeitos neuroprotectores contra a degeneração dopaminérgica induzida por toxinas em modelos animais da doença de Parkinson, um efeito atribuído à inibição de mecanismos neuro-inflamatórios. No entanto, a activação dos receptores A2a é requerida para alguns efeitos do GDNF (*Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor*), um factor neurotrófico amplamente reconhecido como protector e indutor da regeneração dos neurónios dopaminérgicos. O nosso grupo mostrou recentemente que a lesão selectiva dos neurónios dopaminérgicos em culturas de células da *substantia nigra* pode induzir o aumento da expressão de GDNF em astrócitos.

No presente estudo utilizámos um rato modelo da doença de Parkinson, induzido pela injeção de 6-hidroxidopamina (6-OHDA) no estriado, para investigar a relação entre receptores da adenosina, expressão de GDNF e protecção dos neurónios dopaminérgicos. Em estudos de imunohistoquímica após a lesão da via nigra-estriatal, observámos um aumento significativo da expressão dos receptores A2a em astrócitos no estriado, particularmente em astrócitos que proliferaram nas zonas de transição entre zonas lesadas e zonas não afectadas. A observação, também nestas zonas, do aumento da expressão da tirosina hidroxilase (TH), um marcador dos terminais dopaminérgicos, sugere uma relação entre aumento dos receptores A2a e sobrevivência dos neurónios dopaminérgicos, e não apoia a ideia de que a activação dos receptores A2a em situações de lesão é deletéria para a sobrevivência dos

neurónios dopaminérgicos. No entanto, em estudos preliminares em culturas de células da *substantia nigra*, observámos que a inibição dos receptores A2a teve efeitos protectores na sobrevivência dos neurónios dopaminérgicos contra a toxicidade da 6-OHDA. Nos estudos *in vivo* não observámos aumento da expressão de GDNF, avaliados por *Western blot* em extractos proteicos do estriado.

No rato modelo da doença de Parkinson, observámos também um aumento marcado dos receptores A1 da adenosina no estriado, em terminais dopaminérgicos e em corpos celulares que expressam TH. A aquisição de fenótipo dopaminérgico por neurónios GABAérgicos do estriado lesado foi descrito por outros investigadores, e o nosso trabalho sugere que estes neurónios expressam também receptores A1 da adenosina. Observámos também que a degeneração da via nigra-estriatal está associada ao aumento da expressão dos receptores A1 na *substantia nigra* em neurónios não-dopaminérgicos cujos corpos celulares estão segregados dos corpos celulares dopaminérgicos nas regiões dendríticas da *substantia nigra pars reticulata*.

Em conclusão, os nossos resultados num modelo animal da doença de Parkinson mostram que a lesão dos neurónios dopaminérgicos pode induzir o aumento da expressão dos receptores A2a da adenosina em astrócitos, e dos receptores A1 em terminais dopaminérgicos no estriado, em zonas de transição da lesão, onde parecem ocorrer tentativas de reparação evidenciadas pelo aumento da expressão da TH. Embora os resultados não provem uma relação entre a expressão dos receptores da adenosina e protecção dos neurónios dopaminérgicos, os nossos resultados não apoiam a ideia de que a activação dos receptores A2a contribua para a degeneração dopaminérgica.

Palavras-chave: Doença de Parkinson, GDNF, 6-hidroxidopamina, neuroprotecção, receptores de adenosina.

Capítulo 1

Introdução

1.1 Doença de Parkinson

A doença de Parkinson é uma patologia neurodegenerativa crónica e progressiva que afecta 1 a 2% da população com mais de 65 anos de idade (Moore et al, 2005; Savitt et al, 2006). A seguir à doença de Alzheimer, a doença de Parkinson é a segunda doença neurodegenerativa associada ao envelhecimento de maior prevalência (Bartels et al, 2009).

Os sinais clínicos da doença de Parkinson foram descritos pela primeira vez em 1817 por James Parkinson na monografia "*Essay on the Shaking Palsy*". Porém, apenas em 1920, Jean Martin Charcot reconheceu o pioneirismo de James Parkinson na descrição da paralisia agitante denominando-a como doença de Parkinson em sua homenagem (Burch e Sheerin, 2005; Lees et al, 2009). Após quase dois séculos da identificação da doença de Parkinson, a sua patogénese ainda não é completamente entendida.

Os principais sintomas desta doença incluem a lentidão dos movimentos, acinesia, rigidez muscular, tremor em repouso, instabilidade postural, distúrbios no equilíbrio e na marcha, micrografia e perda da expressividade facial. Porém, os doentes de Parkinson podem ainda apresentar outra sintomatologia como, por exemplo, alterações do sono e deficiências severas de memória, do pensamento abstracto e da linguagem (Bartels et al, 2009).

1.1.1 Patogénese da doença de Parkinson

Patologicamente, a doença de Parkinson caracteriza-se por uma perda de neurónios dopaminérgicos na *substantia nigra pars compacta* e pela presença de inclusões intracelulares denominadas corpos de *Lewy*, que se acumulam em neurónios que sofrem degeneração. Os corpos de *Lewy* são agregados intracitoplasmáticos eosinofílicos compostos por uma variedade de proteínas, incluindo α -

sinucleína, parkina, ubiquitina e neurofilamentos (revisão por Dauer e Przedorski, 2003).

A degeneração da via nigra-estriatal, constituída por neurónios dopaminérgicos cujos corpos celulares se localizam na *substantia nigra pars compacta* e que projectam para o estriado, leva à redução dos níveis de dopamina nos gânglios da base, principalmente no putamen (figura 1). Os gânglios da base são um grupo de núcleos subcorticais envolvidos no controlo dos movimentos voluntários. São constituídos pelo estriado (que inclui o núcleo caudado e o putamen), pelo globo pálido interno e externo, núcleo subtalâmico e *substantia nigra pars compacta* e *pars reticulata* (Obeso et al, 2008).

Correlações entre análises clínicas e bioquímicas mostram que os sintomas característicos da doença de Parkinson começam a aparecer após uma depleção de aproximadamente 80% da dopamina estriatal, e quando a perda neuronal dopaminérgica da *substantia nigra pars compacta* já está entre 50 – 70% (Blum et al, 2001; Dauer e Przedborski, 2003; von Bohlen e Halbach, 2005). Isto demonstra a existência de mecanismos compensatórios, que fornecem um nível razoável de dopamina ao estriado mesmo após uma grande perda de neurónios dopaminérgicos. Assim, o diagnóstico da doença de Parkinson só pode ser feito após algum tempo do início da doença. De acordo com alguns estudos histológicos, em fases avançadas da doença de Parkinson podem ocorrer mudanças noutros sistemas neuroquímicos tais como, noradrenérgicos, serotoninérgicos e colinérgicos responsáveis por sintomas não motores da doença de Parkinson (Dauer e Przedborski, 2003).

A etiologia da doença de Parkinson, assim como a de outras doenças neurodegenerativas, não é ainda bem conhecida. Embora a doença de Parkinson possa ocorrer devido a mutações genéticas, esta forma de patologia é relativamente rara. Actualmente acredita-se que a doença de Parkinson seja resultante de uma

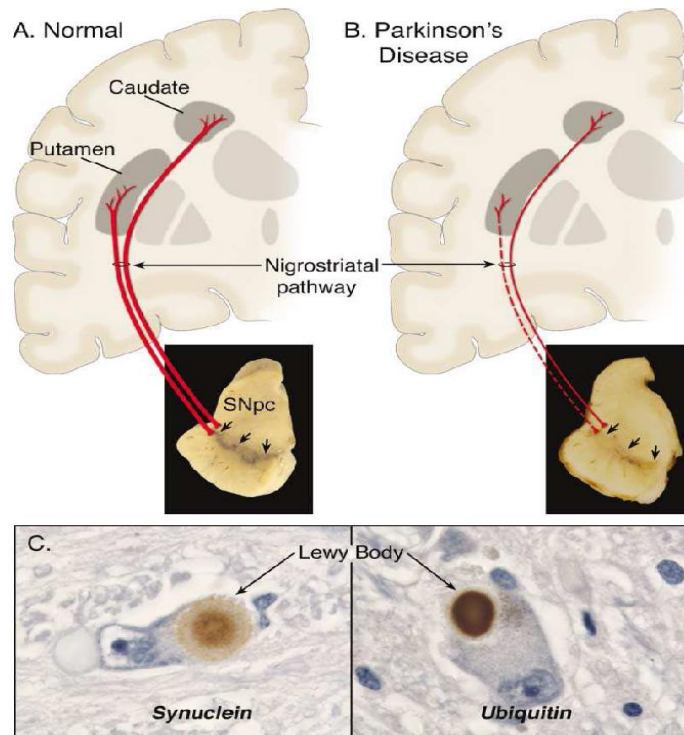


Figura 1. Representação esquemática da via nigra-estriatal normal (A) e da sua degeneração na doença de Parkinson (B). Em C mostra-se a marcação de inclusões intracelulares (corpos de Lewy) em neurónios dopaminérgicos na *substantia nigra pars compacta* com anticorpos contra α -sinucleína e a ubiquitina (Dauer e Przedorski, 2003).

combinação da susceptibilidade genética associada a uma exposição ambiental. Estima-se que aproximadamente 90% dos casos da doença de Parkinson sejam idiopáticos, enquanto que os restantes 10% são formas familiares, associadas à ocorrência de mutações em vários genes (revisão por Moore et al, 2005). Foram identificadas mutações causadoras de doença de Parkinson na α -sinucleína, uma proteína sináptica que pode interagir com a membrana das vesículas sinápticas, numa proteína do sistema ubiquitina-proteossoma a que foi dado o nome de parkina, numa cinase mitocondrial chamada PINK-1, na proteína chaperão DJ-1 envolvida na protecção celular contra o stress oxidativo, e ainda noutras proteínas (revisões por Moore et al, 2005; Savitt et al, 2006). Apesar das diferentes funções destas proteínas,

as mutações convergem numa patologia comum: a degeneração selectiva dos neurónios dopaminérgicos.

A primeira toxina exógena identificada como causadora de doença de Parkinson foi a 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), um contaminante da síntese de um opiáceo que levou ao desenvolvimento da doença em vários jovens e permitiu identificar uma das causas possíveis da doença de Parkinson (descrito por Dauer e Przedorski, 2003). Um metabolito da MPTP, a 1-metil-4-fenilpiridina (MPP⁺), é um inibidor do complexo I mitocondrial. Outros contaminantes ambientais como o herbicida paraquat, que é similar estruturalmente ao MPP⁺, e o insecticida rotenona, são toxinas mitocondriais. A exposição a estes pesticidas está associada ao aumento da prevalência da doença de Parkinson (Bossy-Wetzel et al, 2004; Gorell et al, 2004).

Outra possibilidade para a causa da doença de Parkinson, além das hipóteses genética e ambiental, é a neurodegeneração provocada por toxinas endógenas. A própria dopamina pode desempenhar um papel fundamental na patogénese da doença de Parkinson. A oxidação da dopamina pela monoamina-oxidase, MAO (figura 2), leva à formação de peróxido de hidrogénio (H₂O₂). Se o peróxido de hidrogénio não for removido, os seus níveis aumentam e o excesso de peróxido pode reagir com Fe²⁺ e formar o radical hidroxilo (OH[•]), um dos principais mediadores do dano oxidativo (Schulz e Falkenburger, 2004). A auto-oxidação da dopamina produz H₂O₂ e quinonas altamente reactivas que podem modificar e inactivar proteínas na célula e contribuir para a neurodegeneração (revisão por Hald e Lotharius, 2005). A toxicidade da própria dopamina poderá explicar a degeneração selectiva dos neurónios dopaminérgicos induzida por toxinas mitocondriais ou mutações proteicas.

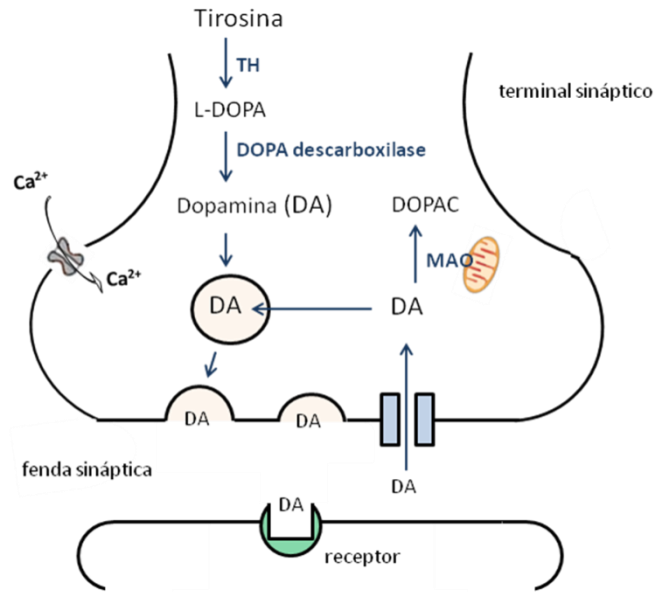


Figura 2. Síntese e degradação metabólica da dopamina. Esta catecolamina é sintetizada nos terminais dos neurónios dopaminérgicos a partir do aminoácido tirosina. A tirosina é convertida em L-3,4-di-hidroxiifenilalanina (L-DOPA) pela enzima tirosina hidroxilase (TH). A L-DOPA, por sua vez, é convertida em DA por uma descarboxilase específica (DOPA descarboxilase). A DA é armazenada nas vesículas sinápticas para onde é transportada num processo dependente do gradiente de pH estabelecido por uma proteína presente na membrana da vesícula; A DA pode ser degradada quer na fenda sináptica quer no terminal pré-sináptico. A monoamina-oxidase (MAO), presente na membrana externa da mitocôndria, converte a DA em DOPAC (ácido 3,4-di-hidroxiifenilacético).

1.1.2 Degeneração dos neurónios dopaminérgicos e sintomas motores da doença de Parkinson

A dopamina actua em cinco tipos de receptores associados a proteínas G, que podem ser divididos em duas famílias: os receptores D1 (subtipos D1 e D5) e os D2 (subtipos D2, D3 e D4) de acordo com as suas propriedades funcionais, farmacológicas e homologia da sequência proteica. A família dos receptores D1 está positivamente acoplada à adenil ciclase (AC), enquanto que a família D2 está negativamente acoplada à AC. Os receptores pré-sinápticos incluem os receptores do tipo D2, e os pós-sinápticos incluem os receptores do tipo D1 e D2. Nos gânglios da base, os receptores D1 encontram-se principalmente nos neurónios estriatais

GABAérgicos que projectam para o globo palidus interno (GPi) e *substantia nigra pars reticulata* (via directa), enquanto que os receptores D2 se encontram principalmente localizados nos neurónios GABAérgicos estriato-palidais (via indirecta) (revisão por Schwarzschild et al, 2006). Na via directa, neurónios GABAérgicos no estriado (identificados por expressarem dinorfinas), estimulados por aferentes glutamatérgicos provenientes de regiões associativas do córtex, vão inibir neurónios GABAérgicos do GPi, desinibindo assim os neurónios talâmicos que estimulam o córtex motor. A via indirecta, constituída por aferentes do córtex, por neurónios GABAérgicos do estriado (que co-expressarem encefalinas) e do globo pálido externo (GPe), e por neurónios glutamatérgicos de núcleos subtalâmicos, exerce uma acção inibitória na via directa (figura 3). A actividade das vias directa e indirecta é também controlada pelos neurónios dopaminérgicos provenientes da *substantia nigra pars compacta*. A dopamina, actuando em receptores D1 nas dendrites dos neurónios GABAérgicos da via directa, tem efeitos estimuladores da actividade motora que são diminuídos pela degeneração dopaminérgica na doença de Parkinson. Por outro lado, os neurónios GABAérgicos da via indirecta expressam receptores D2, pelo que a dopamina normalmente tem o efeito de diminuir a actividade da via indirecta. Deste modo, o défice de dopamina no estriado na doença de Parkinson diminui a actividade da via directa e aumenta a actividade da via indirecta, sendo responsável pela dificuldade na iniciação e pela lentidão de movimentos.

Os défices motores observados na doença de Parkinson são devidos a um desequilíbrio na actividade das vias directa e indirecta dos gânglios da base causada pela perda dos neurónios dopaminérgicos. Assim sendo, a reposição da dopamina é a principal abordagem para se tratar os sintomas motores da doença de Parkinson através do uso de agonistas dos receptores dopaminérgicos e/ou L-DOPA (Chen

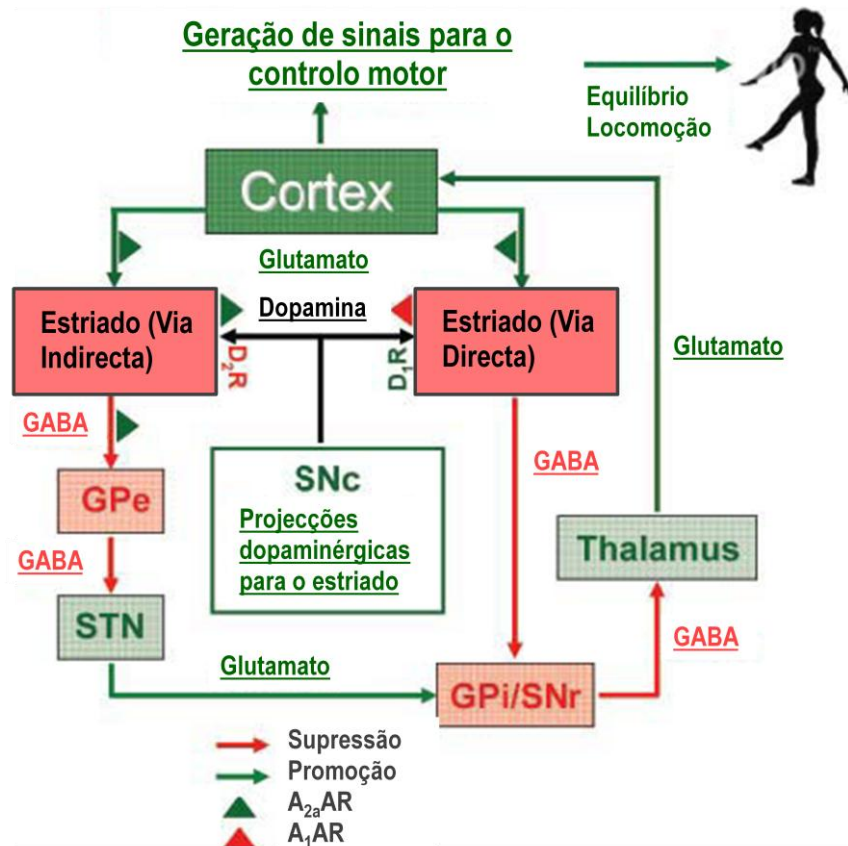


Figura 3. Representação esquemática dos circuitos dos gânglios da base (via directa e indirecta) responsáveis pela regulação motora. GPe, globo pálido externo; GPi/SNr, globo pálido interno/substantia nigra pars reticulata; STN, núcleos subtalâmicos; SNc, substantia nigra pars compacta. (adaptado de Xie et al, 2007)

et al, 2005). Contudo, o tratamento com L-DOPA a longo prazo pode desencadear dâscinesias.

1.2 Modelos animais da doença de Parkinson

A doença de Parkinson é exclusiva da espécie humana, não se manifesta espontaneamente em animais (Gerlach e Riederer, 1996; Lee et al, 1996; Uversky, 2004), mas a patologia pode ser induzida em roedores e primatas através da administração de agentes neurotóxicos, como a 6-hidroxidopamina (6-OHDA) ou o MPTP (Gerlach e Riederer, 1996) que causam lesão selectiva da via nigra-estriatal. Os modelos por lesão neurotóxica são muito usados por serem facilmente reprodutíveis e de custo menor do que os modelos genéticos, por exemplo murganhos transgênicos

que expressam formas mutadas da α -sinucleína (revisão por Dauer e Przedborski, 2003). Os modelos animais reflectem as características da doença presente no Homem, simulando as alterações patológicas, histológicas e bioquímicas da doença, bem como os seus distúrbios funcionais (revisão por Dauer e Przedborski, 2003).

A 6-OHDA foi a primeira substância química usada com o objectivo de produzir efeitos neurotóxicos específicos nas vias catecolaminérgicas, nomeadamente, nos neurónios dopaminérgicos (Betarbet et al, 2002; Emborg, 2004; Sánchez et al, 2005), sendo um dos modelos mais utilizados da doença de Parkinson, tanto *in vitro* como *in vivo* (Blum et al, 2001, Schober, 2004). A selectividade deve-se à semelhança estrutural com as catecolaminas e alta afinidade pelos transportadores membranares da dopamina (DAT) e da noradrenalina (NET).

Como a 6-OHDA não atravessa a barreira hemato-encefálica, para destruir a via nigra-estriatal não pode ser administrada sistemicamente, tem de ser administrada intra-cerebralmente através de injeção estereotáxica. Para induzir a degeneração dos neurónios dopaminérgicos, a 6-OHDA pode ser injectada no estriado, na *substantia nigra* ou no feixe cerebral medial (MFB, *medial forebrain bundle*; Blum et al, 2001). Quando a injeção é realizada no estriado, a toxina exerce primeiro um efeito tóxico directo nos terminais e axónios dos neurónios dopaminérgicos nas áreas circundantes à injeção, seguido de uma perda gradual dos neurónios da via nigra-estriatal que projectam para a zona afectada, produzindo deste modo uma degeneração retrógrada dos neurónios dopaminérgicos da *substantia nigra* (Dauer e Przedborski, 2003). Este método gera uma lesão parcial que progride lentamente ao longo de semanas, facto este que simula a neurodegeneração progressiva dos neurónios dopaminérgicos na doença de Parkinson (Beal, 2001).

A administração de 6-OHDA na *substantia nigra* promove uma destruição imediata e quase completa dos neurónios dopaminérgicos da *substantia nigra pars compacta*, e uma lesão menos extensa dos neurónios da área tegmental ventral

(VTA), resultando na depleção de dopamina no estriado (cerca de 80-90%). Este método produz um modelo da fase severa e avançada da doença de Parkinson, usado para investigar novas estratégias terapêuticas, como o implante de células e terapia génica (Beal, 2001; Deumens et al, 2002).

Lesões unilaterais com 6-OHDA no MFB destroem os neurónios da *substantia nigra pars compacta* (A9) e da VTA (A10) e resultam na perda quase total de dopamina no caudado e putamen, supersensibilidade dos receptores dopaminérgicos pós-sinápticos no caudado e putamen ipsilateral, e originam comportamento de rotação unilateral em resposta a agentes dopaminérgicos (Deumens et al, 2002).

Os animais lesados bilateralmente com 6-OHDA mostram os sintomas motores parkinsonianos, mas a lesão bilateral não é um modelo comum porque causa uma grande mortalidade dos ratos. O modelo mais usado é a administração unilateral de 6-OHDA, que permite a comparação das alterações no hemisfério cerebral lesado (ipsilateral) com o intacto (contralateral), fornecendo desta maneira um controlo interno da lesão, e constituindo um modelo de hemiparkinsonismo (Betarbet et al, 2002).

Curiosamente, existem algumas evidências de que a 6-OHDA pode ser um metabolito endógeno e neurotóxico da dopamina que causa e/ou contribui para a doença de Parkinson. Como os neurónios da via dopaminérgica contêm níveis elevados de dopamina, H_2O_2 e Fe^{2+} , uma reacção não-enzimática poderá levar à formação de 6-OHDA. A geração deste metabolito pode ser também favorecida pela melanina, que pode aumentar os níveis de Fe^{2+} pela deslocação da ferritina- Fe^{3+} , e assim amplificar a reacção entre a dopamina e os iões de Fe (Blum et al, 2001).

Vários estudos, *in vivo* e *in vitro*, demonstraram que a 6-OHDA se acumula no citoplasma, e é capaz de produzir stress oxidativo pela geração de espécies reactivas de oxigénio (ROS) como o H_2O_2 e o radical hidroxil (OH^{\cdot}) (Orth et al, 2003; Schober, 2004). As ROS são produzidas principalmente por mecanismos de desaminação pela MAO, auto-oxidação e o aumento dos níveis de Fe^{3+} pela reacção de Fenton

($\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{OH}^- + \text{OH}^\cdot + \text{Fe}^{3+}$). Subsequentemente, o stress oxidativo promove a peroxidação lípidica, a desnaturação proteica, danos no DNA e desorganização do citoesqueleto. A neurotoxicidade da 6-OHDA também tem sido associada com o facto de esta interagir directamente com a cadeia respiratória mitocondrial, inibindo o complexo I (figura 4) (Blum et al, 2001).

Além dos modelos *in vivo*, a 6-OHDA também tem sido usada numa vasta gama de modelos neuronais *in vitro*, incluindo linhas celulares de neuroblastoma humano, células PC12 (Hanrott et al, 2006), e em culturas neuronais primárias (Saavedra et al, 2006; Nobre et al, 2010).

A neurotoxina MPTP também é usada em murganhos e primatas não humanos para criar um modelo já validado da doença de Parkinson, mas apresenta algumas limitações (Iancu et al, 2005). A administração de MPTP provoca uma síndrome parkinsoniana bilateral, o que limita os testes comportamentais da disfunção motora que tiram partido de lesões unilaterais. Além disso, a recuperação espontânea dos sintomas parkinsonianos ocorre tanto em primatas como em murganhos após lesão com MPTP, o que impede a avaliação dos efeitos terapêuticos de fármacos (Iancu et al, 2005).

A MPTP, por ser um composto altamente lipofílico, pode ser administrada sistemicamente pois atravessa facilmente a barreira hematoencefálica, atingindo rapidamente o SNC (figura 4). Uma vez no encéfalo, a MPTP é convertida pela monoamina oxidase tipo B (MAO-B), dentro das células gliais e dos neurónios serotoninérgicos, em 1-metil-4-fenil-2,3-diidropiridina (MPDP⁺), a qual posteriormente é metabolizada no metabolito activo MPP⁺. A MPP⁺ é transportada para o interior das células dopaminérgicas pelo transportador DAT. Dentro dos neurónios, a MPP⁺ pode seguir três rotas: (1) na mitocôndria pode inibir o complexo I, o que interrompe a transferência de electrões para a ubiquinona, aumentando a produção de ROS, e diminui a síntese de ATP; (2) pode ligar-se ao transportador vesicular 2 de monoaminas (VMAT-2) e ser translocada para dentro das vesículas, o que sequestra

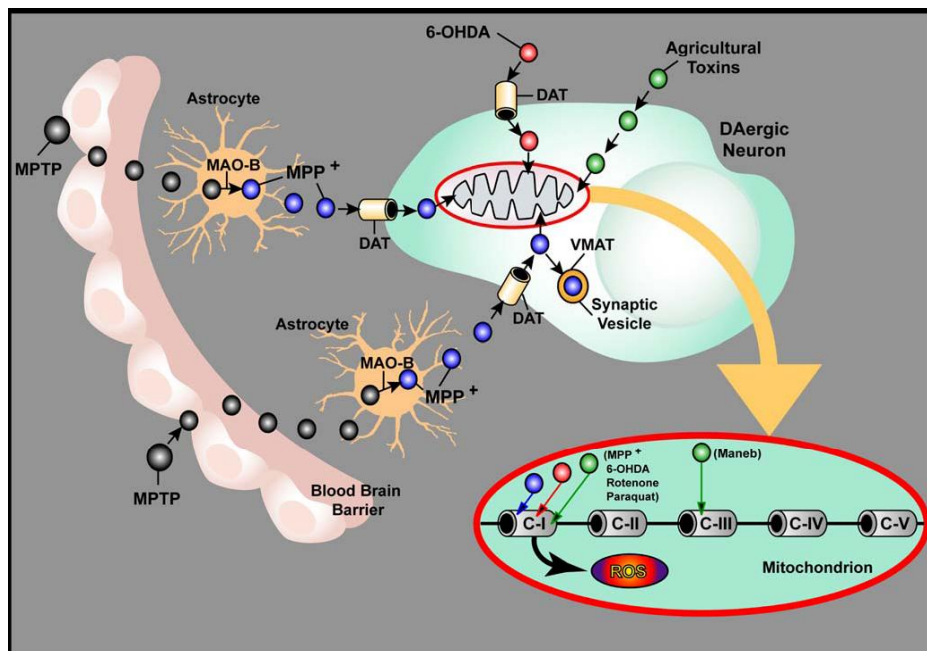


Figura 4. Mecanismos de acção das neurotoxinas dopaminérgicas 6-OHDA e MPTP utilizadas para criar modelos animais da doença de Parkinson. Ver texto para descrição dos mecanismos. (Shober et al, 2004).

a MPP⁺ prevenindo o seu acesso à mitocôndria e pode proteger as células da neurodegeneração induzida por MPTP; (3) pode permanecer no citoplasma, interagindo com enzimas citosólicas, especialmente as que são carregadas negativamente (revisões por Dauer e Przedborski, 2003; Shober et al, 2004; Emborg, 2004).

1.3 Factor neurotrófico GDNF e neuroprotecção na doença de Parkinson

As terapias farmacológicas actualmente disponíveis para a doença de Parkinson têm como objectivo compensar o défice de dopamina no estriado e melhorar os sintomas motores. Como a doença de Parkinson é uma patologia progressiva, é importante desenvolver terapias neuroprotectoras para retardar ou parar a neurodegeneração, e os factores neurotróficos são potenciais candidatos. Os

factores neurotróficos são proteínas que regulam a sobrevivência e a diferenciação dos neurónios durante o desenvolvimento do sistema nervoso. No adulto têm funções de manutenção celular e na resposta à lesão, e estão envolvidos na plasticidade neuronal.

O GDNF parece ser o factor neurotrófico mais potente na protecção dos neurónios dopaminérgicos nigra-estriatais. O GDNF foi identificado e isolado pela primeira vez a partir do meio de cultura duma linha celular glial, com base na sua capacidade para promover a sobrevivência de neurónios dopaminérgicos embrionários *in vitro*, de aumentar o comprimento dos prolongamentos e o tamanho celular (Lin et al, 1993). Em modelos animais da doença de Parkinson, a administração no estriado ou intracerebroventricular de GDNF (uma vez que sendo uma proteína não atravessa a barreira hemato-encefálica) mostrou exercer efeitos protectores nos neurónios dopaminérgicos como a degeneração induzida por MPTP em primatas, ou por 6-OHDA em ratos (revisão por Saavedra et al, 2008). Além disso, a administração de GDNF após a lesão induziu aumento dos marcadores dopaminérgicos e a recuperação motora, indicando que o GDNF tem efeitos protectores e regenerativos. No entanto, o seu uso terapêutico é limitado pelas dificuldades de acesso ao SNC. Uma possível estratégia é estimular a expressão endógena de GDNF.

No cérebro adulto normal, a expressão de GDNF é principalmente neuronal. No sistema nigra-estriatal, o GDNF é sintetizado no estriado e transportado retrogradamente pelos neurónios dopaminérgicos para a *substantia nigra* (Barroso-Chinea et al, 2005). Em situações de lesão, astrócitos e microglia são a principal fonte de factores neurotróficos. O nosso grupo mostrou que a lesão selectiva dos neurónios dopaminérgicos induzida por H₂O₂, ou L-DOPA em culturas de células da *substantia nigra* pode promover o aumento da expressão de GDNF por astrócitos (Saavedra et al, 2006), e que a sinalização entre neurónios danificados e astrócitos envolve a interleucina-1 β (IL-1 β) levando ao aumento da produção de GDNF (Saavedra et al, 2007). Outra substância que poderá induzir a expressão de GDNF em condições de

lesão neuronal é a adenosina, uma vez que foi demonstrado que os receptores A2b estimulam a expressão de GDNF em culturas primárias de astrócitos (Yamagata et al, 2007) e se sabe que a concentração extracelular de adenosina aumenta após lesão neuronal, como irá ser descrito na secção seguinte. As células da microglia, normalmente consideradas como potenciadoras da neurodegeneração, também produzem GDNF, e foi demonstrado que podem estar envolvidas na reparação neuronal após lesão (revisão por Saavedra et al, 2008).

Em modelos animais, não foi detectada alteração de expressão de GDNF após injeções de 6-OHDA (Smith et al, 2003), ou tratamento com MPTP (Inoue et al, 1999), mas outros estudos mostraram que a resposta neurotrófica a uma lesão depende da idade dos animais (Collier et al, 2005). Em geral, animais mais novos mostram uma maior capacidade em regular o aumento dos factores neurotróficos (Yurek e Fletcher-Turner, 2001; Collier et al, 2005). Mais recentemente, dois grupos relataram aumento da expressão de GDNF no estriado após lesão com 6-OHDA (Kato-Semba et al, 2007; Sanchez et al, 2008).

O GDNF liga-se a um complexo receptor heterodimérico que compreende uma subunidade de ligação, o receptor α de ligandos da família do GDNF (GFR- α), e uma subunidade transmembranar Ret que é uma cinase de resíduos de tirosina (revisão por Bessalov e Saarma, 2007). Os efeitos neuroprotectores e regenerativos do GDNF são mediados pelo aumento da actividade de enzimas anti-oxidantes, de enzimas e co-factores necessários para a síntese de dopamina, e pela indução de factores anti-apoptóticos e moléculas de adesão celular (revisão por Duarte et al, 2007).

1.4 Receptores de adenosina e doença de Parkinson

1.4.1 O neurotransmissor adenosina: síntese e metabolismo

A adenosina é um nucleosídeo constituído pela base purínica adenina ligada a ribose. Está presente em todas as células, onde desempenha um papel central como elemento estrutural dos ácidos nucleicos e no metabolismo energético, modulando diversos processos fisiológicos. A adenosina actua também como mensageiro intercelular, embora não seja considerada um neurotransmissor clássico, uma vez que não existem evidências para a acumulação em vesículas sinápticas ou libertação sensível ao potencial de acção (revisões por Ribeiro et al, 2003; Cunha, 2005).

Os efeitos mais importantes da adenosina são descritos nos sistemas cardiovascular e nervoso. No tecido cardíaco, a adenosina participa na regulação da vasodilatação e redução da pressão cardíaca (Sato et al, 2005). No SNC, a adenosina está envolvida na promoção e manutenção do sono, no controlo da circulação cerebral (Latini e Pedata, 2001), na modulação da excitabilidade neuronal e ainda exerce um efeito neuroprotector em situações patológicas como hipóxia, isquémia e stress oxidativo (Cunha, 2001; Xu et al, 2005). Além dos efeitos directos mediados pelos receptores de adenosina, a adenosina também modula a acção de outros neurotransmissores através da formação de oligómeros com os receptores de outros neurotransmissores (discutido mais à frente). A adenosina foi, portanto, considerada um “*fine tuner*” (Sebastião e Ribeiro, 2009).

A biossíntese do neurotransmissor adenosina pode ocorrer no meio intracelular ou no extracelular, através de uma cascata hidrolítica do fosfato 5' de adenosina sob a acção de enzimas da família das 5'-nucleotidasas (figura 5). Existem, em tecidos de mamíferos, pelo menos quatro formas diferentes da enzima 5'-nucleotidase, que apresentam propriedades moleculares e bioquímicas distintas, sendo duas delas ectoenzimas ancoradas à membrana, e duas enzimas solúveis (Zimmermann, 1992). Intracelularmente, a adenosina pode ser sintetizada a partir do AMP derivado do ADP,

cuja disponibilidade na célula depende da sua reutilização na síntese de ATP. Deste modo, a síntese de adenosina reflecte o estado metabólico da célula. A adenosina pode também ser produzida intracelularmente através da hidrólise da S-adenosilhomocisteína (SAH) pela enzima S-adenosilhomocisteína hidrolase (SAHH). A reacção catalisada pela SAHH é reversível, podendo formar adenosina e homocisteína, ou utilizar adenosina na síntese de SAH.

No espaço extracelular, a síntese de adenosina pode ocorrer pela actividade da enzima ecto-5'-nucleotidase que converte 5'-AMP em adenosina. Por sua vez, o 5'-AMP pode ser produzido principalmente por duas vias: pela degradação de nucleotídeos, como o ATP, que é libertado na fenda sináptica por neurónios e por células da glia, ou também pela libertação de AMPc. O ATP é co-libertado na fenda sináptica juntamente com outros neurotransmissores (acetilcolina, glutamato, noradrenalina, serotonina ou GABA) com os quais é armazenado nas vesículas sinápticas (Zimmermann, 2007; Burnstock, 2004, 2007). O AMPc produzido intracelularmente pode ser libertado por um transportador e convertido no meio extracelular em 5'AMP por uma ecto-fosfodiesterase.

Os níveis de adenosina intra- e extracelular são regulados através do seu transporte bidireccional. Os transportadores são classificados em dois grupos: transportadores equilibrativos, que transportam a adenosina de acordo com o seu gradiente de concentração, e os transportadores concentrativos, dependentes de Na^+ , que transportam a adenosina contra o seu gradiente de concentração (revisão por Fredholm et al, 2007).

A adenosina pode ser metabolizada intracelularmente em AMP pela adenosina cinase (AK), ou em inosina pela adenosina desaminase (ADA). No meio extracelular, a adenosina é degradada pela ecto-adenosina desaminase (Latini e Padata, 2001). A concentração extracelular de adenosina é um factor determinante dos efeitos neuromoduladores desta molécula pois determina a activação de receptores específicos presentes na membrana.

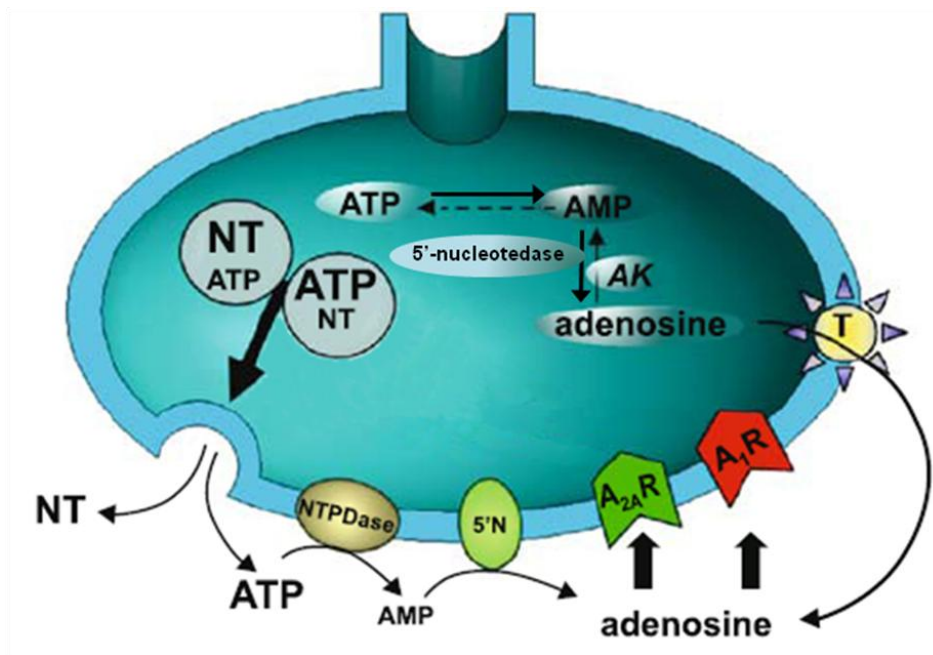


Figura 5. Vias de síntese, metabolismo e transporte de adenosina na célula nervosa. AK, adenosina quinase; NT, neurotransmissor; SAH, S-adenosilhomocisteína; NTPDase, ectonucleotidase; 5'N, ecto-5'-nucleotidase; T, transportador equilibrativo (adaptado de Cunha, 2005).

1.4.2 Os receptores de adenosina

Os receptores de adenosina são proteínas integrais da membrana plasmática que pertencem à família de receptores com sete domínios transmembranares que fazem acoplamento às proteínas G. São receptores metabotrópicos que regulam a actividade celular controlando a produção de mensageiros intracelulares. Os receptores de adenosina foram classificados em quatro subtipos, A1, A2a, A2b e A3, com base na estrutura primária do receptor, no sistema de segundos mensageiros a que estão acoplados, e na afinidade diferencial para agonistas e antagonistas.

Van Calcar e colaboradores foram os primeiros a descrever, em 1979, os subtipos A1 e A2 dos receptores de adenosina, com base na capacidade para inibir (receptor A1) ou estimular (receptor A2) a actividade da adenil ciclase. Alguns anos mais tarde, foi estabelecida uma subdivisão dos receptores A2 em A2a e A2b com

base na afinidade pela adenosina. Os receptores A1 e A2a apresentam alta afinidade pela adenosina, enquanto que os receptores A2b e A3 são receptores de baixa afinidade (Ribeiro et al, 2003). Esta classificação dos subtipos de receptores de adenosina foi mais tarde validada pela identificação dos respectivos genes (Fredholm et al, 2001) e a sua clonagem e expressão em diferentes espécies (revisão por Cunha, 2005).

Classicamente os receptores de adenosina foram divididos em dois grupos: os receptores A1 e A3 que estão acoplados a proteínas G da família Gi/o e cuja activação se traduz numa redução dos níveis intracelulares de AMPc em resultado da inibição da adenil ciclase, e os receptores A2a e A2b acoplados a proteínas Gs e cuja activação leva ao aumento dos níveis de AMPc intracelular devido à activação da adenil ciclase (Ribeiro et al, 2003). No entanto, os receptores de adenosina podem activar outras vias de sinalização intracelular como a fosfolipase C ou canais iónicos, incluindo diferentes tipos de canais de K⁺ e Ca²⁺ (Ribeiro et al, 2003).

Os receptores A1 são os receptores de adenosina mais abundantes no SNC, sendo expressos em altas concentrações no córtex cerebral, hipocampo, tálamo, cerebelo, tronco cerebral e espinal medula. O receptor A1 é também expresso em tecidos periféricos, como o tecido adiposo, testículos, estômago, rins, fígado, coração, glândula adrenal, olhos, glândulas salivares, esófago, pulmão, músculo esquelético e pâncreas (Fredholm et al, 2001). No sistema nervoso, os receptores A1 estão presentes em neurónios e nas células da glia (astrócitos, microglia e oligodendrócitos) (revisão por Cunha, 2005). São muito abundantes nas regiões de sinapses, quer nos terminais pré-sinápticos como nos pós-sinápticos.

A activação dos receptores A1 tem efeitos inibitórios na neurotransmissão. Nos terminais pré-sinápticos, o receptor A1 modula a libertação de alguns neurotransmissores como o glutamato, acetilcolina e serotonina, inibindo o influxo de Ca²⁺ através de canais dependentes da voltagem, principalmente do tipo N (revisão por Wardas, 2002). Este efeito da adenosina foi demonstrado tanto *in vivo* como *in*

vitro, principalmente em modelos experimentais de hipóxia/isquemia e de convulsões (revisões por Latini e Pedata, 2001; Cunha, 2005). Por outro lado, a activação dos receptores A1 pós-sinápticos induz hiperpolarização celular por activação de canais de K^+ reduzindo assim a excitabilidade neuronal. Esta actividade inibitória, que é aumentada sob condições neurotóxicas, coloca a adenosina como um importante agente em mecanismos de neuroprotecção (revisão por Wardas, 2002). Embora tenha sido demonstrado que a activação de receptores A1 da adenosina é neuroprotector em condições de isquemia, o uso terapêutico de agonistas selectivos A1 é limitada pelos efeitos indesejados a nível periférico, incluindo bradicardia e hipotensão (Chen et al, 2007).

Os receptores A2a da adenosina têm uma distribuição bastante mais restrita no SNC, ocorrendo em altas concentrações apenas no estriado e tubérculos olfactivos (Ongini et al, 2001). Baixos níveis de expressão dos receptores A2a foram encontrados na amígdala, córtex, hipocampo, tálamo e cerebelo (Rosin et al, 1998). Nos tecidos periféricos estes receptores estão presentes no músculo esquelético, plaquetas, leucócitos, timo, coração, pulmão e vasos sanguíneos (Fredholm et al., 2001). No tecido nervoso, os receptores A2a são expressos por neurónios, a nível pós- e pré-sináptico, por astrócitos e por células da microglia (revisão por Cunha, 2005). No hipocampo, os receptores A2a são muito abundantes nas regiões pré-sinápticas, onde regulam a libertação de neurotransmissores como glutamato, acetilcolina, GABA e noradrenalina (Rebola et al, 2005).

Nos astrócitos, os receptores A2a controlam a proliferação, o metabolismo, e a libertação de diferentes substâncias, contribuindo assim para o controlo da actividade neuronal. Na microglia, os receptores A2a controlam o estado de reactividade e a expressão e a libertação de citocinas, pelo que a adenosina tem um papel muito importante no controlo da neuro-inflamação (revisão por Cunha, 2005).

A activação dos receptores A2a da adenosina está associada ao desenvolvimento de neurotoxicidade, dano neuronal e morte celular. O bloqueio

farmacológico dos receptores A2a ou a inactivação genética destes receptores confere neuroprotecção em modelos animais de isquémia *in vivo* (Chen et al, 1999). Adicionalmente, a activação dos receptores A2a facilita a libertação de glutamato em condições normais e durante a isquémia. Esse aumento extra-celular de glutamato pode levar à excitotoxicidade e dano neuronal (Chen et al, 2007). A activação dos receptores A2a da adenosina também modula a morte de neurónios dopaminérgicos em modelos da doença de Parkinson e outras doenças neurodegenerativas (Fredholm et al, 2007). Dessa forma, a inactivação dos receptores A2a tem sido considerada uma estratégia neuroprotectora em diferentes modelos de doenças neurodegenerativas. No entanto, também foi demonstrado que a activação de receptores A2a da adenosina protege alguns tipos de neurónios da neurotoxicidade induzida pelo glutamato (Chen et al, 2007).

Devido à baixa expressão dos receptores A2b e A3 no encéfalo e à falta de ferramentas farmacológicas selectivas para estes receptores, pouco se sabe sobre as funções destes receptores no SNC, e efeitos opostos, tanto neuroprotectores como neurotóxicos, tem sido atribuídos a estes receptores (revisão por Cunha, 2005). Os receptores A2b estão expressos em baixas concentrações no SNC, nomeadamente no hipotálamo, tálamo, hipocampo e estriado. São encontrados em neurónios, microglia e astrócitos (revisão por Wardas, 2002).

Os receptores A3 foram os últimos receptores adenosinérgicos a serem descritos, sendo expressos de forma moderada no hipocampo e cerebelo e com baixa expressão no restante do encéfalo. Estão presentes em neurónios, astrócitos e microglia (Wardas, 2002).

Desde a caracterização dos receptores de adenosina, um grande número de agonistas e antagonistas destes receptores foram desenvolvidos, com o objectivo de realizar intervenções que possam ser utilizadas como ferramentas terapêuticas em diversas patofisiologias.

1.4.3 Os receptores de adenosina no controlo motor e neuroprotecção na doença de Parkinson

Nos últimos anos, os receptores A2a da adenosina têm surgido como um dos principais alvos terapêuticos não-dopaminérgico da doença de Parkinson (Pinna et al., 2005; Xu et al, 2005; Schwarzschild et al, 2006) por duas razões principais: (i) os antagonistas dos receptores A2a mostraram estimular a actividade motora, sozinhos ou em combinação com L-DOPA, em modelos da doença de Parkinson em roedores e primatas não-humanos, e também em estudos clínicos recentes (Petzer et al, 2009); (ii) estudos epidemiológicos mostram existir uma relação inversa entre o consumo de cafeína (antagonista não-selectivo dos receptores A2a) e o risco de desenvolver a doença de Parkinson. Em modelos animais foi demonstrado que os receptores A2a contribuem para a degeneração dos neurónios dopaminérgicos da via nigra-estriatal (Chen et al, 2001; Ikeda et al, 2002), sugerindo que antagonistas dos receptores A2a podem também constituir uma estratégia neuroprotectora para a doença de Parkinson. Os receptores A2a são particularmente relevantes no desenvolvimento duma estratégia terapêutica para a doença de Parkinson uma vez que a sua expressão no encéfalo é largamente restrita ao estriado, o que poderá minimizar os efeitos indesejados da terapia.

1.4.3.1 Controlo motor pelos receptores de adenosina

Os receptores da adenosina são expressos nos dois circuitos dos gânglios da base, a via directa e a via indirecta, que regulam a actividade motora determinando a intensidade de estimulação do tálamo para o córtex motor (figura 3). Os receptores A1 estão co-localizados com os receptores D1 da dopamina nos neurónios GABAérgicos estriato-palidais da via directa. Os receptores A2a estão co-localizados com os receptores D2 nos neurónios GABAérgicos estriato-palidais da via indirecta (figura 3). Como os receptores A2a e D2 regulam antagonicamente a adenil ciclase, os

antagonistas A2a podem compensar o déficit dopaminérgico na doença de Parkinson. Além disso, os receptores A2a e D2 formam oligómeros em que a activação dos receptores A2a modula negativamente a afinidade da ligação da dopamina ao receptor e a activação das vias de sinalização (figura 6; Xu et al, 2005; revisão por Fuxe et al, 2007). Deste modo, o uso de antagonista A2a pode melhorar a eficiência da activação dos receptores D2 pela dopamina remanescente. A melhoria significativa dos sintomas motores foi demonstrada em modelos animais da doença de Parkinson. Em roedores, antagonistas não-específicos da adenosina como a cafeína, ou antagonistas específicos dos receptores A2a aumentaram a actividade motora em animais com déficit de dopamina causado pela toxicidade do MPTP (Chen et al, 2001).

O bloqueio dos receptores A2a nos neurónios estriato-palidais potencia a neurotransmissão mediada pelo receptor D2, e por consequência reduz os efeitos da depleção de dopamina estriatal na doença de Parkinson (Pinna et al, 2005).

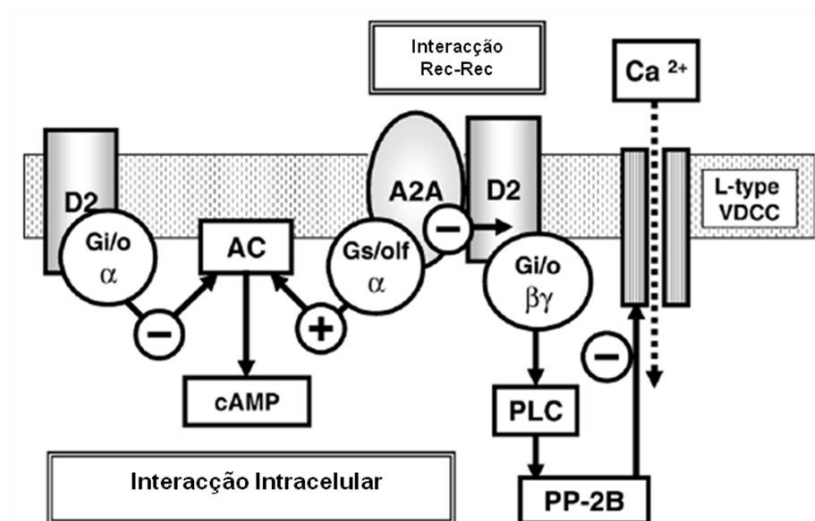


Figura 6. Representação esquemática da interacção intramembranar e das vias de sinalização dos receptores A2a da adenosina com os receptores D2 da dopamina. AC- adenilciclase; G- proteínas G; PLC- fosfolipase C; VDCC- canais de Ca²⁺ dependentes da voltagem. (adaptado de Fuxe et al, 2007).

Portanto, o antagonismo do receptor A2a pode estimular a actividade motora não só por exemplo, pela diminuição da rigidez muscular mas também pode potenciar o efeito do L-DOPA (aumenta a libertação de dopamina) sem aumentar o efeito discinético (revisão por Cieslak et al, 2008). Foi observado em primatas tratados com MPTP que o antagonismo dos receptores A2a da adenosina (KW-6002) previne o desenvolvimento de discinesias (Bibbiani et al, 2003).

1.4.3.2 Os receptores de adenosina e a sobrevivência dos neurónios dopaminérgicos em modelos da doença de Parkinson

Como foi já referido, estudos epidemiológicos mostram existir uma relação inversa entre o consumo regular de cafeína, antagonista não-selectivo dos receptores A2a da adenosina, e o risco de desenvolver a doença de Parkinson. Em modelos animais, a cafeína diminuiu a perda de neurónios dopaminérgicos da via nigra-estriatal induzida por 6-OHDA ou por MPTP (Chen et al, 2001; Bové et al, 2005). Como a inibição dos receptores A1 com 8-ciclopentil-1,3-dipropilxantina (DPCPX) não protegeu os neurónios dopaminérgicos, concluiu-se que a acção neuroprotectora da cafeína era mediada pelo bloqueio dos receptores A2a e não pelo bloqueio dos receptores A1. O efeito neuroprotector de antagonistas selectivos dos receptores A2a foi observado em murganhos tratados com MPTP e em ratos após a lesão da via nigra-estriatal com 6-OHDA (Ikeda et al, 2002). Além disso, murganhos sem o gene funcional dos receptores A2a (A2a KO) exibiram, comparativamente com a estirpe selvagem, maior conteúdo residual de dopamina e dum marcador dos terminais dopaminérgicos (³H-mazindol) no estriado após tratamento com MPTP (Chen et al, 2001). Todas estas evidências sugerem que a activação dos receptores A2a contribui para a degeneração dos neurónios dopaminérgicos.

Por outro lado, observou-se que um antagonista A2a (KW-6002) diminuiu a gliose induzida pela MPTP e as alterações morfológicas no estriado, sugerindo que os efeitos neuroprotectores *in vivo* dos antagonistas A2a contra os efeitos das

neurotoxinas dopaminérgicas (MPTP e 6-OHDA) são mediados pela inibição das células gliais. Esta hipótese foi confirmada por experiências em murganhos com deleção selectiva do gene do receptor A2a em astrócitos, que revelaram elevada resistência à toxicidade do MPTP (Yu et al, 2008). Estes investigadores demonstraram que a neuroprotecção conferida pelo bloqueio dos receptores A2a contra a toxicidade induzida pelo MPTP está relacionada com a modulação da activação das células microgliais e astrogliais no estriado. Vários estudos têm sugerido que a neuroprotecção conferida pelos antagonistas dos receptores A2a contra a neurotoxicidade dopaminérgica é mediada pela diminuição da libertação de algumas citocinas (TNF- α , IL-1 β) por células da glia (revisão por Daré et al, 2007). Em modelos animais da doença de Parkinson, ocorre activação da microglia na proximidade dos neurónios dopaminérgicos que sofrem degeneração, e a inibição da microglia tem efeitos protectores dos neurónios dopaminérgicos (Wu et al, 2002). Antagonistas dos receptores A2a protegem contra a neurotoxicidade do MPTP e activação microglial na *substantia nigra* (Pierri et al, 2005). Além disso, a activação dos receptores A2a da adenosina nas células astrogliais foi implicada na excitotoxicidade através da libertação de glutamato pelos astrócitos (Nishizaki et al, 2002). O efeito neuroprotector dos antagonistas dos receptores A2a também foi observado noutros tipos de lesão cerebral como isquémia e toxicidade mitocondrial (revisão por Cunha, 2005; Fredholm et al, 2005).

Deste modo, os antagonistas A2a são potenciais candidatos no desenvolvimento de fármacos neuroprotectores para a doença de Parkinson. Apesar do desenvolvimento de melhores fármacos para o tratamento sintomático continuar a ser um objectivo importante, o desenvolvimento de fármacos neuroprotectores seria da maior relevância no tratamento a longo prazo da doença de Parkinson. Evidências farmacológicas e epidemiológicas têm sugerido que o antagonismo dos receptores da adenosina, especialmente o dos receptores A2a, pode proteger contra a degeneração neuronal dopaminérgica na doença de Parkinson e em modelos animais da doença de

Parkinson (Xu et al., 2005; Schwarzschild et al., 2006). No entanto, existem também evidências de que a activação dos receptores A2a é necessária para a estimulação da libertação de dopamina pelo factor neurotrófico GDNF no estriado (Gomes et al, 2006), e noutros sistemas a adenosina pode estimular a expressão de factores neurotróficos, como o BDNF e o GDNF que se sabe serem essenciais para a manutenção dos neurónios dopaminérgicos e a sobrevivência em condições tóxicas (Yamagata et al, 2007; revisão por Sebastião e Ribeiro, 2009), sugerindo que pode haver contra-indicações na utilização terapêutica de antagonistas dos receptores A2a.

1.5 Objectivos do trabalho

Com o objectivo de compreender melhor a relação entre receptores de adenosina, GDNF e a neuroprotecção dos neurónios dopaminérgicos, utilizámos:

1. Um rato modelo da doença de Parkinson, em que a degeneração da via nigra-estriatal foi induzida pela administração estereotáxica de 6-OHDA no estriado dorsal, para determinar se a degeneração dopaminérgica altera a expressão dos receptores A2a e A1 da adenosina e quais os tipos de células envolvidas.
2. Culturas de células da *substantia nigra* para testar o efeito de ligandos dos receptores A2a e A1 na sobrevivência e arborização dendrítica de neurónios dopaminérgicos na presença de 6-OHDA.

Capítulo 2

Material e Métodos

2.1 Modelos biológicos

Os animais foram obtidos do Biotério do Centro de Neurociências e Biologia Celular da Universidade de Coimbra, onde são mantidos num ambiente com temperatura controlada (22 °C), em ciclo de luz-escuridão de 12 h, com acesso livre a água e alimento. Todos os animais utilizados neste trabalho foram tratados de acordo com os requerimentos éticos para a investigação animal, e segundo a Convenção Europeia para a Protecção dos Animais Vertebrados usados para fins experimentais e outros fins científicos.

2.1.1 Modelo animal da doença de Parkinson induzido pela 6-OHDA

A degeneração dos neurónios dopaminérgicos da via nigra-estriatal foi induzida pela injeção estereotáxica de 6-OHDA na zona dorsal do estriado no hemisfério esquerdo. Foram utilizados ratos Wistar machos, com 8 semanas de idade, pesando entre 260 a 300 g. Os animais foram anestesiados por injeção intraperitoneal de uma solução de quetamina (150 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg). Após verificação de ausência do reflexo da pata, os animais foram colocados no aparelho estereotáxico com duas barras intra-auriculares e uma barra para os incisivos posicionada a 3,3 mm (figura 7). A lesão unilateral da via nigra-estriatal foi induzida pela injeção de 4 µL duma solução contendo 20 µg de 6-OHDA¹, no estriado do hemisfério esquerdo, com as seguintes coordenadas: 1,3 mm posterior e 3,0 mm lateral relativamente ao bregma (ponto de intersecção entre a sutura sagital e a sutura coronal), e 4,5 mm ventral em relação à dura mater. Um grupo de animais foi injectado com 6-OHDA e outro com a solução veículo (solução salina com 0,02% de ácido ascórbico). As injeções foram realizadas a um fluxo de 0,4 µL/min usando uma seringa *Hamilton* de 10 µL controlada por um nano-injector (Stoelting Co). No final da injeção, a agulha foi mantida no local durante

¹ **Solução de 6-OHDA:** 6-OHDA (SIGMA H116) 20 mM em ácido ascórbico a 0,02%.

mais 5 min antes de ser removida, para permitir a difusão completa da solução e evitar o seu refluxo.

Numa segunda fase do trabalho, a lesão da via nigra-estriatal foi induzida pela injeção de 6-OHDA em dois pontos do estriado nas seguintes coordenadas: (I) 0,5 mm posterior e 2,5 mm lateral ao bregma, e 5 mm de profundidade; (II) 1,2 mm posterior e 3,9 mm lateral ao bregma, e 5 mm de profundidade. Foram injectados 15 µg de 6-OHDA em cada local do estriado, com a velocidade do fluxo igual à anterior e aguardando 5 min antes de retirar a agulha. Após a cirurgia, a pele foi suturada e os animais foram deixados a recuperar da anestesia num ambiente aquecido.

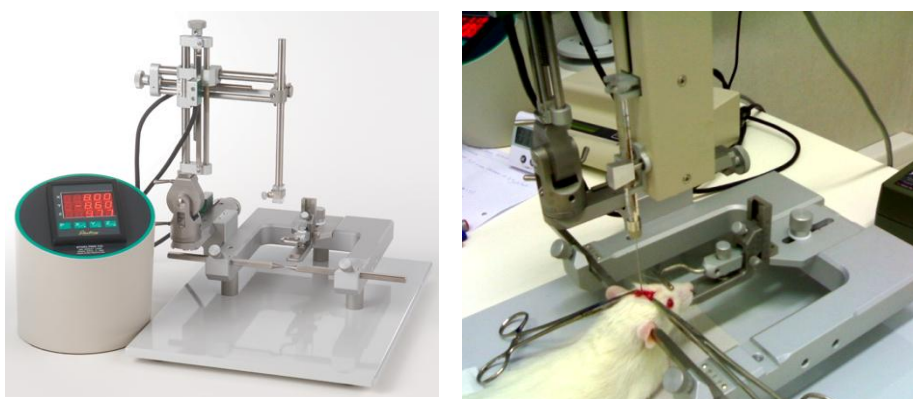


Figura 7. Aparelho estereotáxico utilizado na injeção intra-estriatal. A imagem do lado direito mostra a fixação do animal no aparelho utilizando barras ajustáveis, duas intra-auriculares e uma barra para os incisivos.

2.1.2 Culturas primárias de neurónios da *substantia nigra*

As culturas de neurónios da *substantia nigra* foram preparadas a partir de ratos recém-nascidos da espécie Wistar, de acordo com o procedimento descrito por Burke et al (1998), com algumas alterações descritas a seguir. Foi feita em primeiro lugar uma cultura de astrócitos do encéfalo médio, sobre a qual foram cultivadas posteriormente as células isoladas da *substantia nigra*. A camada trófica de astrócitos

é essencial à sobrevivência dos neurónios dopaminérgicos isolados da *substantia nigra* de ratos recém-nascidos (Burke et al, 1998).

2.1.2.1 Cultura de astrócitos do encéfalo médio

Os animais, com 1 a 4 dias de idade, foram sacrificados por decapitação e os cérebros rapidamente removidos e colocados numa caixa de Petri contendo tampão fosfato salino (PBS²) estéril frio. Para a dissecação, o encéfalo foi colocado sobre um círculo de Sylgard® submerso em PBS estéril frio, e foi cortada uma fatia coronal com cerca de 1 mm de espessura ao nível do encéfalo médio. A parte ventral do encéfalo médio, incluindo a *substantia nigra* e a área tegmental ventral (VTA), foi dissecada (figura 8), limpa de meninges e cortada em pequenos pedaços. O tecido foi enzimaticamente dissociado numa solução de papaína³ previamente equilibrada com carbogénio (95% O₂ e 5% CO₂) para ajustar o pH. A digestão do tecido foi feita a 36°C, com agitação e oxigenação contínuas, durante 10 a 30 min, até se observar aumento do volume dos fragmentos de tecido (aspecto de algodão doce). Os pedaços de tecido foram removidos da solução de digestão e lavados com meio de cultura de astrócitos (M10C-G⁴). Para completar o processo, o tecido foi dissociado mecanicamente por passagens sucessivas através de orifícios com diâmetros decrescentes (21, 22 e 25 G) abertos em pontas de 1000 µL com a extremidade selada. A suspensão celular foi então centrifugada a 400 x g durante 3 min. Depois de

² **PBS:** NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM e KH₂PO₄ 1,8 mM, pH 7,4.

³ **Solução de papaína para a preparação de astrócitos:** papaína 20 U/mL, solução de cisteína 1 mM, H&B 20%, vermelho de fenol 0,001%.

Solução de cisteína: CaCl₂ 1,9 mM, cisteína 1,25 mM.

H&B: NaCl 116 mM, KCl 5,4 mM, NaHCO₃ 26 mM, NaH₂PO₂*H₂O 2 mM, MgSO₄ 1 mM, EDTA 500 µM e glucose 25 mM.

⁴ **M10C-G:** Meio Mínimo Essencial de Eagle (MEM) 90%, soro fetal bovino não inactivado 10%, glucose 0,75%, penicilina 12 U/mL, estreptomicina 12 µg/mL, insulina 5 µg/mL, e glutamina 500 µM.

decantado o sobrenadante, o sedimento celular foi ressuspensão em meio M10C-G e procedeu-se à contagem das células num hemocítmetro.

As células foram cultivadas aderentes a lamelas de vidro formando o fundo de 3 compartimentos redondos, com 0,8 cm² de superfície de cultura, abertos em caixas de Petri. A superfície de cultura foi previamente revestida com poli-L-lisina e laminina. Foram adicionadas 10⁵ células por compartimento em 100 µL de meio M10C-G, e as células foram deixadas a aderir durante 3 h. O meio foi então aspirado e efectuou-se uma lavagem com 2 mL de MEM frio com o objectivo de remover células mortas ou não aderentes. Finalmente adicionaram-se 2 mL de meio M10C-G a cada caixa. A cultura foi mantida numa incubadora a 37°C, sob atmosfera com 95% de ar e 5% de CO₂ saturada com vapor de água. Quando a cultura atingiu uma confluência de cerca de 70%, normalmente após 3 a 5 dias em cultura, a proliferação celular foi inibida com 5-fluoro-2'-desoxiuridina 25 µM e uridina 70 µM (FDU).

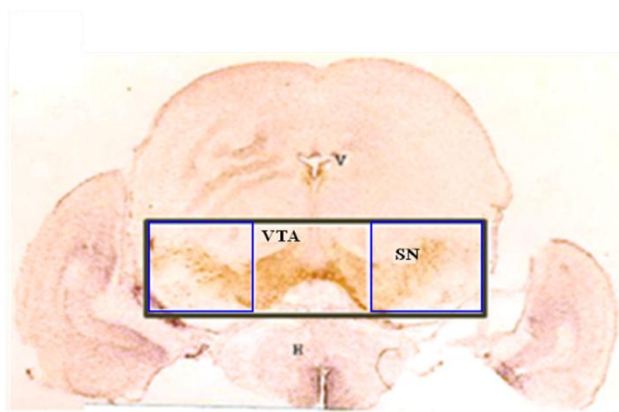


Figura 8. Secção coronal do encéfalo de rato mostrando o encéfalo médio ventral utilizado para a preparação da cultura de astrócitos (delimitado pelo rectângulo preto) que inclui a *substantia nigra* (SN) e a *área tegmental ventral* (VTA). Os rectângulos azuis delimitam a zona correspondente à SN dissecada para a obtenção da cultura de neurónios. (imagem fornecida por David Sulzer, Columbia University, USA)

2.1.2.2 Co-cultura de neurónios da *substantia nigra*

O procedimento para a preparação de neurónios foi semelhante ao da preparação de astrócitos com a excepção da área dissecada (figura 8), da solução de papaína⁵, e o meio de cultura M10C-G foi substituído por meio neurobasal A suplementado⁶.

Três dias antes da preparação da cultura de neurónios, o meio da cultura de astrócitos foi substituído por meio de cultura neuronal (meio neurobasal A suplementado), para permitir o condicionamento do meio pelos astrócitos. A *substantia nigra* foi dissociada numa solução de papaína contendo ácido quinurénico, um antagonista do glutamato, para inibir a morte de neurónios por mecanismos de excitotoxicidade. No final da dissociação, a suspensão de células foi adicionada à monocamada de astrócitos (8×10^4 células por compartimento). No dia seguinte, a proliferação de células não-neuronais foi inibida pela adição de FDU. As culturas celulares foram mantidas a 37°C sob uma atmosfera saturada com vapor de água, com 95% de ar e 5% de CO₂. As co-culturas de astrócitos e neurónios foram utilizadas em experiências após 4 ou 5 dias em cultura.

2.2 Imunohistoquímica

Os animais foram anestesiados por injeção intraperitoneal de tiopental sódico (50 mg/kg) e perfundidos transcardialmente com 200 mL de solução salina (NaCl a 0,9%) para remover o sangue e, em seguida, com 200 mL de PFA a 4% em PBS, pH 7,4 para fixação do tecido. Posteriormente, os cérebros foram removidos e guardados a 4°C na solução fixadora (PFA a 4%) durante a noite. No dia seguinte, os cérebros

⁵ **Solução de papaína para a preparação de neurónios:** água de cisteína 1 mM, papaína 20 U/mL, vermelho de fenol 0,001%, ácido quinurénico 0,5 mM, H&B 20% e HCl 5 mM.

⁶ **Meio neurobasal A suplementado:** Meio neurobasal A 97%, suplemento B-27 2%, glutamina 500 µM, ácido quinurénico 500 µM.

foram transferidos para uma solução desidratante⁷. Os cérebros foram fatiados num crióstato a -20°C, de modo a obter cortes coronais de 30 µm no sentido antero-posterior. As fatias cerebrais foram colocadas em placas de 24 compartimentos contendo uma solução anticongelante⁸.

Foram utilizados dois métodos para a detecção de antígenos marcados com anticorpos em fatias do encéfalo: (i) detecção com anticorpos secundários biotinizados e revelação com 3,3'-diaminobenzidina (DAB) e peroxidase; (ii) detecção com anticorpos secundários conjugados a fluoróforos.

2.2.1 Imunohistoquímica com revelação pelo método DAB-peroxidase

Após a lavagem das fatias cerebrais com PBS 0,1 M (3 vezes, durante 10 min), procedeu-se à inactivação das peroxidases endógenas com ácido cítrico 100 mM (pH 6), a 60°C durante 20 min. Em seguida, as fatias foram lavadas em PBS e incubadas durante 1 h com a solução de bloqueio e permeabilização⁹ à temperatura ambiente, com a finalidade de bloquear locais de ligação não específicos do anticorpo e de permeabilizar as membranas celulares para permitir o acesso dos anticorpos a antígenos intracelulares. O soro utilizado na solução de bloqueio foi soro da espécie animal onde foram produzidos os anticorpos secundários. Após o bloqueio e permeabilização, as fatias foram novamente lavadas com PBS, e em seguida incubadas com os anticorpos primários (tabela I) diluídos na solução de bloqueio. A incubação com os anticorpos primários decorreu durante a noite, à temperatura ambiente, com agitação suave. No segundo dia, os cortes foram lavados sequencialmente em solução de bloqueio. Seguiu-se a incubação com os anticorpos secundários biotinizados (tabela I), diluídos em solução de bloqueio, durante 1 h à

⁷ **Solução desidratante:** 20% de sacarose em tampão fosfato 0,2 M, pH 7,2.

⁸ **Solução anticongelante:** tampão fosfato 0,5 M, etilenoglicol 30% (v/v) e glicerol 30% (v/v).

⁹ **Solução de bloqueio e permeabilização:** 5% de soro normal e 0.25% de Triton X-100 em PBS.

temperatura ambiente. Em seguida efectuou-se uma nova lavagem com PBS, após a qual as fatias foram incubadas com o complexo avidina-biotina-peroxidase (solução ABC), durante 1 h. Para a visualização da imunomarcação, utilizou-se a DAB como cromogénio. As fatias foram montadas em lâminas de microscopia revestidas com gelatina. Os cortes foram desidratados por passagem sucessivas, durante 2 min cada, em soluções de concentração crescente de etanol (70%, 95% e 100%), e duas vezes em xileno durante 5 min. Por fim adicionou-se meio de montagem DPX (Fluka) e os cortes foram selados com lamelas de vidro. As fatias foram observadas num microscópio Zeiss Axioshop 2 Plus (Carl Zeiss) com *software* AxioVision 4.7.

Tabela I. Anticorpos utilizados na imunohistoquímica com revelação pelo método DAB-peroxidase.

Anticorpos	Origem animal	Fornecedor	Diluição
Primários			
Anti-TH	Murganho	Calbiochem	1:1000
Anti-A1	Coelho	Affinity BioReagents	1:1000
Anti-A2a	Murganho	Upstate	1:1000
Secundários			
Anticorpo biotilado Anti-IgG de murganho	Cavalo	Vector Laboratories	1:200
Anticorpo biotilado Anti-IgG de coelho	Cabra	Vector Laboratories	1:200

2.2.2 Imunofluorescência

Os cortes foram lavados com PBS 0,1 M (3 vezes, durante 10 min) e pré-incubados com a solução de permeabilização e bloqueio¹⁰ durante 1 h, à temperatura ambiente, para permeabilizar as membranas celulares e bloquear as ligações inespecíficas do anticorpo primário. Em seguida as fatias foram incubadas com os

¹⁰ **Solução de permeabilização e bloqueio:** 0,25% de Triton X-100 e 5% de soro normal de cabra (NGS) em PBS.

anticorpos primários (tabela II) diluídos na solução de bloqueio, durante a noite à temperatura ambiente.

No dia seguinte, os cortes foram lavados duas vezes, durante 10 min, com Triton a 0,25% em PBS, e uma vez com a solução de bloqueio, durante 10 min. Após as lavagens, as fatias foram incubadas durante 2 h com os anticorpos secundários (tabela II) conjugados a fluoróforos, diluídos em solução de bloqueio. Após três lavagens durante 10 min, os núcleos foram marcados com 1 µg/mL Hoechst 33342 em PBS, durante 10 min, e novamente lavados. Finalmente, os cortes foram montados em lâminas de vidro, em seguida adicionou-se o meio de montagem DAKO e os cortes foram selados com lamelas de vidro. As fatias foram observadas num microscópio confocal LSM 510 META e as imagens adquiridas e processadas com o *software* LSM 5.

Tabela II. Anticorpos utilizados na imunohistoquímica de fluorescência.

Anticorpos	Origem animal	Fornecedor	Diluição
Primários			
Anti-TH	Murganho	Calbiochem	1:1000
Anti-GFAP	Murganho	Sigma	1:400
Anti-GFAP	Coelho	DAKO	1:200
Anti-A1	Coelho	Affinity BioReagents	1:500
Anti-A2a	Murganho	Upstate	1:500
Anti-A2a	Cabra	Santa Cruz	1:1000
Secundários			
Anti-IgG de murganho conjugado a Alexa 488	Cabra	Molecular Probes	1:200
Anti-IgG de coelho conjugado a Alexa 594	Cabra	Molecular Probes	1:200
Anti-IgG de cabra conjugado a Cy5	Cavalo	Jackson Laboratories	1:1000

2.3 Imunocitoquímica

Para minimizar a perturbação da cultura, as células foram pré-fixadas pela adição de duas gotas de PFA¹¹ a cada caixa de cultura contendo 2 ml de meio, seguida de incubação durante 5 min à temperatura ambiente. O meio de cultura foi então aspirado, as células lavadas duas vezes com MEM, e procedeu-se à fixação das células com 4% PFA durante 10 min. Após duas lavagens com PBS (100 µl/compartimento), procedeu-se à permeabilização das células¹² durante 10 min. Em seguida as células foram lavadas quatro vezes com PBS, e posteriormente incubadas na solução de bloqueio¹³ durante 90 min. As células foram então incubadas com os anticorpos primários (tabela III) diluídos na solução de bloqueio, durante 90 min. De seguida as células foram lavadas durante 15 min, seis vezes com PBS, e incubadas, com os anticorpos secundários apropriados, conjugados a um fluoróforo (tabela III), diluídos na solução de bloqueio, durante 90 min.

Finalizada a incubação com os anticorpos secundários, lavou-se as células durante 15 min, seis vezes com PBS. Os núcleos foram marcados com Hoechst 33342 (1 µg/mL) em PBS durante 5 min. Após nova lavagem durante 15 min, seis vezes com PBS, foi adicionado a cada poço uma gota de meio de montagem DAKO. As células foram visualizadas num microscópio Zeiss Axioshop 2 Plus (Carl Zeiss) e as imagens adquiridas e processadas com o software *AxioVision 4.7*.

¹¹ **Paraformaldeído:** paraformaldeído (PFA) 4% em PBS com 4% de sacarose.

¹² **Solução de permeabilização:** 0.2% de Triton X-100 em PBS.

¹³ **Solução de bloqueio:** albumina de soro bovino (BSA) a 3% e Tween a 0,2% em PBS.

Tabela III. Anticorpos utilizados na imunocitoquímica.

Anticorpos	Origem animal	Fornecedor	Diluição
Primários			
Anti-TH	Murganho	Calbiochem	1:1000
Anti-MAP-2	Coelho	Chemicon	1:1000
Anti-GFAP	Murganho	Sigma	1:800
Anti-GFAP	Coelho	DAKO	1:400
Anti-CD11b	Murganho	Serotec	1:100
Anti-GDNF	Coelho	Santa Cruz	1:500
Anti-A2a	Murganho	Chemicon	1:1000
Secundários			
Anti-IgG de coelho conjugado a Alexa 488	Cabra	Molecular Probes	1:200
Anti-IgG de murganho conjugado a Alexa 488	Cabra	Molecular Probes	1:200
Anti-IgG de coelho conjugado a Alexa 594	Cabra	Molecular Probes	1:200
Anti-IgG de murganho conjugado a Alexa 594	Cabra	Molecular Probes	1:200

2.4 Análise de catecolaminas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*)

2.4.1 Preparação das amostras

Os animais foram anestesiados em atmosfera de halotano e sacrificados por decapitação. Os cérebros foram removidos e a dissecação da *substantia nigra* e do estriado foi feita com a ajuda de um molde para dissecação do encéfalo de rato (figura 9, Harvard Systems). Foram cortadas fatias de 2 mm de espessura na zona do estriado, onde foram perfurados cilindros de 2 mm de diâmetro. O tecido isolado foi pesado e homogeneizado em ácido perclórico 0,2 M. O homogeneizado foi sonificado num banho de ultra-sons e centrifugado numa microcentrífuga refrigerada a 4°C

(10000 x g, 20 min). Os sobrenadantes foram analisados por HPLC seguido de detecção electroquímica.

2.4.2 HPLC

Os níveis de dopamina e DOPAC foram quantificados após separação por HPLC de fase reversa de pares iónicos. Nesta técnica, a separação dos analitos depende das interações com a fase estacionária apolar e a fase móvel mais polar. A fase móvel¹⁴ contém um reagente de pares iónico constituído por moléculas anfipáticas, o ácido heptanosulfónico, cuja cadeia hidrocarbonada hidrofóbica interage com a fase estacionária e a porção polar interage com o analito. O tempo de retenção dos analitos, e conseqüentemente a sua separação, depende da interação com esta fase estacionária e a solubilidade na fase móvel polar que tem uma constante dielétrica baixa conferida pela presença do metanol.

Utilizou-se um sistema de HPLC Gilson, equipado com uma bomba Gilson 307, um injetor automático e uma válvula de injeção *Rheodyne 7010* com uma *loop* de 100 µL. A separação da dopamina e DOPAC foi realizada numa coluna de octadecilsilano LiChroCART 75-4 (Merck) com 75 mm de comprimento e partículas de 4 µm de diâmetro, com a fase móvel a um fluxo de 1 mL/min.

Após a separação na coluna, a amostra foi detectada num detector electroquímico ESA Coulochem II, modelo 5100A. Neste sistema, a amostra passa primeiro pela Célula de Condicionamento (modelo 5011) com um potencial de +350 mV, e em seguida pela Célula Analítica a um potencial de -300 mV. Este processo permite eliminar da detecção contaminantes da amostra cuja oxidação não seja facilmente reversível. O sinal obtido foi amplificado e transmitido a um computador com *software* Gilson modelo 715. O tempo de cada cromatograma para a separação de DOPAC e dopamina foi de 6 min. O tempo de eluição do DOPAC foi próximo de

¹⁴ **Fase móvel:** acetato de sódio 50 mM, EDTA 0,05 mM, ácido heptanosulfónico 0,7 mM, metanol 8%, pH 4,6.

2,70 min, e o da dopamina cerca de 4 min. A identificação dos picos nos cromatogramas foi feita por injeção de padrões com quantidades conhecidas de dopamina e DOPAC.

2.5 Análise de proteínas por electroforese e *Western blotting*

2.5.1 Preparação das amostras

Os animais foram anestesiados em atmosfera de halotano e sacrificados por decapitação. Os cérebros foram removidos para dissecação da *substantia nigra* e do estriado usando o molde para encéfalo de rato. No estriado foram dissecadas 3 sub-regiões como esquematizado na figura 9: anterior dorsal, dorsolateral e medial. Os cilindros de tecido das várias regiões, de cada um dos hemisférios cerebrais (contralateral e ipsilateral), foram recolhidos para tubos de 1,5 mL contendo solução de lise¹⁵. O tecido foi homogeneizado, sonificado e centrifugado a 10 000 x g, durante 20 min, numa microcentrífuga refrigerada a 4°C. O sobrenadante correspondente ao extracto proteico foi usado para a determinação do conteúdo total de proteína pelo método do ácido bicinconínico (BCA), usando albumina sérica bovina (BSA) como padrão. Foram preparadas amostras contendo 35 µg de proteína. Depois de adicionar a solução desnaturante¹⁶, as amostras foram aquecidas a 95°C, durante 10 min. Os extractos proteicos foram separados por SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate – PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*).

¹⁵ **Solução de lise:** NaCl 137 mM, Tris 20 mM, Nonidet P-40 1%, glicerol 10%, fenilmetilsulfoniolfluoreto (PMSF) 1 mM, aprotinina 10 µg/ml, leupeptina 1 µg/ml, e ortovanadato de sódio 0,5 mM.

¹⁶ **Solução desnaturante** (seis vezes mais concentrada): Tris 0,5 M, glicerol 30%, dodecil sulfato de sódio (SDS) 10%, ditiotreitól 0,6 M e azul bromofenol 0,012%

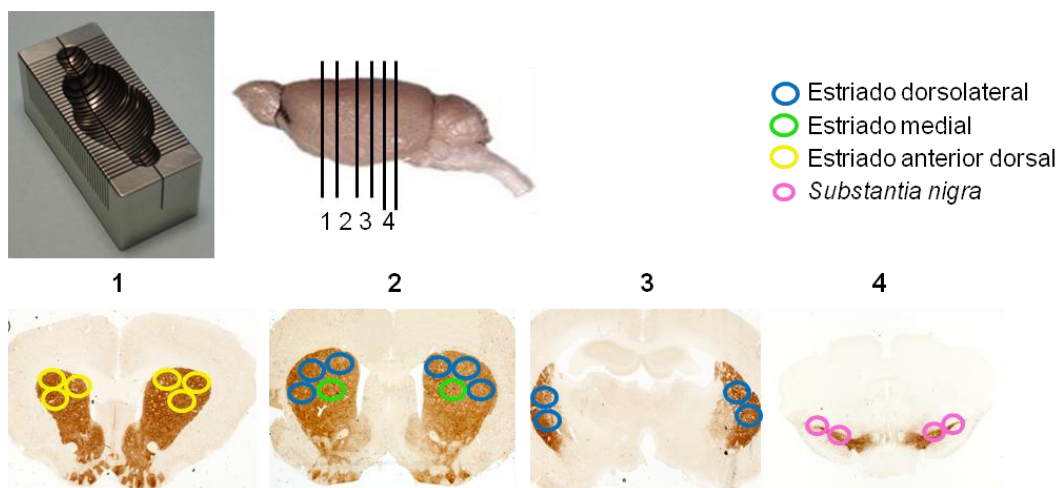


Figura 9. Dissecção do estriado e da *substantia nigra* utilizando um molde para o encéfalo de rato que permite cortar fatias coronais. Para a dissecção do estriado foram obtidas 3 fatias, correspondentes aos números 1 (2 mm de espessura), 2 (3 mm de espessura) e 3 (2 mm de espessura), onde foram perfurados cilindros de 1,5 mm de diâmetro para as 3 sub-regiões do estriado. Foi obtida uma fatia de 2 mm de espessura para a dissecção da *substantia nigra* (número 4) onde foram perfurados cilindros de 1,2 mm de diâmetro.

2.5.2 Electroforese, electrotransferência e revelação da membrana

As proteínas foram separadas por electroforese num gel de 0,75 mm de espessura, com 12% de poliacrilamida (gel de resolução), após uma separação preliminar num gel de 4% de poliacrilamida (gel de concentração). A electroforese¹⁷ das amostras e padrões bicolores de peso molecular conhecido foi realizada a 120 V durante 90 min. Terminada a electroforese, as proteínas foram transferidas do gel para membranas de fluoreto de polivinilideno (PVDF) previamente activadas durante 5 seg em metanol, seguido de 5 min em água, e de 5 a 30 min em tampão de electrotransferência¹⁸. A electrotransferência decorreu durante 90 min, a 750 mA, com refrigeração a 4°C. Depois da electrotransferência, as membranas foram bloqueadas

¹⁷ **Tampão de electroforese:** Tris 0,2 M, Bicina 1 M, SDS 0,017 M, pH 8,3.

¹⁸ **Tampão de electrotransferência:** ácido ciclohexilamino propanosulfónico (CAPS) 10 mM em metanol 10%, pH 11.

em 5% de leite magro em TBS-T¹⁹, durante 1 h à temperatura ambiente, sob agitação contínua. A incubação com os anticorpos primários (tabela IV), diluídos em TBS-T com 1% de leite, foi feita durante a noite a 4°C, com agitação contínua. Os anticorpos anti- β -actina e anti- α -tubulina foram utilizados como controlo de *loading* pois estas proteínas, geralmente são abundantes e não mostram variações no tecido nervoso.

No dia seguinte, as membranas foram lavadas²⁰ três vezes, durante 10 min cada, e incubadas à temperatura ambiente durante 1 h, sob agitação contínua, com os anticorpos secundários conjugados a fosfatase alcalina (tabela IV), diluídos em TBS-T com 1% de leite. Em seguida, as membranas foram lavadas duas vezes durante 20 min (10 min cada) com TBS-T contendo 0,5% de leite, e uma vez com TBS-T sem leite durante 10 min. As membranas foram reveladas com o sistema ECF (Enhanced ChemiFluorescence) e visualizadas no VersaDoc 3000 (BioRad). A quantificação das bandas proteicas foi realizada por análise densitométrica usando o *software Quantity One* (BioRad).

Para determinar várias proteínas, as membranas foram reveladas novamente (*reprobed*) depois da remoção do ECF com TBS-T, durante 30 min, e lavagem com água durante 5 min. Os anticorpos foram removidos com NaOH 0,2 M durante 20 min, à temperatura ambiente, sob agitação contínua. Terminada a incubação, realizou-se uma nova lavagem com água durante 5 min e procedeu-se novamente ao bloqueio da membrana com 5% de leite em TBS-T, seguido da incubação com o novo anticorpo primário. A incubação com os anticorpos secundários, as lavagens e a revelação com ECF foram feitas como descrito anteriormente.

¹⁹ **TBS-T:** 0,5% de Tween20 em Tris 20 mM e NaCl 137 mM.

²⁰ **Solução de lavagem das membranas:** TBS-T com 0,5% de leite

Tabela II. Anticorpos utilizados no *Western blotting*.

Anticorpos	Origem animal	Fornecedor	Diluição
Primários			
Anti-TH	Murganho	Calbiochem	1:200
Anti-GDNF	Coelho	Santa Cruz Biotechnology	1:1000
Anti- β -Actina	Murganho	Sigma	10 000
Anti- α -Tubulina	Murganho	Jackson's Lab	10 000
Anti-A1	Coelho	Affinity BioReagents	1:500
Anti-A2a	Murganho	Upstate	1:1000
Secundários			
Anti-IgG de murganho conjugado a fosfatase alcalina	Cabra	Amersham Life Sciences	1:20 000
Anti-IgG de coelho conjugado a fosfatase alcalina	Cabra	Amersham Life Sciences	1:20 000

Capítulo 3

Resultados

3.1 Lesão dos neurónios dopaminérgicos nigra-estriatais induzida por injeção estereotáxica de 6-OHDA no estriado

Com o objectivo de estabelecer no laboratório um modelo animal da doença de Parkinson, foi induzida a degeneração selectiva dos neurónios dopaminérgicos que projectam da *substantia nigra* para o estriado através da injeção estereotáxica de 6-OHDA numa região dorsal do estriado que inclui o caudado e o putamen (CPu), no hemisfério esquerdo. Esta parte do estriado, que recebe inervação dopaminérgica exclusivamente da *substantia nigra*, pode ser considerada equivalente ao putamen de primatas, enquanto que a parte ventral do estriado recebe inervações da VTA. Uma vez que o putamen é a sub-região estriatal que apresenta uma maior depleção de dopamina em pacientes com doença de Parkinson, lesões centradas no CPu de ratos são considerados os modelos mais relevantes para a doença de Parkinson (Kirik et al, 1998).

Para avaliar a eficácia da lesão na via nigra-estriatal induzida pela administração de 6-OHDA, foram analisados os níveis da enzima TH, no estriado e na *substantia nigra*, por imunohistoquímica e *Western blot*, e os conteúdos de dopamina e DOPAC no estriado por HPLC, em vários tempos após a injeção de 6-OHDA. A TH cataliza a reacção inicial da biossíntese da dopamina (conversão de tirosina em L-dopa), e por isso é utilizada como um marcador dos neurónios dopaminérgicos. O DOPAC é um metabolito na degradação da dopamina pela MAO (figura 2). Alterações no quociente dopamina/DOPAC indicam alterações no *turnover* da dopamina.

3.1.1 Injeção única de 6-OHDA no estriado dorsal

A figura 10 apresenta os resultados da imunohistoquímica para TH em cortes coronais do encéfalo obtidos 6, 9 e 28 dias após a injeção estereotáxica unilateral de 20 µg de 6-OHDA no estriado. Os resultados mostram uma pequena diminuição da imunoreactividade da TH no estriado ipsilateral comparativamente ao estriado

contralateral, e que a lesão não parece aumentar entre 6 e 28 dias após a injeção da 6-OHDA. Na *substantia nigra* observou-se uma diminuição progressiva da imunoreactividade da TH, ainda pouco evidente aos 6 dias, mais extensa aos 9 dias, e aos 28 dias parece ter havido uma perda total dos neurónios. A marcação para TH na VTA não parece ter sido afectada, mesmo 28 dias após a cirurgia, o que indica que a administração da 6-OHDA foi feita correctamente na zona dorsal para onde projectam os neurónios da *substantia nigra*, e não atingiu as zonas do estriado onde terminam os neurónios dopaminérgicos da VTA. A perda de imunoreactividade de TH no estriado e na *substantia nigra* sugere que houve degeneração dos neurónios dopaminérgicos iniciada pela destruição dos terminais no estriado, que se observa aos 6 dias, e que induziu a degeneração retrógrada dos neurónios dopaminérgicos evidenciada pelo

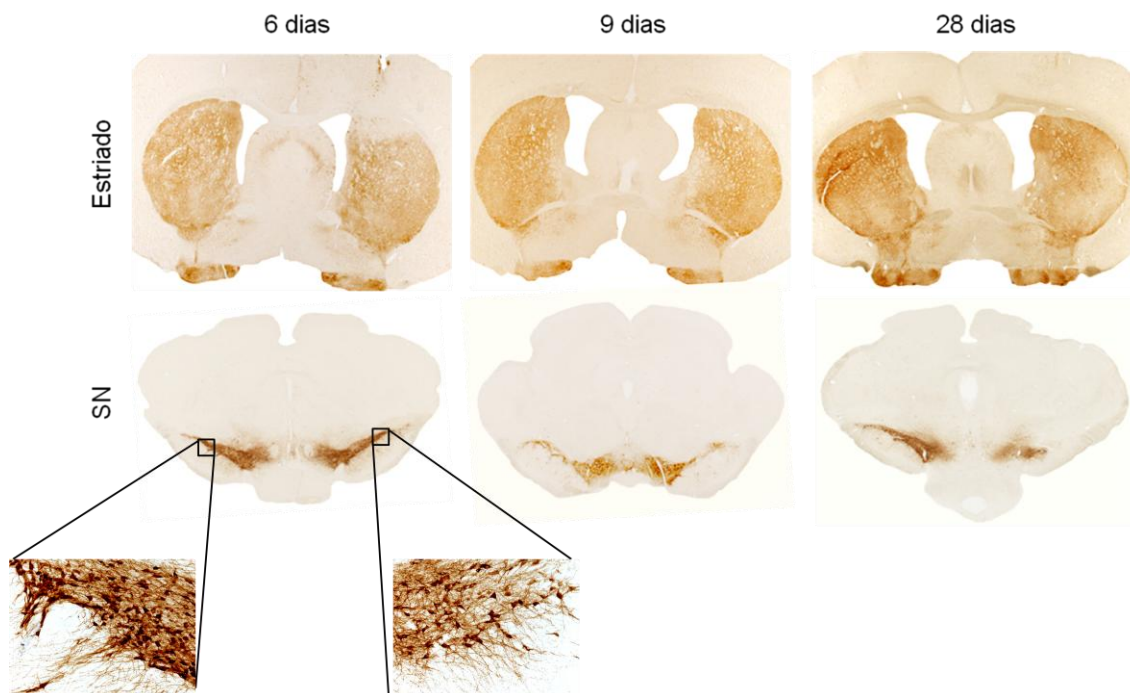


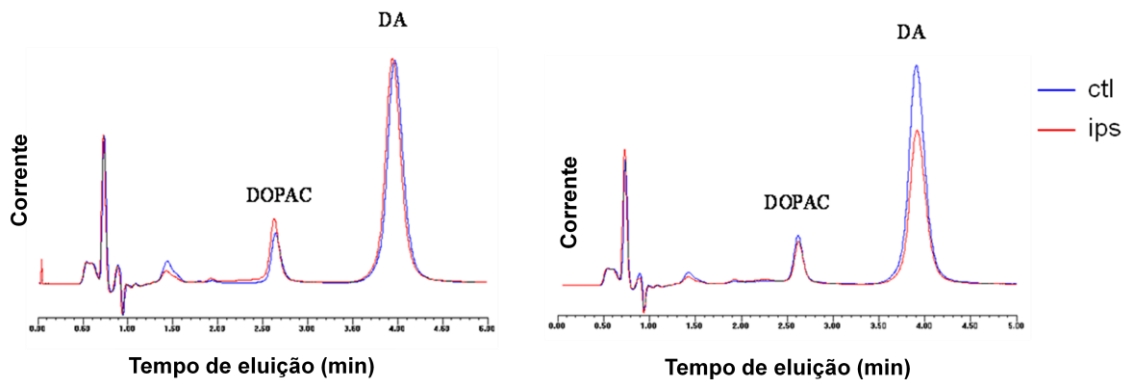
Figura 10. Imunohistoquímica para TH de cortes coronais do encéfalo ao nível do estriado e da *substantia nigra* (SN) após injeção de 6-OHDA na região dorsal do estriado no hemisfério esquerdo. As fatias foram obtidas 6, 9 e 28 dias após a injeção unilateral de 20 µg 6-OHDA. Na figura, o hemisfério lesado (ipsilateral) está do lado direito. As secções foram observadas com objectiva de ampliação 1,25x, e as ampliações da *substantia nigra* foram adquiridas com uma objectiva de 20x.

desaparecimento progressivo da imunoreactividade da TH na *substantia nigra*.

Determinou-se também o efeito da administração de 6-OHDA no conteúdo de dopamina e do seu metabolito, DOPAC, por HPLC em amostras de estriado. Como a dopamina é sintetizada nos terminais dos neurónios dopaminérgicos que se projectam da *substantia nigra pars compacta* para o estriado, a quantificação desta catecolamina e do seu metabolito foi realizada unicamente ao nível do estriado. A figura 11A apresenta os cromatogramas representativos da separação de dopamina e DOPAC em amostras de estriado ipsilateral e do contralateral de um rato controlo injectado intra-estriatalmente com solução veículo, e de um rato injectado com 6-OHDA. Em cada cromatograma observam-se os picos do DOPAC e da dopamina com tempos de retenção de 2,70 e 4 min, respectivamente. No animal injectado com a solução veículo não foram observadas diferenças no conteúdo de dopamina entre o lado ipsilateral e o contralateral, enquanto que no animal injectado com 6-OHDA, os níveis da catecolamina diminuíram significativamente no estriado ipsilateral. A figura 11B mostra os valores médios de dopamina e DOPAC obtidos no estriado 6 e 9 dias após a cirurgia estereotáxica. Nos animais injectados com solução veículo não foram detectadas diferenças. No grupo de animais injectados com 6-OHDA observou-se uma diminuição estatisticamente significativa dos níveis de dopamina no lado lesado comparativamente ao não lesado, para ambos os períodos de tempo. De notar, que aos 9 dias essa diminuição não foi tão grande. Relativamente aos níveis de DOPAC, não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre o lado ipsilateral e contralateral.

A. Controlo (solução veículo)

6-OHDA



B.

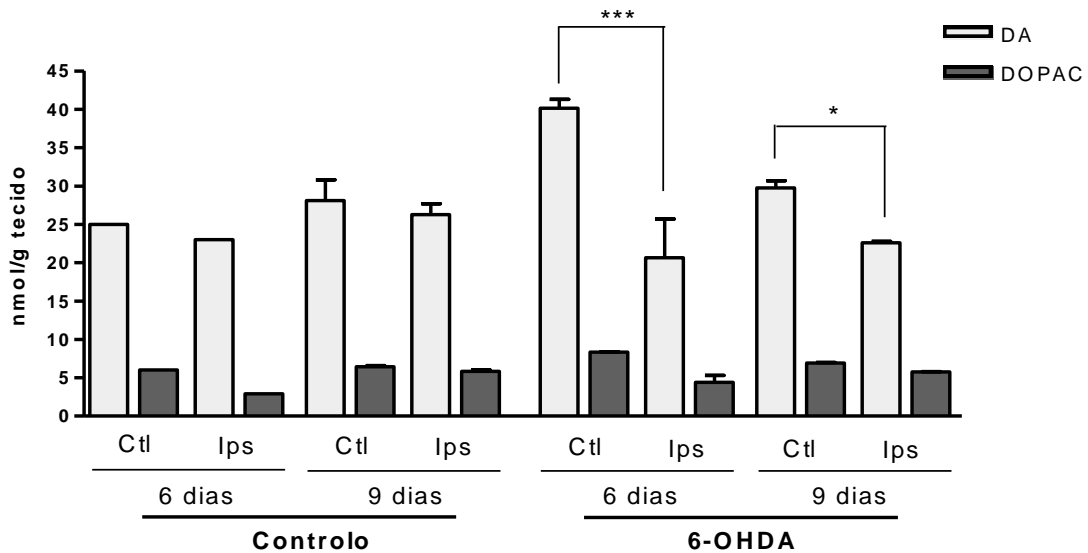


Figura 11. Efeito da injeção intra-estriatal de 6-OHDA nos níveis de dopamina (DA) e do seu metabolito DOPAC no estriado, determinados por HPLC. A. Cromatogramas representativos da separação por HPLC de DOPAC e DA em amostras de estriado ipsilateral (Ips) e contralateral (Ctl), 9 dias após a cirurgia, de um rato injectado com solução veículo (Controlo) e de um rato injectado com 20 µg de 6-OHDA. B. Quantificação dos níveis estriatais de DA e DOPAC em animais controlo (injecção da solução veículo) e em animais injectados com 6-OHDA, 6 ou 9 dias após a cirurgia. Os resultados foram expressos em nmol de catecolaminas/g de tecido húmido, e representam as médias dos resultados obtidos em 2 animais. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ significativamente diferente do contralateral (One-way ANOVA seguido do teste Bonferroni).

Os resultados obtidos para o conteúdo de dopamina do estriado, em conjunto com os obtidos da imunohistoquímica para a TH, sugerem que a administração de 6-OHDA induziu uma degeneração parcialmente reversível dos terminais dopaminérgicos, uma vez que as diferenças no conteúdo de dopamina entre o estriado ipsilateral e o contralateral são maiores aos 6 dias do que aos 9 dias após a cirurgia, sugerindo uma resposta compensatória em resposta à lesão.

3.1.2 Injecção dupla de 6-OHDA no estriado dorsal

Como não se obteve uma lesão dopaminérgica muito intensa, particularmente a nível do estriado, que evidenciava uma recuperação 9 dias após a injecção, decidiu-se testar um protocolo de injecção dupla de 6-OHDA (Kirik et al, 1998). Além da injecção de 15 ug de 6-OHDA na região dorsal do estriado rostral, realizou-se uma segunda injecção também de 15 ug de 6-OHDA numa região mais posterior e dorso-lateral do estriado. A administração intra-estriatal da solução veículo não foi realizada para esta situação, pelo facto não ter havido lesão de neurónios na injecção única.

A figura 13 mostra que com a injecção dupla de 6-OHDA houve um aumento gradual da degeneração dopaminérgica entre 1 e 22 dias após a injecção. Verifica-se que a 6-OHDA induziu primeiro um efeito tóxico directo nos axónios dopaminérgicos na área circundante do local da injecção e posteriormente degeneraram os terminais dopaminérgicos mais afastados. De realçar que com a dupla injecção não houve recuperação da degeneração dos terminais dopaminérgicos no estriado. Com este protocolo observou-se que logo 1 dia após a injecção da neurotoxina ocorreu degeneração de alguns corpos celulares dos neurónios na *substantia nigra*. Aos 6 dias, a degeneração na *substantia nigra* foi mais acentuada, e aos 22 dias observou-se uma depleção quase completa dos corpos celulares no lado ipsilateral. De notar que os neurónios dopaminérgicos da VTA não sofreram degeneração.

Estes resultados demonstraram que a dupla injeção intra-estriatal de 6-OHDA induziu uma destruição mais rápida e pronunciada dos neurónios dopaminérgicos da via nigra-estriatal do que a administração de 6-OHDA apenas num local do estriado (figura 10).

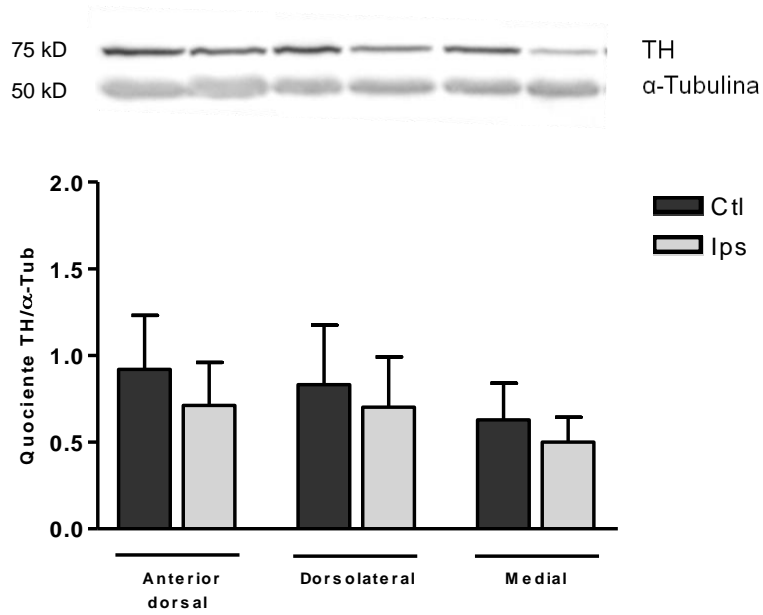


Figura 13. Imunohistoquímica para TH em cortes coronais do encéfalo ao nível do estriado e *substantia nigra* após injeção dupla de 6-OHDA no estriado do hemisfério esquerdo. As fatias foram obtidas 1, 6 e 22 dias após a dupla injeção de 6-OHDA (30 µg no total). As secções estão montadas na figura de um modo sequencial (anterior → posterior). Por isso, o hemisfério esquerdo onde foi feita a lesão está posicionado no lado direito. Imagens observadas na objectiva de ampliação 1,25x.

Para melhor avaliar a extensão da lesão dopaminérgica, procedeu-se à quantificação por *Western blot*, dos níveis de TH em três regiões distintas do estriado (anterior dorsal, dorsolateral e medial), e na *substantia nigra*, decorridos 1 ou 6 dias após a dupla administração intra-estriatal de 6-OHDA (figura 14). Os resultados mostram uma pequena diminuição, embora não atinja significância estatística, da imunoreactividade da TH nas regiões do estriado ipsilateral relativamente ao contralateral, 1 dia após a lesão. Aos 6 dias observou-se uma diminuição significativa da TH nas três regiões do estriado. Na *substantia nigra*, visualizou-se uma redução dos níveis desta proteína no lado ipsilateral quando comparado com o lado contralateral, no entanto, as diferenças apresentadas entre ambos os lados não foram estatisticamente significativas.

Estes resultados estão de acordo com os obtidos na imunohistoquímica (figura 13), uma vez que a diminuição obtida nos níveis de TH no estriado ipsilateral está relacionada com a degeneração dos terminais dos neurónios dopaminérgicos e por conseguinte, uma progressiva degeneração dos seus corpos celulares ao nível da *substantia nigra*. Deste modo, os resultados, globalmente sugerem que o efeito da 6-OHDA induziu a morte retrógrada dos neurónios dopaminérgicos da via nigra-estriatal.

A. 1 dia



B. 6 dias

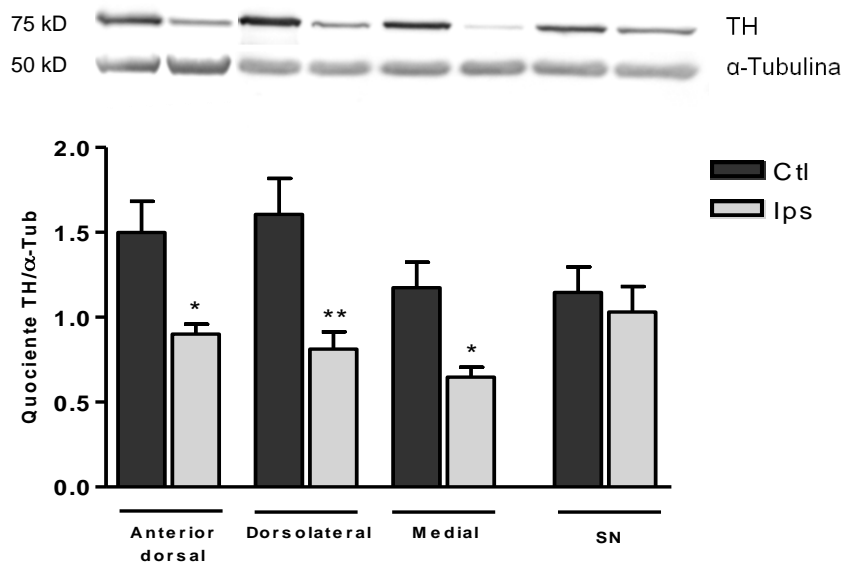


Figura 14. Efeito da injeção intra-estriatal de 6-OHDA nos níveis de TH no estriado e na *substantia nigra*. Os animais foram injectados em dois locais do estriado com 6-OHDA (30 μ g no total) no hemisfério esquerdo. Decorridos 1 e 6 dias, o estriado foi dissecado em 3 regiões (anterior dorsal, dorsolateral e medial) e os níveis de TH foram determinados por *Western blot*. A figura mostra imagens representativas das membranas reveladas para TH e para α -tubulina 1 dia (A) e 6 dias (B) após a cirurgia. Também foi feita a análise da TH na *substantia nigra* (SN) 6 dias após a injeção. Os resultados quantitativos representam a média \pm desvio padrão dos resultados obtidos em 3 a 6 animais. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ significativamente diferente do contralateral (One-way ANOVA seguido do teste Bonferroni).

3.2 Efeito da lesão da via nigra-estriatal na expressão dos receptores A2a

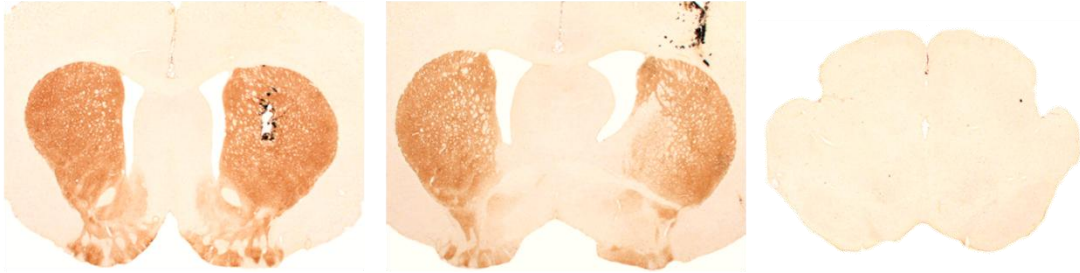
Depois de se ter confirmado que a administração intra-estriatal de 6-OHDA causava degeneração progressiva dos neurónios da via nigra-estriatal, fomos investigar o efeito da lesão dopaminérgica na expressão dos receptores A2a da adenosina, por imunohistoquímica, e por *immunoblot* de extractos proteicos do estriado. A figura 15 mostra que os receptores A2a são altamente expressos no estriado e no bolbo olfatório, mas não na *substantia nigra* onde não se observou imunoreactividade para o receptor A2a. Com esta técnica não se observou alteração do conteúdo dos receptores A2a no estriado após a injeção de 6-OHDA, comparativamente com o estriado contralateral, em qualquer dos três períodos de tempo analisados.

No entanto, na análise por *Western blot* observámos alteração da densidade das bandas marcadas pelo anticorpo contra o receptor A2a, 1 e 6 dias após a cirurgia estereotáxica (figura 16). Foram encontradas duas bandas marcadas pelo anticorpo em todos os extractos proteicos. A banda inferior apresenta aproximadamente 50 kD e a banda superior é cerca de 70 kD. O peso molecular de ambas as bandas não está de acordo com o peso molecular do receptor A2a mais frequentemente encontrado na literatura (42 kD). Embora não tenhamos conseguido demonstrar inequivocamente a especificidade destas bandas, o facto de haver diferenças significativas e consistentes entre o lado lesado e o lado contralateral, leva-nos a colocar a hipótese que a banda de 70 kD resulta da oligomerização dos receptores A2a ou da heteroligomerização com outros receptores, por exemplo com os receptores D2 da DA já descrita no estriado (revisão por Fuxe et al, 2007). O facto de ter sido utilizado um tampão de extracção com uma força detergente moderada é consistente com esta hipótese, mas deverá ser testado.

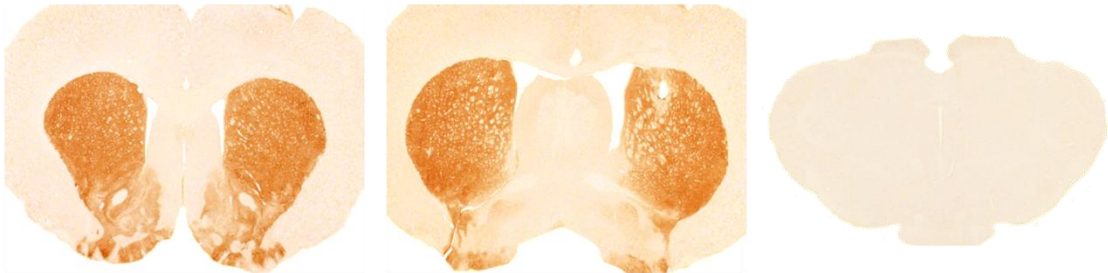
A lesão afectou diferencialmente as duas bandas potenciais do receptor A2a. Enquanto que a lesão aumentou consistentemente a banda de 70 kD, decorridos 1 ou

6 dias após a cirurgia particularmente na região dorsolateral, na banda de 50 kD não houve alterações significativas (figura 16).

1 dia



6 dias



22 dias

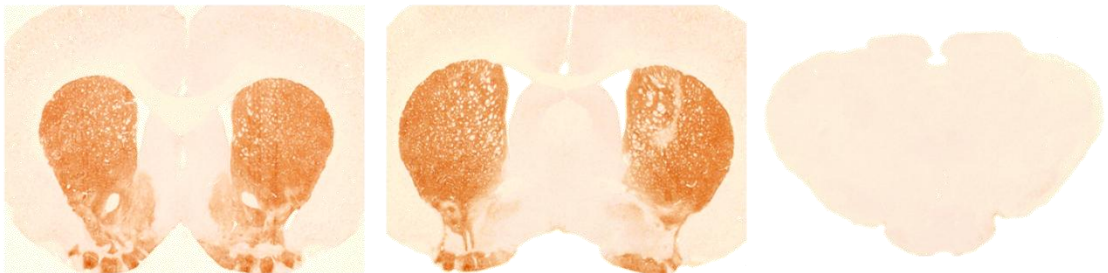
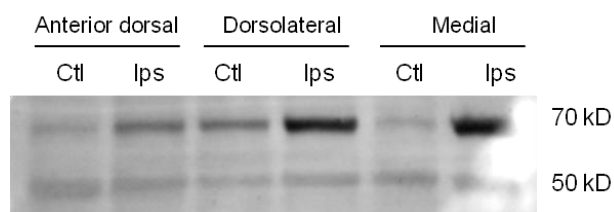
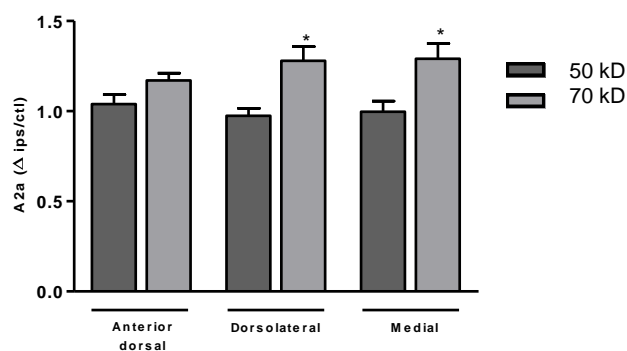


Figura 15. Imunohistoquímica para os receptores A2a da adenosina em cortes coronais do estriado e *substantia nigra* após injeção de 6-OHDA na região dorsal do estriado no hemisfério esquerdo. As fatias foram obtidas 1, 6 e 22 dias após a dupla injeção unilateral de 6-OHDA no estriado. Na figura encontram-se representados dois cortes do estriado (um ao nível rostral e o outro mais caudal) e um corte relativo à *substantia nigra*. O lado ipsilateral fica posicionado no lado direito. Imagens observadas na objectiva de ampliação 1,25x.

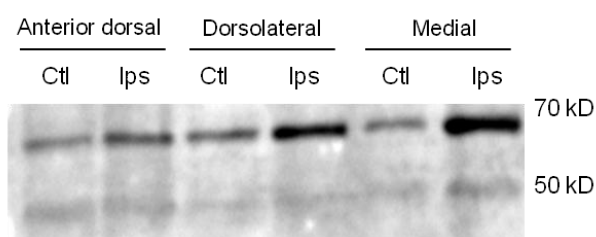
A. 1 dia



B.



C. 6 dias



D.

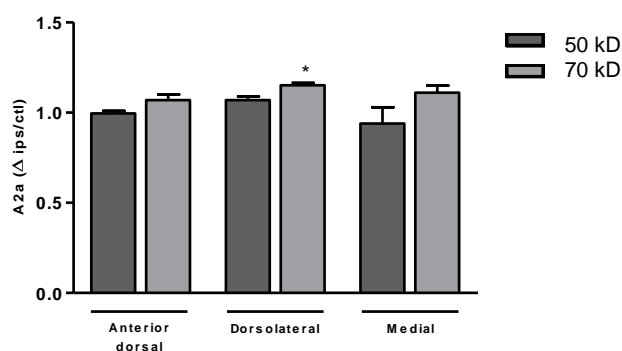


Figura 16. Efeito da administração intra-estriatal de 6-OHDA na expressão dos receptores A2a no estriado. Os animais foram injectados com 30 µg de 6-OHDA no hemisfério esquerdo e os níveis dos receptores A2a foram determinados por *Western blot*, 1 ou 6 dias após a cirurgia estereotáxica. (A, C) Imagens representativas da marcação de membranas com o anticorpo A2a. (B, D) Quantificação do efeito da lesão nas bandas de 50 e 70 kD avaliado pelo quociente entra a intensidade das bandas no estriado ipsilateral e a intensidade no estriado contralateral. Os resultados quantitativos representam a média ± desvio padrão dos resultados obtidos em 2 a 6 animais. * $p < 0,05$ comparativamente ao contralateral (One-way ANOVA seguido do teste de Dunnett).

Com o objectivo de identificar os tipos de células que expressam o receptor A2a no estriado, e potenciais alterações após a lesão da via nigra-estriatal, foram realizadas experiências de imunofluorescência nas secções coronais do encéfalo utilizando marcadores para os neurónios dopaminérgicos (TH) e para os astrócitos (GFAP). Os resultados apresentados na figura 17 mostram que a destruição dos terminais dopaminérgicos está associada a uma grande proliferação de astrócitos, evidenciada pelo aumento da imunoreactividade para GFAP na região onde foi injectada a 6-OHDA e houve uma completa destruição dos terminais dopaminérgicos (área 4), e na transição (área 2) entre a lesão e regiões não afectadas. Nas zonas não atingidas pela lesão, em que não houve destruição dos terminais dopaminérgicos (área 3) não foram visualizadas diferenças na imunoreactividade para GFAP relativamente ao lado contralateral (área 1).

Houve também um aumento muito significativo da marcação para os receptores A2a em células com aparência de astrócitos, no lado lesado comparativamente com o lado contralateral, mas apenas na região de transição (área 2) entre a lesão e regiões não afectadas. Interessante notar que nas regiões onde houve completa destruição dos terminais dopaminérgicos (área 4) e onde ocorreu uma extensa proliferação de astrócitos, estes não expressam receptores A2a. Além disso, nas zonas de transição (área 2) observa-se que há maior expressão de receptores A2a nas zonas em que houve um aumento da expressão de TH (área 2a com terminais intensamente brilhantes) quando comparada com a zona adjacente com menor expressão da TH (área 2b). Estas observações sugerem uma relação entre receptores A2a e sobrevivência e/ou reparação dos terminais dopaminérgicos.

Na figura 17 pode ainda observa-se que não há co-localização entre receptores A2a e TH, indicando que os terminais dopaminérgicos não possuem receptores A2a, pelo menos em grande quantidade. Pode ainda observar-se imunoreactividade para A2a em células não marcadas para GFAP nem para TH que

poderão corresponder a neurónios GABAérgicos ou a terminais glutamatérgicos no estriado.

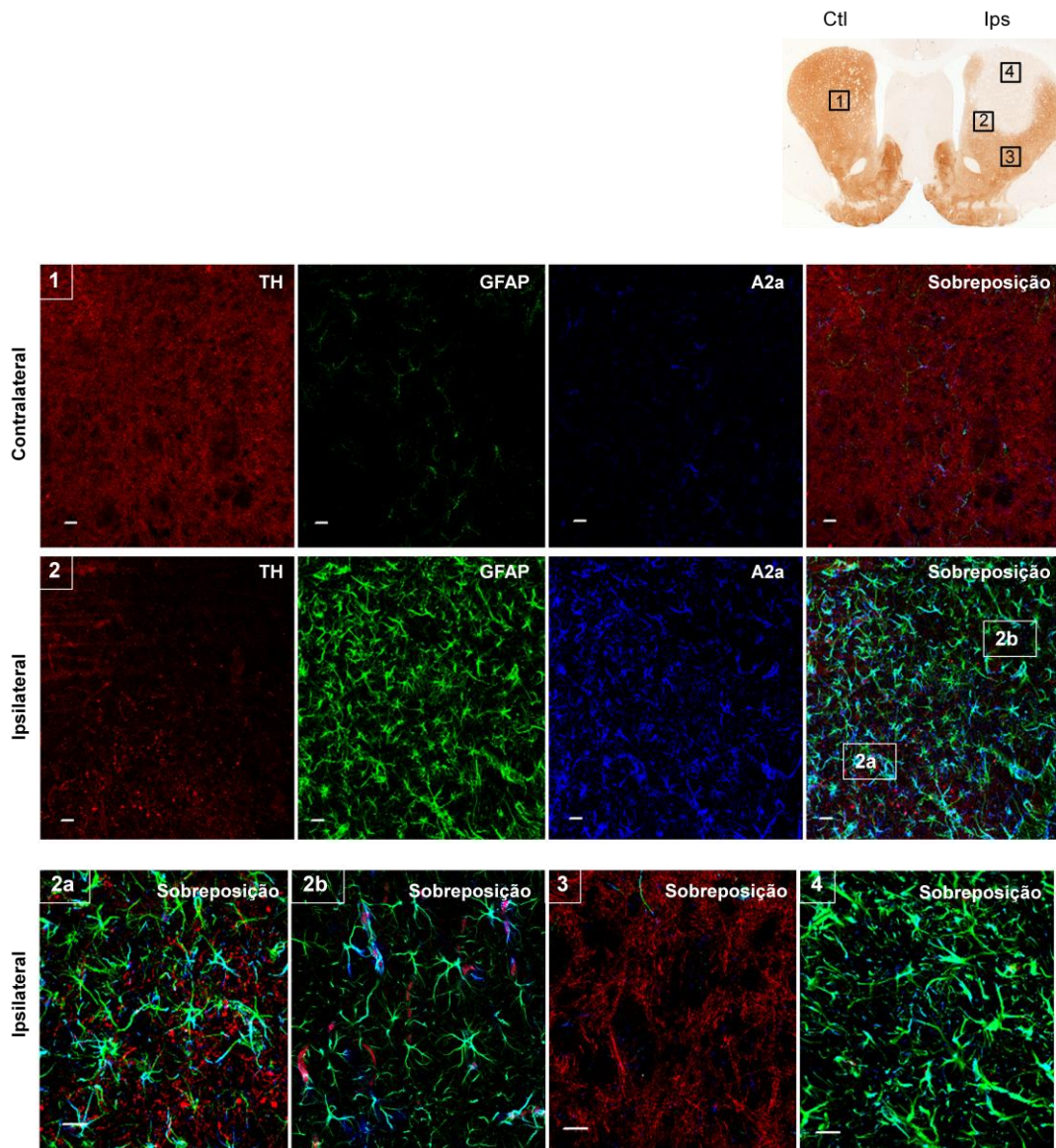


Figura 17. Efeito da lesão pela 6-OHDA na expressão dos receptores A2a em várias regiões do estriado: estriado contralateral (1), estriado ipsilateral em duas regiões de transição entre a lesão e zonas não afectadas (2a e 2b) e zona ipsilateral não lesada (3). Cortes coronais obtidos 6 dias após a injeção estereotáxica de 6-OHDA foram processados para imunohistoquímica de fluorescência e triplamente marcados para os receptores A2a (azul), neurónios dopaminérgicos (TH, vermelho) e astrócitos (GFAP, verde). As preparações foram observadas por microscopia confocal, obtendo-se imagens de vários planos da fatia. As imagens mostradas são a reconstrução 3D duma fatia óptica com aproximadamente 10 μm de espessura. Tendo em conta a marcação para a TH, escolheram-se várias regiões do estriado para aquisição de imagem. Os números presentes no canto superior esquerdo das imagens correspondem às diferentes regiões do estriado onde as imagens foram adquiridas. Ctl - contralateral; Ips - ipsilateral. Barra de escala = 20 μm .

Ao contrário do observado na imunohistoquímica, a presença de receptores A2a ao nível da *substantia nigra* foi detectada por imunofluorescência (figura 18), mas a lesão não afectou a expressão de receptores na *substantia nigra*. Os receptores A2a parecem não existir na região dos corpos celulares dos neurónios dopaminérgicos (*substantia nigra pars compacta*) mas sim na região dos prolongamentos (*substantia nigra pars reticulata*). As células imunoreactivas para o GFAP também apresentaram uma distribuição semelhante à dos receptores A2a. O efeito da lesão que promoveu, no estriado, um aumento acentuado da proliferação de astrócitos, na *substantia nigra* esse aumento não foi notório. Observou-se que os receptores A2a são também expressos pelas células imunoreactivas para GFAP, dado existir uma co-localização entre a imunoreactividade para GFAP e A2a, o mesmo não se observou para a imunoreactividade da TH e A2a, sugerindo desde modo, que os neurónios dopaminérgicos não expressam este tipo de receptor. Existem também astrócitos que não expressam o receptor A2a.

Globalmente estes resultados sugerem a presença de receptores A2a também na *substantia nigra*, apesar de não terem sido detectados na imunohistoquímica pelo método streptavidina-biotina e revelação com DAB (figura 15), provavelmente devido a diferenças na sensibilidade da detecção dos dois métodos e na capacidade da microscopia confocal.

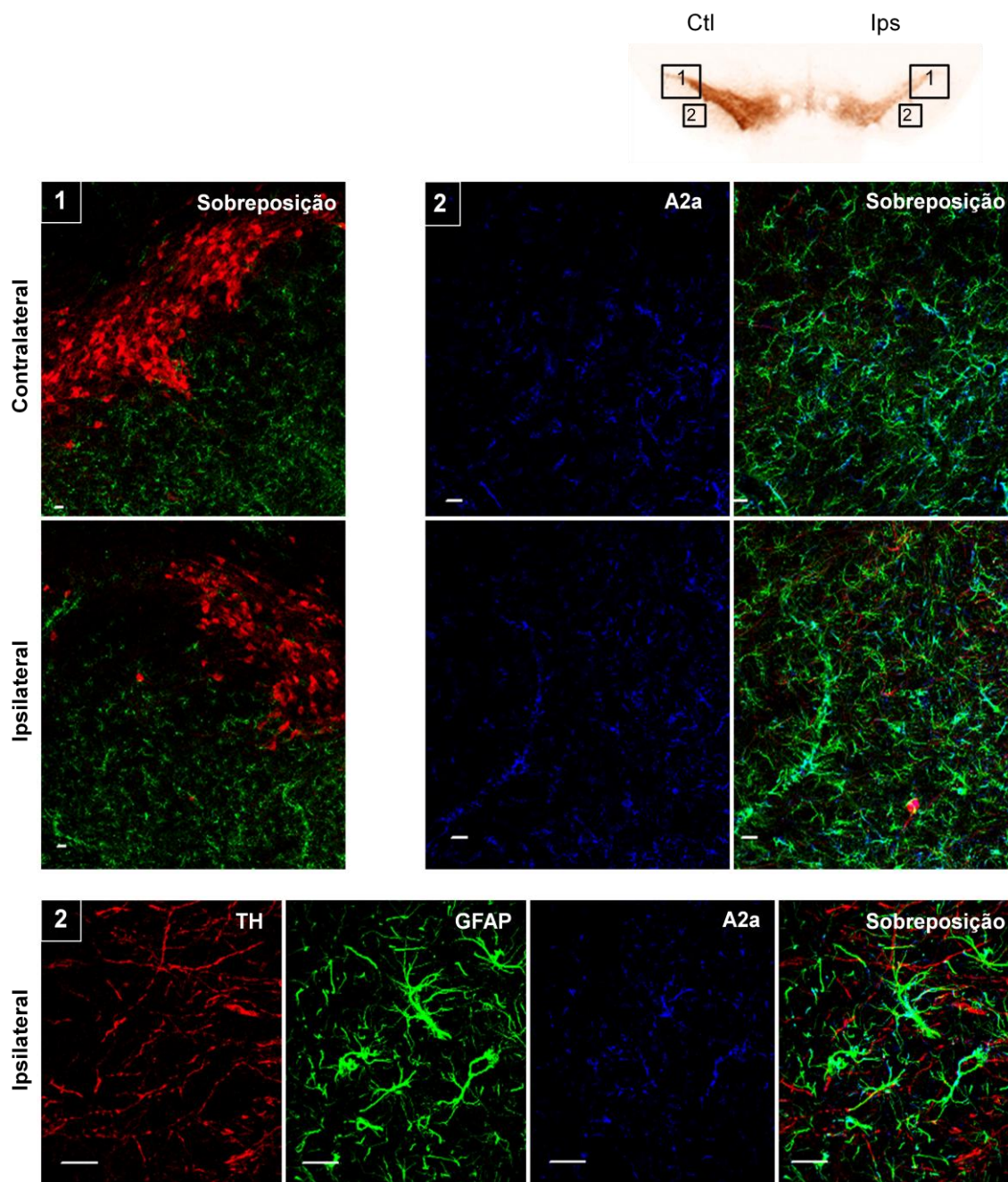


Figura 18. Expressão dos receptores A2a na *substantia nigra*. Cortes coronais processados por imunohistoquímica de fluorescência triplamente marcados os receptores A2a (azul), neurónios dopaminérgicos (TH, vermelho) e astrócitos (GFAP, verde). As fatias foram obtidas 6 dias após a dupla injeção unilateral de 6-OHDA no estriado. As preparações foram observadas por microscopia confocal, obtendo-se imagens de vários planos da fatia. As imagens mostradas são a reconstrução 3D duma fatia óptica com aproximadamente 10 µm de espessura. Tendo em conta a marcação para a TH, escolheu-se as regiões da *substantia nigra* para aquisição de imagem. Os números presentes no canto superior esquerdo das imagens correspondem às diferentes regiões da *substantia nigra* onde as imagens foram adquiridas. Ctl - contralateral; Ips - ipsilateral. Barra de escala = 20 µm.

3.3 Efeito da lesão da via nigra-estriatal na expressão dos receptores A1 da adenosina

Embora os receptores A2a sejam objecto de maior interesse na doença de Parkinson, devido aos efeitos já comprovados dos antagonistas A2a no controlo dos sintomas motores, analisou-se também por imunohistoquímica o efeito da lesão dos neurónios dopaminérgicos na expressão dos receptores A1 no estriado e na *substantia nigra* decorridos 1, 6 e 22 dias após a injeção de 6-OHDA (figura 19). Observou-se um aumento da imunoreactividade para o receptor A1 no estriado ipsilateral em comparação com o contralateral em qualquer dos três períodos de tempo analisados. Em secções mais posteriores do estriado visualizou-se um aumento localizado da imunoreactividade para o receptor A1 numa região medial. Na *substantia nigra* observou-se também um aumento pronunciado da expressão dos receptores A1 no lado ipsilateral. A figura 19 mostra ainda que estes receptores estão expressos no córtex, estriado, bulbo olfatório e *substantia nigra*, apresentando deste modo, uma distribuição mais ubíqua no encéfalo do que os receptores A2a.

Foram realizados também estudos de imunofluorescência em cortes coronais do encéfalo usando marcadores para os receptores A1, astrócitos (GFAP) e neurónios dopaminérgicos (TH) no estriado e *substantia nigra*, para identificar os tipos de células que expressam este receptor e analisar a sua expressão após lesão da via nigra-estriatal promovida pela administração da 6-OHDA. Pela análise da figura 20, concluiu-se que no estriado os receptores A1 são pouco abundantes, mas após lesão dopaminérgica verifica-se um aumento bastante acentuado da sua expressão. Numa zona com extensa lesão (área 2 da figura 20) observou-se imunoreactividade para A1 co-localizada com TH em células com morfologia de neurónio. Verificou-se que na região onde os receptores A1 são mais expressos, a imunoreactividade para TH também aumenta. Nessa região, visualizou-se co-localização entre os receptores e TH, sugerindo expressão dos receptores A1 nos terminais dopaminérgicos.

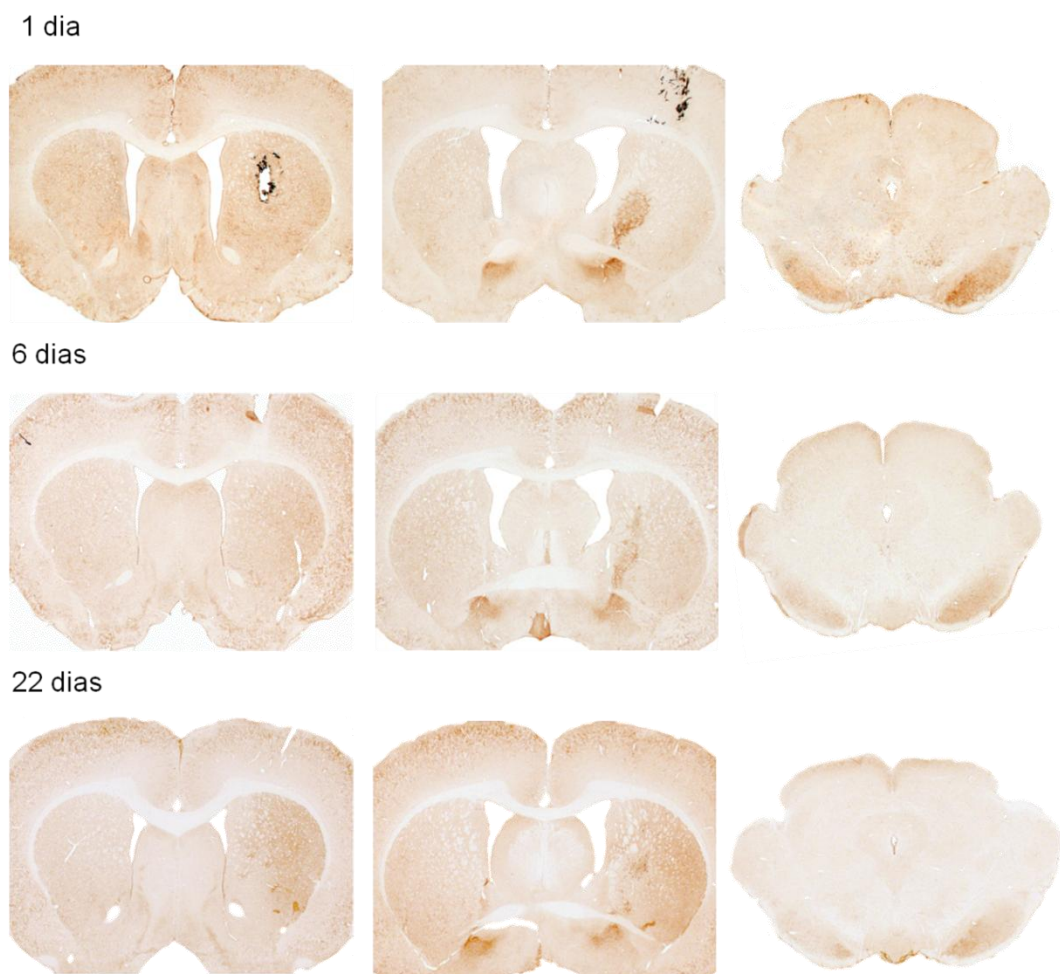


Figura 19. Imunoistoquímica para os receptores A1 da adenosina de cortes coronais do encéfalo ao nível do estriado e da *substantia nigra* após injeção unilateral de 6-OHDA na região dorsal do estriado. As fatias foram obtidas 1, 6 e 22 dias após a dupla injeção de 6-OHDA na região dorsal do estriado no hemisfério esquerdo. Na figura mostram-se dois cortes do estriado (um mais rostral e o outro mais caudal) e um corte relativo à *substantia nigra*. O lado ipsilateral encontra-se do lado direito na figura. Imagens observadas na objectiva de ampliação 1,25x.

Na *substantia nigra* os receptores A1 localizam-se no soma de neurónios não-dopaminérgicos distribuídos na zona *pars reticulata*. Observou-se também que a lesão causada pela 6-OHDA induziu o aumento da expressão destes receptores (figura 21).

Globalmente, os resultados apresentados nas últimas secções sugerem que a lesão da via dopaminérgica nigra-estriatal promoveu aumento da expressão dos receptores A2a em astrócitos no estriado, e dos receptores A1 em neurónios dopaminérgicos no estriado, e em neurónios não-dopaminérgicos na *substantia nigra*.

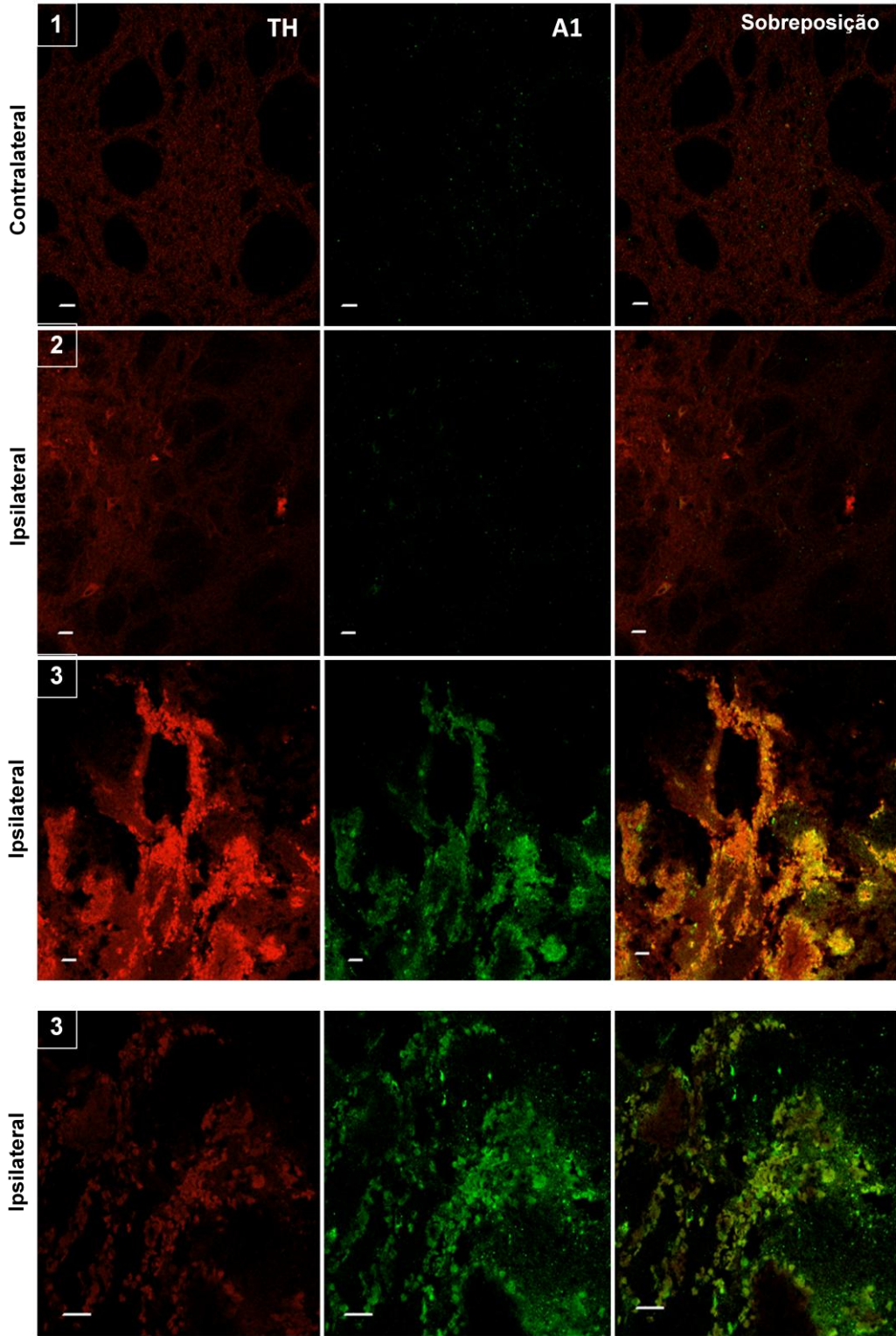
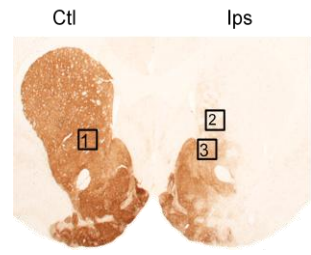


Figura 20. Efeito da administração de 6-OHDA na expressão dos receptores A1 no estriado. Cortes coronais, obtidos 22 dias após a injeção de 6-OHDA, foram processados para imunohistoquímica de fluorescência e duplamente marcados para os receptores A1 (verde) e neurónios dopaminérgicos (TH, vermelho). As preparações foram observadas por microscopia confocal, obtendo-se imagens de vários planos da fatia. As imagens mostradas são a reconstrução 3D duma fatia óptica com aproximadamente 10 µm de espessura. Tendo em conta a marcação para a TH, escolheram-se as regiões do estriado para aquisição de imagem. Os números presentes no canto superior esquerdo das imagens correspondem às regiões do estriado onde as imagens foram adquiridas. Cont - contralateral; Ips - ipsilateral. Barra de escala = 20 µm.

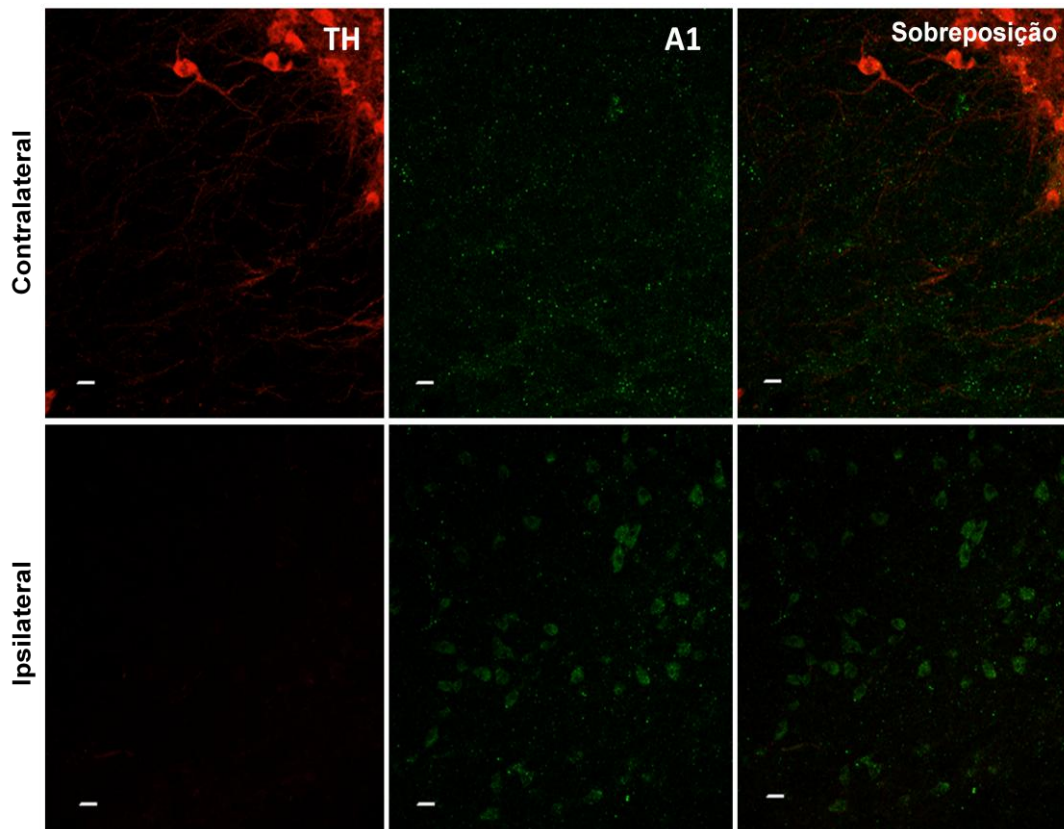


Figura 21. Efeito da administração de 6-OHDA na expressão dos receptores A1 na *substantia nigra*. Cortes coronais foram processados para imunohistoquímica de fluorescência e duplamente marcados para os receptores A1 (verde) e neurónios dopaminérgicos (TH, vermelho). As preparações foram observadas por microscopia confocal, obtendo-se imagens de vários planos da fatia. As imagens mostradas são a reconstrução 3D duma fatia óptica com aproximadamente 10 µm de espessura. Tendo em conta a marcação para a TH, escolheram-se as regiões do estriado para aquisição de imagem. Os números presentes no canto superior esquerdo das imagens correspondem às regiões do estriado onde as imagens foram adquiridas. Ctl - contralateral; Ips - ipsilateral. Barra de escala = 20 µm.

3.4 Efeito da lesão da via nigra-estriatal na expressão do factor neurotrófico GDNF

O nosso grupo mostrou anteriormente, em estudos realizados em culturas de células da *substantia nigra*, que a lesão selectiva de neurónios dopaminérgicos pode induzir o aumento da expressão de GDNF por astrócitos (Saavedra et al, 2006). Quisemos por isso ver o que acontecia num modelo in vivo, também porque os resultados publicados são muito contraditórios. A expressão do GDNF, 1, 6 e 22 dias após a cirurgia estereotáxica foi analisada por imunoblot em extractos proteicos de estriado e *substantia nigra* (figura 22). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nos níveis de GDNF entre o estriado ipsilateral e o contralateral, nem na *substantia nigra*.

Não foi possível fazer estudos de imunohistoquímica para o GDNF por se ter verificado que o anticorpo anti-GDNF não era completamente específico. Na revelação de membranas de *Western blot* foram encontradas 3 bandas marcadas pelo anticorpo (50, 37 e 30 kD). No entanto, em testes em que o anticorpo foi incubado com um excesso de GDNF antes de se fazer a incubação com as membranas, verificou-se o desaparecimento da marcação da banda de 37 kD, demonstrando a especificidade desta banda. Deste modo, foi possível quantificar o GDNF presente em extractos proteicos, mas não pudemos utilizar o anticorpo para análises imunohistoquímicas.

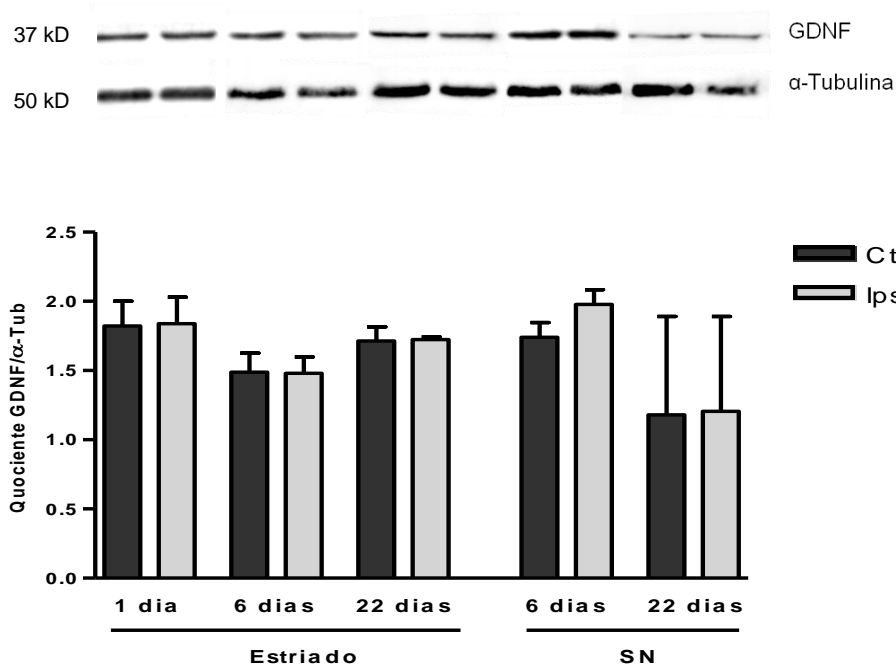


Figura 22. Efeito da administração unilateral de 6-OHDA na expressão de GDNF no estriado e *substantia nigra*. Os animais foram injectados intra-estriatalmente com 6-OHDA no hemisfério esquerdo e 1, 6 e 22 dias após a cirurgia estereotáxica os níveis de GDNF foram determinados por *Western blot*. (B) Quantificação do factor neurotrófico realizada no estriado 1, 6 e 22 dias após a cirurgia, e na *substantia nigra* após 6 e 22 dias. As imagens representativas dos imunoblots relativos aos níveis de GDNF encontram-se por cima das respectivas barras do gráfico (A). Os resultados quantitativos representam a média \pm desvio padrão dos resultados obtidos em 2 a 9 animais. Os resultados foram analisados estatisticamente usando o one-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

3.5 Efeito de ligandos dos receptores da adenosina na protecção dos neurónios dopaminérgicos em cultura de células da *substantia nigra*

Os resultados *in vivo* descritos nas secções anteriores parecem sugerir uma relação entre a expressão dos receptores da adenosina e a protecção ou tentativa de regeneração dos terminais dopaminérgicos, uma vez que se observou nas zonas de transição entre a lesão e regiões não lesadas um aumento da imunoreactividade da TH nos locais onde se observou uma maior expressão de receptores A1 e A2. Para

testar esta hipótese utilizou-se um modelo de cultura de células primárias (cultura mista de astrócitos e neurónios) da *substantia nigra* para investigar o efeito de ligandos dos receptores da adenosina na sobrevivência dos neurónios dopaminérgicos contra a toxicidade da 6-OHDA.

As células, com 4 dias em cultura, foram tratadas durante 15 min com 200 μ M de 6-OHDA. O meio com a toxina foi removido, e as células foram mantidas mais 1 dia em cultura na presença dum antagonista dos receptores A1 (DPCPX, 100 nM) ou dum antagonista dos receptores A2a (SCH58261, 50 nM) e posteriormente processadas para estudos de imunocitoquímica (figura 23). Após o tratamento com 6-OHDA as culturas não tinham qualquer neurónio dopaminérgico, enquanto que nas culturas tratadas com os antagonistas foi possível observar alguns neurónios dopaminérgicos, sugerindo que o bloqueio dos receptores teve um efeito neuroprotector contra toxicidade induzida pela 6-OHDA. No entanto, não é possível tirar conclusões pois as experiências não foram repetidas devido à dificuldade de obtermos culturas com uma percentagem normal de neurónios dopaminérgicos (entre cerca de 3 e 11%; Saavedra et al, 2006). Provavelmente, o reduzido número de neurónios dopaminérgicos pode ser devido à presença de células da microglia na cultura celular (figura 24).

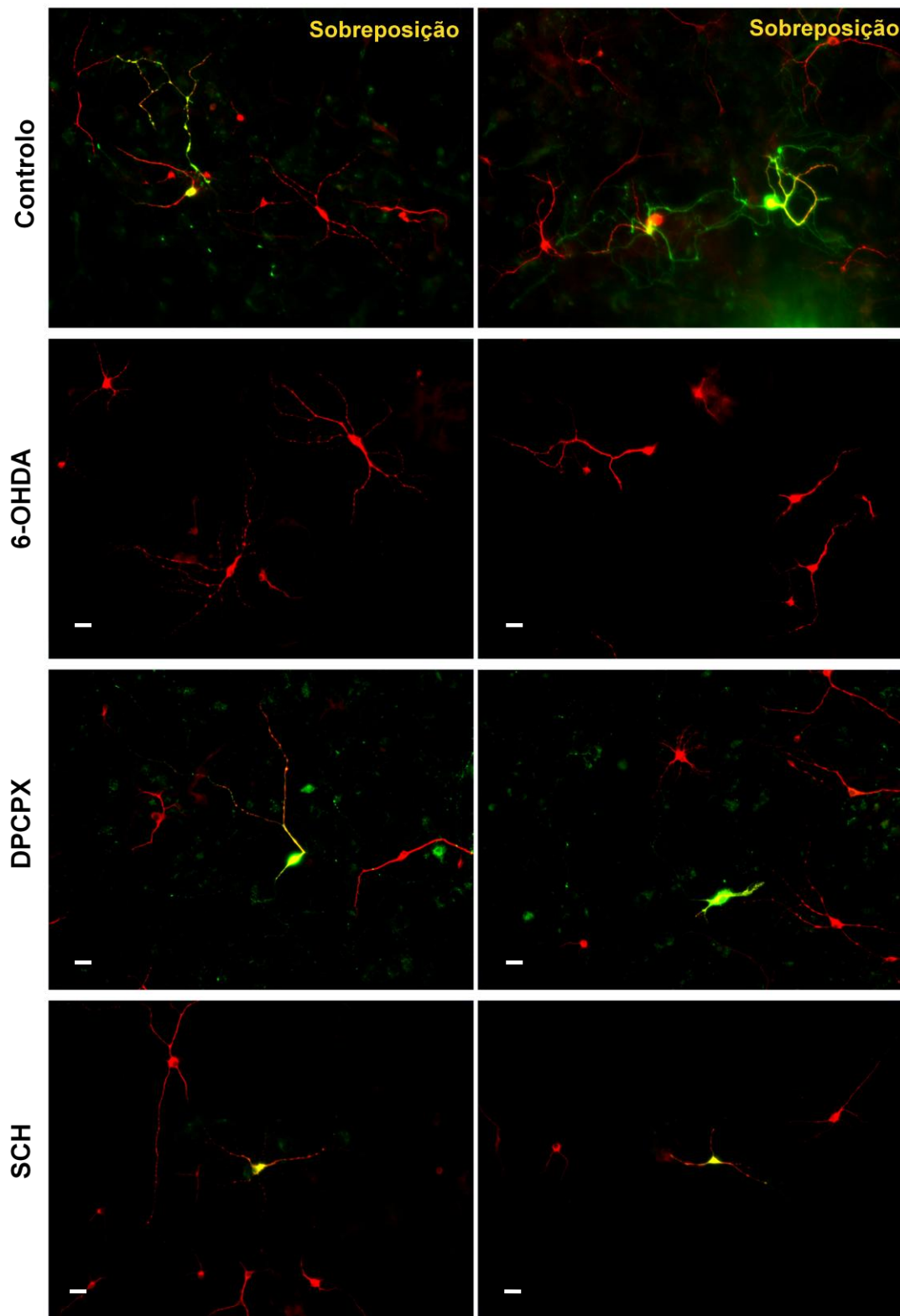


Figura 23. Efeito do tratamento das culturas da substancia nigra com 6-OHDA na sobrevivência dos neurónios dopaminérgicos na ausência ou presença de antagonistas dos receptores A1 (DPCPX) ou dos receptores A2a (SCH58261). As culturas mistas foram tratadas durante 15 min com 6-OHDA e em seguida incubadas com os antagonistas dos receptores durante 24 h. A presença de neurónios dopaminérgicos (verde) foi detectada utilizando um anticorpo anti-TH, e os neurónios não-dopaminérgicos (vermelho) usando um anticorpo anti-MAP2. Barra de escala= 20 μ m.

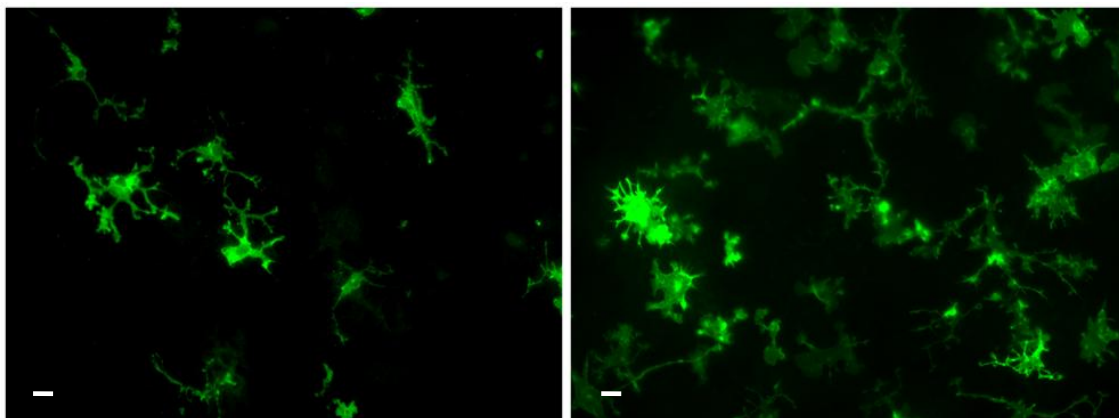


Figura 24. Presença de células da microglia na co-cultura de neurónios da *substantia nigra*. A detecção da microglia (verde) foi realizada utilizando um anticorpo anti-CD11b. Barra de escala= 20 μ m.

Capítulo 4

Discussão

4.1 Um modelo animal da doença de Parkinson em rato: degeneração dos neurónios dopaminérgicos nigra-estriatais induzida por 6-OHDA

Neste trabalho estabelecemos no laboratório um modelo animal da doença de Parkinson induzido pela injeção unilateral da neurotoxina 6-OHDA no estriado de rato, com o objectivo de investigar o efeito da degeneração dos neurónios dopaminérgicos na expressão dos receptores A2a e A1 da adenosina e do factor neurotrófico GDNF no estriado e na *substantia nigra*, e possíveis consequências na sobrevivência dos neurónios dopaminérgicos.

Verificámos que a injeção de 6-OHDA num único local do estriado dorsal induziu uma degeneração dos terminais dopaminérgicos no estriado pouco extensa, e parcialmente reversível, como mostram a imunoreactividade da TH e a quantificação da dopamina por HPLC. Não obstante a destruição moderada dos terminais dopaminérgicos no estriado, observou-se uma perda significativa de corpos celulares na *substantia nigra*. A diminuição progressiva da TH na *substantia nigra* ipsilateral, entre os 6 e os 28 dias após a injeção de 6-OHDA no estriado, é compatível com a hipótese da degeneração retrógrada dos neurónios dopaminérgicos iniciada pela destruição dos seus terminais no estriado (revisão por Blum et al, 2001; Blandini et al, 2007).

A administração da toxina em dois locais do estriado produziu uma lesão muito mais intensa e progressiva dos terminais dopaminérgicos no estriado, e uma degeneração mais rápida dos neurónios na *substantia nigra*, observável logo 1 dia após a cirurgia (figura 13). A quantificação da TH mostrou diminuições da ordem de 40 a 60% relativamente ao estriado contralateral, mas não observámos grandes diferenças na extensão da lesão das várias sub-regiões do estriado (figura 14), que pudéssemos correlacionar com a zona da injeção da 6-OHDA. No entanto, 6 dias após a cirurgia observámos uma redução dos níveis da TH mais significativa na região dorsolateral em comparação com as regiões dorsal anterior e medial (figura 14B). O carácter progressivo da diminuição da imunoreactividade da TH no estriado sugere

que após a destruição directa dos terminais dopaminérgicos pela 6-OHDA nas regiões adjacentes à injeção, houve a propagação da lesão, provavelmente porque a destruição dos terminais nervosos induziu processos inflamatórios, como a astrogliose (figura 17) e activação da microglia que podem potenciar a neurodegeneração (revisão por McGeer et al, 2008).

A perda de neurónios na *substantia nigra* foi muito extensa, como evidencia a diminuição da imunoreactividade para a TH, mas não foram detectadas diferenças significativas nos níveis de TH por *Western blot* provavelmente devido à dificuldade na dissecação da *substantia nigra*. O facto de se continuar a observar imunorreactividade para a TH na VTA indica que a lesão pela 6-OHDA afectou selectivamente os neurónios dopaminérgicos da *substantia nigra*, reproduzindo assim esta característica da doença de Parkinson.

Os nossos resultados estão de acordo com os obtidos por Kirik et al (1998) que compararam as lesões causadas por injeção de 6-OHDA em vários locais do estriado para estabelecer os parâmetros óptimos para uma lesão estável, de magnitude suficiente em relação tanto à extensão da degeneração dos terminais do estriado bem como à perda de células dopaminérgicas na *substantia nigra*. Estes investigadores demonstraram que quando a neurotoxina era distribuída por múltiplos locais de injeção ao longo do eixo rostrocaudal do estriado (correspondente ao CPu dos Primatas) se verificava uma lesão mais semelhante à degeneração progressiva que ocorre na doença de Parkinson. Por isso, este tipo de protocolo tem vantagens relativamente à injeção da toxina no feixe cerebral medial (MFB) que induz a perda total dos neurónios dopaminérgicos. Numa lesão parcial do estriado permanecem algumas projecções nigra-estriatais intactas, que podem servir como “substrato” para a re-inervação e recuperação funcional (Bjorklund et al, 1997; Stanic et al, 2003). Em situações de depleção dopaminérgica não muito intensa, vários mecanismos de compensação neuronal podem ser activados, incluindo o aumento da expressão da TH, e conseqüente aumento da libertação de dopamina pelos terminais

dopaminérgicos remanescentes (Zigmond, 1997). Há ainda aumento da expressão e supersensibilização dos receptores de dopamina e aumento da ramificação axonal (Parish et al, 2002; Stanic et al, 2003). Deste modo, a lesão parcial dos neurónios nigra-estriatais pela 6-OHDA é considerado um modelo adequado a estudos de neuroprotecção e neuro-regeneração.

4.2 A lesão dos neurónios dopaminérgicos aumentou a expressão dos receptores A2a no estriado

Os resultados obtidos neste trabalho mostram um aumento da expressão dos receptores A2a no estriado, particularmente em astrócitos que proliferaram nas zonas de transição entre zonas lesadas e zonas não afectadas pela 6-OHDA. Este aumento dos receptores A2a foi detectado em estudos de imunofluorescência e de *Western blot* em zonas dorsais do estriado, mas não nos estudos de imunohistoquímica com detecção pelo método DAB-peroxidase provavelmente devido a diferenças na sensibilidade das técnicas.

Outros estudos anteriores mostraram aumento da expressão dos receptores A2a após lesão neuronal. Foi observado aumento do mRNA dos receptores A2a da adenosina no estriado em ratos após lesão do MFB com 6-OHDA (Pinna et al, 2002), após a lesão com 6-OHDA e administração de L-DOPA (Tomiyana et al, 2004), e em murganhos tratados com MPTP (Singh et al, 2009). No entanto, noutra estudo no modelo da 6-OHDA não se observaram diferenças na acumulação dum marcador radioactivo específico para o receptor A2a ($[^{11}\text{C}]\text{SCH-442416}$) no estriado de ratos lesados relativamente à observada em ratos controlo, indicando que a lesão induzida pela 6-OHDA não afectou os níveis estriatais dos receptores A2a (Matsuya et al, 2007). Em doentes de Parkinson, em estudos *post-mortem*, também foram observados aumentos dos receptores A2a (Hurley et al, 2000) particularmente em pacientes que apresentavam discinesias (Calon et al, 2004).

O aumento da expressão dos receptores A2a na doença de Parkinson pode contribuir para as discinesias nos doentes tratados com L-DOPA. Os receptores A2a estão co-localizados com os receptores D2 da dopamina nas dendrites dos neurónios estriatais GABAérgicos da via indirecta onde podem formar heterolígómeros (revisões por Schwarzschild et al, 2006; Fuxe et al, 2007; Schiffmann et al, 2007; Xie et al, 2007). Nos heterolígómeros, os receptores A2a modulam antagonisticamente a acção dos receptores D2, isto é, a activação dos receptores A2a diminui a afinidade da ligação da dopamina e a sinalização pelos receptores D2. Além disso, os dois receptores têm efeitos opostos na sinalização pela via da adenilciclase e canais de Ca^{2+} . A estimulação da adenilciclase e a abertura de canais de Ca^{2+} induzida pelos receptores A2a pode agravar o efeito da depleção de dopamina que, através dos receptores D2, iria inibir a adenilciclase e diminuir a abertura de canais de Ca^{2+} . Por isso, os antagonistas A2a são eficazes no controlo dos sintomas motores da doença de Parkinson.

Além do aumento dos receptores A2a, as lesões induzidas pela 6-OHDA estão associadas a um aumento significativo dos receptores D2 (Pinna et al, 2002). A interacção entre os receptores A2a e os receptores D2 poderá explicar a banda de 70 kD que observámos nos *immunoblots* de extractos proteicos do estriado, muito mais intensa no estriado lesado (figura 16). Como a desinervação do estriado produz aumento da expressão dos receptores D2 que interagem com os receptores A2a, poderá haver um aumento dos heterolígómeros. No entanto, teremos que testar esta hipótese revelando as membranas com anticorpos para os receptores D2.

No nosso estudo observámos que os receptores A2a são expressos por astrócitos no estriado, principalmente após o processo de astrogliose induzido pela 6-OHDA (figura 17), sugerindo que a lesão neuronal pode estimular a expressão dos receptores A2a em astrócitos. A detecção dos receptores A2a em células da glia é consistente com outros estudos (Nishizaki et al, 2002; Brambilla et al, 2003; Yu et al, 2008), mas noutros trabalhos não foi detectada a presença de receptores A2a em

astrócitos (Saura et al, 2005; Trincavelli et al, 2008). É também provável que existam receptores A2a em células da microglia no estriado após a lesão com 6-OHDA, uma vez que foi demonstrada a sua indução em situações de lesão neuronal (Orr et al, 2009), mas os estudos que realizámos para investigar a co-localização dos receptores A2a com o marcador CD11b não forneceram ainda resultados claros. Não detectámos co-localização dos receptores A2a e TH, sugerindo que os terminais dopaminérgicos não possuem receptores A2a. No entanto, num estudo em sinaptossomas isolados de estriado estimou-se que cerca de 20% dos terminais dopaminérgicos possuem receptores A2a (Gomes et al, 2009).

A proliferação de astrócitos, e também de células da microglia, é uma característica da doença de Parkinson e de outras doenças neurodegenerativas (revisão por McGeer et al, 2008). A astrogliose reactiva caracteriza-se pela proliferação dos astrócitos, e pela hipertrofia do corpo celular e dos prolongamentos, em resposta a estímulos traumáticos ou hipóxia (revisão por Sofroniew et al, 2009). O processo envolve o aumento da expressão de enzimas, de proteínas do citoesqueleto, entre as quais a GFAP e a vimentina, e de vários factores tróficos (revisão por Daré et al, 2007). A adenosina, produzida extracelularmente a partir de ATP libertado por neurónios lesados, estimula a proliferação de astrócitos por intermédio dos receptores A2a (Brambilla et al, 2003; Ke et al, 2009).

A astrogliose reactiva é, em condições fisiológicas, uma reacção benéfica, uma vez que a proliferação de astrócitos isola o tecido danificado, e a produção de factores tróficos pode ajudar a sobrevivência de neurónios. No entanto, astrogliose excessiva e prolongada, como se observa em doenças neurodegenerativas (por exemplo, doença de Parkinson e doença de Alzheimer), pode ser prejudicial contribuindo para o dano cerebral pois há alterações fenotípicas nos astrócitos que aumentam a produção de factores tóxicos, como óxido nítrico, metabolitos do ácido araquidónico e citocinas inflamatórias (revisões por Daré et al, 2007; Sofroniew et al, 2009).

Os nossos resultados mostraram ainda a presença de receptores A2a na *substantia nigra*, mas em níveis muito inferiores aos do estriado, tendo sido detectados apenas por imunofluorescência, e não através da marcação com anticorpos secundários biotinilados e revelação com DAB. Níveis baixos de imunorreactividade do receptor A2a na *substantia nigra* foram também descritos por Rosin et al (1998). Na *substantia nigra* os receptores A2a são expressos por astrócitos, que apresentam uma distribuição preferencial na zona dos prolongamentos dos neurónios dopaminérgicos (*substantia nigra pars reticulata*). A lesão da via nigra-estriatal induzida por 6-OHDA não alterou a expressão dos receptores A2a na *substantia nigra*.

4.3 A lesão dos neurónios dopaminérgicos aumentou a expressão dos receptores A1 no estriado e na *substantia nigra*

Os receptores A1 da adenosina, ao contrário dos receptores A2a, apresentaram uma distribuição ubíqua no encéfalo, sendo expressos pelo córtex, estriado, bulbo olfatório e *substantia nigra*, de acordo com vasta literatura na área (Rosin et al, 1998; Fredholm et al, 2001; Wardas, 2002; Ribeiro et al, 2003). No entanto, o nosso trabalho mostra pela primeira vez que a lesão dos neurónios dopaminérgicos da via nigra-estriatal pode aumentar a expressão dos receptores A1 no estriado e na *substantia nigra*. No estriado, o aumento dos receptores A1 foi observado numa região medial (figura 19), onde se detectou também o aumento da expressão da TH em terminais dopaminérgicos e em estruturas com a aparência de neurónios (figura 20). A co-localização da TH com os receptores A1 indica a existência destes receptores nos terminais dopaminérgicos no estriado.

A observação de corpos celulares imunorreactivos para TH no estriado é inesperada uma vez que não existem neurónios dopaminérgicos no estriado, apenas os terminais dos neurónios cujos corpos celulares estão na *substantia nigra*. No entanto, já foi descrito que a lesão com 6-OHDA pode induzir o aparecimento de neurónios com fenótipo dopaminérgico (Lopes-Real et al, 2003; Darmopil et al, 2008).

Foi demonstrado em murganhos que estes neurónios não são originados de novo, por proliferação e diferenciação de células progenitoras indiferenciadas, mas sim por uma alteração de fenótipo de neurónios GABAérgicos da via directa e da via indirecta, uma vez que se observou co-localização da TH com dinorfina (marcadora da via directa) e com encefalinas (marcador da via indirecta). Além disso verificou-se que o aparecimento destes neurónios no estriado lesado requer a presença de alguns terminais dopaminérgicos (Darmopil et al, 2008), o que está de acordo com a nossa observação da presença destes neurónios dopaminérgicos no estriado apenas numa zona de transição entre a região lesada pela administração de 6-OHDA e regiões não atingidas pela lesão (figura 20). Como se verificou que estes neurónios também podem expressar a enzima DOPA descarboxilase necessária para a síntese de dopamina, foi proposto que estes neurónios podem libertar dopamina e, por conseguinte, minimizar os sintomas motores da doença de Parkinson, particularmente na fase inicial da doença (Darmopil et al, 2008). De notar que neurónios com fenótipo dopaminérgico foram também observados *post-mortem* no estriado de doentes de Parkinson (Porritt et al, 2000).

Na substantia nigra também observámos um aumento da expressão dos receptores A1 no lado lesionado, mas ao contrário do observado no estriado, os receptores A1 são expressos por corpos celulares de neurónios não dopaminérgicos, localizados na zona *pars reticulata*. Embora não tenhamos realizado ainda marcação imunocitoquímica, estes neurónios são provavelmente neurónios GABAérgicos.

Alguns estudos anteriores, noutros sistemas, revelaram também aumentos da expressão de receptores A1 em situações de lesão neuronal. Num modelo de isquémia cerebral em ratos Wistar, foi observado um aumento do mRNA do receptor A1 e também do próprio receptor, o que poderá ter um papel protector (Lai et al, 2005). Num modelo animal de epilepsia, foi observado aumento, correlacionado com o grau de convulsões, da expressão dos receptores A1 mediada pela IL-6 (Biber et al, 2008). Na epilepsia humana, em tecido do lobo temporal obtido em cirurgias foi

também observado aumento dos receptores A1 (Angelatou et al, 1993) mas noutro estudo observou-se perda de receptores A1 em comparação com tecido normal *post-mortem* (Glass et al, 1996).

Em conclusão, os nossos resultados mostraram que a lesão dos neurónios dopaminérgicos causada pela 6-OHDA foi acompanhada pelo aumento da expressão dos receptores A1 em terminais dopaminérgicos e em células com fenótipo dopaminérgico no estriado, e em neurónios não-dopaminérgicos na *substantia nigra pars reticulata*.

4.4 Lesão dos neurónios dopaminérgicos nigra-estriatais e expressão de GDNF

No presente estudo não observámos alteração dos níveis de GDNF nem no estriado nem na *substantia nigra*, em qualquer dos tempos testados após a indução da lesão da via nigra-estriatal com 6-OHDA (1, 6 ou 22 dias). Não foi assim possível confirmar *in vivo* o aumento da expressão de GDNF observado em culturas da *substantia nigra* após a lesão selectiva de neurónios dopaminérgicos por estímulos indutores de stress oxidativo, incluindo a 6-OHDA (Saavedra et al, 2006).

Os resultados publicados sobre o efeito da degeneração dos neurónios dopaminérgicos em modelos animais na expressão de GDNF são muito contraditórios. Não foram observadas alterações após a lesão da via nigra-estriatal induzida pela injeção da 6-OHDA, no estriado ou no MFB, na expressão de GDNF no estriado decorridos 18 ou 35 dias da cirurgia estereotáxica (Mertens et al, 2009). Também não foram observadas alterações no GDNF, mRNA e proteína, no estriado e *substantia nigra* em murganhos tratados com MPTP (Inoue et al, 1999). Em macacos *rhesus* a depleção da dopamina não alterou significativamente os níveis de GDNF no estriado (Collier et al, 2005).

No entanto, outros estudos em modelos animais da doença de Parkinson sugerem que o tecido nervoso reage à lesão induzida por 6-OHDA, pelo aumento da

expressão de factores neurotróficos, incluindo o GDNF (Nakajima et al, 2001; Yurek e Fletcher-Turner, 2001). Mais recentemente, foram observados aumentos significativos da expressão de GDNF no estriado, ao nível do mRNA e da proteína, após a lesão da via dopaminérgica nigra-estriatal induzida por 6-OHDA no MFB (Sanchez et al, 2009) ou no estriado dorsal (Kato-Semba et al, 2009).

Estas observações contraditórias podem dever-se a diferenças na intensidade da lesão, uma vez que o nosso grupo observou em cultura de células da *substantia nigra* que apenas lesões de intensidade moderada induzem aumento da expressão de GDNF (Saavedra et al, 2006). A indução da expressão de GDNF requer a presença de neurónios dopaminérgicos danificados mas ainda capazes de libertar factores solúveis que actuando em astrócitos induzem a expressão de GDNF (Saavedra et al, 2006, 2007). Verificámos também que o aumento do mRNA do GDNF é transitório, enquanto que o aumento da proteína é progressivo (Saavedra et al, 2006). Deste modo, é de esperar que destruição massiva dos neurónios dopaminérgicos não induza aumento da expressão de GDNF, enquanto que lesões moderadas induzidas pela inoculação de menores quantidades de 6-OHDA possam induzir GDNF e consequentemente promover efeitos protectores e neuroreparadores que podem retardar a degeneração dopaminérgica.

4.5 Os receptores A1 e A2a da adenosina e a protecção dos neurónios dopaminérgicos em modelos da doença de Parkinson

Além dos efeitos benéficos no controlo motor em modelos animais da doença de Parkinson, os antagonistas dos receptores A2a mostram exercer também efeitos neuroprotectores nos neurónios dopaminérgicos contra a toxicidade da 6-OHDA ou do MPTP (Ikeda et al, 2002; Bové et al, 2005; Kalda et al, 2006; Yu et al, 2008; Singh et al, 2009) reforçando o seu valor terapêutico na doença de Parkinson. A cafeína ou antagonistas selectivos dos receptores A2a (SCH58261, KW-6002) diminuem a perda de neurónios dopaminérgicos induzida pela 6-OHDA (Ikeda et al, 2002; Aguiar et al,

2006; Pinna et al, 2007) ou por MPTP (Chen et al, 2001; Kelsey et al, 2009; Xu et al, 2010). Também foi demonstrado que a deleção genética do receptor A2a reduz muito a toxicidade dopaminérgica do MPTP (Yu et al, 2008; Carta et al, 2009).

No entanto, outros estudos sugerem que a utilização de antagonistas A2a na doença de Parkinson pode ser contraproducente uma vez que os receptores A2a estão envolvidos na estimulação da libertação de dopamina e na acção de GDNF (Gomes et al, 2006), um factor neurotrófico que tem demonstrado em inúmeros estudos proteger os neurónios dopaminérgicos contra a acção de vários tipos de toxinas, e ser capaz de induzir a regeneração neuronal após o insulto tóxico (revisão por Saavedra et al, 2008).

No presente trabalho, a observação do aumento de receptores A2a em astrócitos no estriado lesado pela 6-OHDA, predominantemente nas zonas periféricas da lesão, onde se observou também aumento da expressão da TH, sugere uma função neuroprotectora para estes receptores. Uma vez que foi demonstrado que a activação dos receptores A2a é necessária para a estimulação da libertação de dopamina no estriado por GDNF (Gomes et al, 2006), e se sabe que o GDNF estimula a expressão da TH e a sua activação por fosforilação (revisão por Saavedra et al, 2008), podemos especular que os receptores A2a podem de algum modo estar envolvidos neste efeito compensatório da destruição dos terminais dopaminérgicos no estriado. Noutros sistemas, num modelo de isquémia verificou-se que receptores de adenosina do tipo A2B induzem a expressão de GDNF no córtex de rato (Yamagata et al, 2007).

No entanto, nas experiências em culturas de células descritas no presente trabalho, o bloqueio dos receptores A2a pareceu promover a sobrevivência dos neurónios dopaminérgicos na presença de 6-OHDA (figura 22). Apesar dos resultados não serem conclusivos, devido à pequena percentagem de neurónios dopaminérgicos na cultura, o efeito protector do antagonista dos receptores A2a poderá dever-se á inibição da activação da microglia pelos antagonistas A2a (revisão por Daré, 2007)

uma vez que detectámos nas nossas culturas da *substantia nigra* uma elevada densidade de células da microglia. A presença de microglia pode contribuir para a degeneração neuronal devido à libertação de factores pró-inflamatórios e neurotóxicos, tais como o TNF- α , espécies reactivas de nitrogénio, proteases, espécies reactivas de oxigénio, eicosanoides e amino ácidos excitatórios (Kalda et al, 2006; Daré et al, 2007).

Noutro estudo, realizado em culturas de células do mesencéfalo de rato, um antagonista não-específico (cafeína) e um específico (CSC) dos receptores A2a mostraram um forte efeito neuroprotector contra a toxicidade induzida pela 6-OHDA (Nobre et al, 2010). Esta neuroprotecção foi atribuída à capacidade dos antagonistas dos receptores A2a diminuírem a produção de radicais livres e do stress oxidativo nas células, que são os componentes da citotoxicidade induzida pela 6-OHDA.

Por outro lado, os receptores A1 parecem ter efeitos protectores em modelos animais da doença de Parkinson. A activação dos receptores A1 diminuiu a perda de neurónios na *substantia nigra* e dos seus prolongamentos no estriado induzida por MPTP em murganhos. Este efeito foi relacionado com a diminuição da activação da microglia e da produção de factores inflamatórios como o TNF- α , a IL-1 β (Liu et al, 2006). Estas observações estão de acordo com a presença de receptores A1 em células da microglia, cuja activação reduz a secreção de citocinas inflamatórias (revisão por Daré, 2007). Por outro lado foi também observado que um antagonista dos receptores A1, administrado na *substantia nigra*, agrava a toxicidade dopaminérgica do malonato, um inibidor mitocondrial (Alfinito et al, 2003). No nosso trabalho observámos aumento marcado da expressão dos receptores A1 no estriado lesado pela 6-OHDA em zonas com aumento da TH, o que mais uma vez poderá estar relacionado com neuroprotecção.

Estas evidências indicam que os receptores da adenosina podem ter um papel importante na doença de Parkinson, na neuroprotecção mediada pela activação dos receptores A1, ou pela inibição dos receptores A2a da adenosina (revisão por Cieslak

et al 2008, e por Jenner et al, 2009). Além disso, também tem sido mostrado que ambos, antagonistas bem como agonistas dos receptores A2a, protegem contra uma gama de insultos cerebrais, tais como isquémia, hemorragia, excitotoxicidade, toxicidade mitocondrial, insultos imunológicos e possíveis agregações proteicas.

No entanto, agonistas dos receptores A2a podem aumentar a acção de factores neurotróficos, nomeadamente do GDNF, que como foi visto anteriormente, pode ser um potencial agente terapêutico para a doença de Parkinson (Gomes et al, 2006; Sebastião et al, 2009). Este aparente paradoxo da neuroprotecção induzida por ambos, activação e inactivação dos receptores A2a reflecte a complexidade das acções dos receptores A2a da adenosina em vários componentes neuronais, gliais e vasculares, sobre os quais pode exercer diferentes efeitos face a um dano cerebral, dependendo da sua natureza e também de condições patológicas associadas (Chen et al, 2007).

Capítulo 5

Conclusões e perspectivas futuras

A lesão dos neurónios dopaminérgicos da via nigra-estriatal, induzida pela injeção unilateral da neurotoxina 6-OHDA no estriado, aumentou a expressão dos receptores A2a em astrócitos preferencialmente em zonas de transição da lesão, onde parecem ocorrer tentativas de regeneração dopaminérgica evidenciadas pelo aumento dos níveis de TH. Estas observações não apoiam a ideia de que a activação dos receptores A2a contribui para a degeneração dopaminérgica por mecanismos inflamatórios. Para esclarecer o papel, neurotóxico ou neuroprotector, dos receptores A2a em astrócitos após a lesão dopaminérgica, propomos testar (i) o efeito da administração local juntamente com a 6-OHDA de agonistas ou antagonistas dos receptores A2a e (ii) da sua administração sistémica após a lesão. Serão analisados os efeitos na expressão de TH nos terminais dopaminérgicos na região de transição da lesão no estriado, e na sobrevivência dos neurónios dopaminérgicos da *substantia nigra*. A co-administração local permitirá testar a contribuição dos receptores já existentes para a extensão da lesão no estriado e para a degeneração retrógrada dos neurónios dopaminérgicos. A administração posterior permitirá avaliar o efeito do aumento da expressão dos receptores A2a num eventual processo de regeneração neuronal.

A lesão dos neurónios dopaminérgicos no modelo animal da doença de Parkinson aumentou também a expressão de receptores A1 em terminais dopaminérgicos no estriado e em neurónios não-dopaminérgicos na *substantia nigra*. Do mesmo modo, pretendemos testar o efeito da co-administração de ligandos dos receptores A1 na resistência dos terminais dopaminérgicos e no aparecimento de células com o fenótipo dopaminérgico no estriado, e na degeneração retrógrada dos neurónios na *substantia nigra*. A administração local de agonistas dos receptores A1 no estriado permitirá evitar os efeitos depressores cardio-vasculares dos agonistas da adenosina.

Propomos também prosseguir os estudos nas culturas de células da *substantia nigra* pois este modelo permite analisar os efeitos de agonistas e antagonistas dos

receptores A2a na degeneração dos prolongamentos e a sobrevivência dos neurónios dopaminérgicos na presença de 6-OHDA. Seria interessante também testar se a mudança de fenótipo GABAérgico para dopaminérgico pode ocorrer nas culturas *in vitro*, fazendo estudos de co-marcação para TH e GAD (descarboxilase do ácido glutâmico), enzima marcadora dos neurónios GABAérgicos.

No modelo animal da doença de Parkinson, não detectámos alterações na expressão de GDNF após a lesão dos neurónios dopaminérgicos, ao contrário do observado anteriormente pelo nosso grupo *in vitro* em culturas da *substantia nigra*. Como foi demonstrado que a indução da expressão do GDNF depende da intensidade da lesão, pois requer a libertação de mediadores pelos neurónios danificados mas ainda capazes de sinalizar, propomos testar o efeito da injeção estereotáxica de diferentes quantidades de 6-OHDA na expressão de GDNF *in vivo*, e se a administração de ligandos A1 e A2a pode regular a expressão deste factor neurotrófico.

Estes estudos poderão contribuir para o esclarecimento de eventuais efeitos da terapia da doença de Parkinson com antagonistas dos receptores A2a na sobrevivência dos neurónios dopaminérgicos.

Capítulo 6

Referências

- Alfinito P., Wang S-P, Manzino L., Rijhsinghani S., Zeevalk G., . Sonsalla P. (2003) Adenosinergic Protection of Dopaminergic and GABAergic Neurons against Mitochondrial Inhibition through Receptors Located in the Substantia Nigra and Striatum, Respectively. *J Neurosci.* 23: 10982-10987.
- Angelatou F, Pagonopoulou O, Maraziotis T, Olivier A, Villemeure JG, Avoli M, Kostopoulos G. (1993) Upregulation of A1 adenosine receptors in human temporal lobe epilepsy: a quantitative autoradiographic study. *Neurosci Lett.* 163: 11-4.
- Arenas E., Trupp M., Akerud P., Ibañez C. (1995) GDNF Prevents Degeneration and Promotes the Phenotype of Brain Noradrenergic Neurons In Vivo. *Neuron* 15: 1465-1473.
- Akerud P., Canals J., Snyder E., Arenas E. (2001) Neuroprotection through Delivery of Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor by Neural Stem Cells in a Mouse Model of Parkinson's Disease. *J. Neurosci.* 21: 8108-8118.
- Aguiar L., Nobre H., Macêdo D., Oliveira A., Freitas R., Vasconcelos S., Cunha G., Sousa F., Viana G. (2006) Neuroprotective effects of caffeine in the model of 6-hydroxydopamine lesion in rats. *Pharmacol., Biochem. and Behavior* 84: 415-419.
- Bäckman C., Shan L., Zhang Y., Hoffer B., Leonard S., Troncoso J., Vonsattel P., Tomac A. (2006) Gene expression patterns for GDNF and its receptors in the human putamen affected by Parkinson's disease: A real-time PCR study. *Mol. Cell. Endocrinol.* 252: 160-166.
- Barroso-Chinea P., Cruz-Muros I., Aymerich M., Rodríguez-Díaz M., Afonso-Oramas D., Lanciego J., González-Hernández T. (2005) Striatal expression of GDNF and different vulnerability of midbrain dopaminergic neurons. *Eur. J. Neurosci.* 21: 1527-1815.
- Bartels A., Leenders K. (2009) Parkinson's disease: The syndrome, the pathogenesis and pathophysiology. *Cortex* 45: 915-921.
- Beal M. (2001) Experimental models of Parkinson' disease. *Neurosci.* 2: 325-332.
- Benn C., Woolf J. (2004) Adult neuron survival strategies slamming on the brakes. *Nat. Rev. Neurosci.* 5: 686-700.
- Bibbiani F., Oh J., Petzer J., Castagnoli N., Chen J.-F, Schwarzschild M., Chase T. (2003) A2A antagonist prevents dopamine agonist-induced motor complications in animal models of Parkinson's disease. *Exp. Neurology* 184: 285-294.
- Bjorklund A., Rosenblad C., Winkler C., Kirik D. (1997) Studies on Neuroprotective and Regenerative Effects of GDNF in a Partial Lesion Model of Parkinson's Disease. *Neurobiol. Dis.* 4: 186-200.
- Blandini F., Levandis G., Bazzini E., Nappi G., Armentero M-T. (2007) Time-course of nigrostriatal damage, basal ganglia metabolic changes and behavioural alterations following intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine in the rat: new clues from an old model. *Eur. J. Neurosci.* 25: 397-405.

- Blum D., Torch S., Lambeng N., Nissou M., Benabid A., Sadoul R., Verna, J. (2001) Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Prog. Neurobiol.* 65: 135-172.
- Bossy-Wetzel E., Schwarzenbacher R., Lipton S. (2004) Molecular pathways to neurodegeneration. *Nat. Med.* 10: S2-S9.
- Bové J., Prou D., Perier C., Przedborski S. (2005) Toxin-induced models of Parkinson's disease. *The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics.* 2: 484-494.
- Brambilla R., Cottini L., Fumagalli M., Ceruti S., Abbracchio M. (2003) Blockade of A2A Adenosine Receptors Prevents Basic Fibroblast Growth Factor-Induced Reactive Astroglia in Rat Striatal Primary Astrocytes. *Glia* 43:190-194.
- Burch D., Sheerin F. (2005) Parkinson's disease. *Lancet.* 365: 622-27.
- Calon F., Dridi M., Hornykiewicz O., Bedard P., Rajput A., Paolo T. (2004) Increased adenosine A2A receptors in the brain of Parkinson's disease patients with dyskinesias. *Brain* 127: 1075-1084.
- Carta A., Kachroo A., Schintu N., Xu K., Schwarzschild M., Wardas J., Morelli M. (2009) Inactivation of neuronal forebrain A receptors protects dopaminergic neurons in a mouse model of Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 111:1478-89.
- Cieślak M., Komoszyński M., A. Wojtczak. (2008) Adenosine A2A receptors in Parkinson's disease treatment. *Purinergic Signalling* 4:305-312.
- Chen J-F, Huang Z., Ma J., Zhu J., Moratalla R., Standaert D., Moskowitz M., Fink J., Schwarzschild M. (1999) A2A Adenosine Receptor Deficiency Attenuates Brain Injury Induced by Transient Focal Ischemia in Mice. *J. Neurosci.* 19: 9192-9200.
- Chen J-F, Xu K., Petzer J., Staal R., Xu Y-H, Beilstein M., Sonsalla P., Castagnoli K., Castagnoli N., Schwarzschild M. (2001) Neuroprotection by Caffeine and A2A Adenosine Receptor Inactivation in a Model of Parkinson's Disease. *J. Neurosci.* 21: 1-6.
- Chen J-F, Sonsalla P., Pedata F., Melani A., Domenici M., Popoli P., Geiger J., Lopes L., Mendonça A. (2007) Adenosine A2A receptors and brain injury: Broad spectrum of neuroprotection, multifaceted actions and "fine tuning" modulation. *Prog. Neurobiol.* 83: 310-331.
- Choi-Lundberg D., Lin Q., Chang Y., Chiang Y., Hay C., Mohajeri H., Davidson B., Bohn M. (1997) Dopaminergic neurons protected from degeneration by GDNF gene therapy. *Science* 275: 838-841.
- Collier T., Ling Z., Carvey P., Fletcher-Turner A., Yurek D., Sladek J., Kordower J. (2005) Striatal trophic factor activity in aging monkeys with unilateral MPTP-induced parkinsonism. *Exp. Neurology* 191: S60–S67.
- Cunha R. (2001) Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. *Neurochem. Inter.* 38: 107-125.

- Cunha R., (2005) Neuroprotection by adenosine in the brain: From A1 receptor activation to A2a receptor blockade. *Purinergic Signalling*. 1: 111-134.
- Daeur W., Przedborski S. (2003) Parkinson's Disease: Mechanisms and Models. *Neuron*. 39: 889-909.
- Daré E., Schulte G., Karovic O., Hammarberg C., Fredholm B. (2007) Modulation of glial cell functions by adenosine receptors. *Physiology & Behavior* 92: 15-20.
- Darmopil S., Muneton-Gomez V., Ceballos M., Bernson M., Moratalla R. (2008) Tyrosine hydroxylase cells appearing in the mouse striatum after dopamine denervation are likely to be projection neurones regulated by L-DOPA. *Eur. J. Neurosci*. 27: 580-592.
- Deumens R., Blokland A., Prickaerts J. (2002) Modeling Parkinson's disease in rats: an evaluation of 6-OHDA, Lesions of the nigrostriatal pathway. *Exp. Neurol*. 175: 303-317.
- Dirk M., Hermann, Kilic E., Kugler S., Isenmann S., Bahr M. (2001) Adenovirus-Mediated Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor (GDNF) Expression Protects against Subsequent Cortical Cold Injury in Rats. *Neurobiol. Dis*. 8: 964-973.
- Duarte E., Saavedra A., Baltazar G. (2008) GDNF: a key player in neuron-glia crosstalk and survival of nigrostriatal dopaminergic neurons. *In: "Interaction between neurons and glia in aging and disease"*. Springer-Verlag 173-192.
- Emborg M. (2004) Evaluation of animal models of Parkinson's disease for neuroprotective strategies. *J. Neurosci. Meth*. 139: 121-143.
- Ferre S., von Euler G., Johansson B., Fredholm B., Fuxe K. (1991) Stimulation of high-affinity adenosine A2 receptors decreases the affinity of dopamine D2 receptors in rat striatal membranes. *Neurobiol*. 88: 7238-7241.
- Fredholm B., Ijzerman A., Jacobson K., Klotz K., Linden J. (2001) Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol. Rev*. 53: 527- 52.
- Fredholm B., Chen J-F, Masino S., Vaugeois J-M. (2005) Actions of adenosine at its receptors in the CNS: Insights from Knockouts and Drugs. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol*. 45: 385-412.
- Fredholm B., Chern Y., Franco R., Sitkovsky M. (2007) Aspects of the general biology of adenosine A2a signaling. *Prog. Neurobi*. 83: 263-276.
- Fuxe K., Ferré S., Genedani S., Franco R., Agnati L. (2007) Adenosine receptor–dopamine receptor interactions in the basal ganglia and their relevance for brain function. *Physiology & Behavior* 92: 210–217.
- Glass M., Faull R., Bullock J., Jansen K., Mee E., Walker E., Synek B., Dragunow M. (1996) Loss of A1 adenosine receptors in human temporal lobe epilepsy. *Brain Res*. 710: 56-68.

- Gomes C., Vaz S., Ribeiro J., Sebastião A. (2006) Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) enhances dopamine release from striatal nerve endings in an adenosine A2A receptor-dependent manner. *Brain Res.* 1113: 129-136.
- Gomes C., Simões P., Canas P., Quiroz C., Sebastião A., Ferré S., Cunha R., Joaquim Ribeiro A. (2009) GDNF control of the glutamatergic cortico-striatal pathway requires tonic activation of adenosine A2A Receptors. *J. Neurochem.* 108: 1208-1219.
- Gorell J., Peterson E., Rybicki B., Johnson C. (2004) Multiple risk factors for Parkinson's disease. *J. Neurol. Sci.* 217: 169-174.
- Granhölm C., Mott L., Bowenkamp K., Eken S., Henry S., Hoffer J., Lapchak A., Palmer R., van Horne C., Gerhardt A. (1997) Glial cell line-derived neurotrophic factor improves survival of ventral mesencephalic grafts to the 6-hydroxydopamine lesioned striatum. *Exp. Brain Res.* 116: 29-38.
- Grealish S., Mattsson B., Draxler P., Bjorklund A. (2010) Characterisation of behavioural and neurodegenerative changes induced by intranigral 6-hydroxydopamine lesions in a mouse model of Parkinson's disease. *Eur. J. Neurosci.* 31: 2266-2278.
- Grondin R., Zhang Z., Yi A., Cass W., Maswood N., Andersen A., Elsberry D., Klein M., Gerhardt G., Gash D. (2002) Chronic, controlled GDNF infusion promotes structural and functional recovery in advanced parkinsonian monkeys. *Brain* 125: 2191-2201.
- Hald A., Lotharius J. (2005) Oxidative stress and inflammation in Parkinson's disease: Is there a causal link? *Exp. Neurol.* 193: 279-290.
- Hanrott K., Gudmunsen L., O'Neills M., Wonnacott S. (2006) 6-Hydroxydopamine-induced apoptosis is mediated via extracellular auto-oxidation and caspase 3-dependent activation of protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 281: 5373-5382.
- Hermann D., Kilic E., Kugler S., Isenmann S., Bahr M. (2001) Adenovirus-Mediated Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor (GDNF) Expression Protects against Subsequent Cortical Cold Injury in Rats. *Neurobiol. Dis.* 8: 964-973.
- Hurley M., Masha D., Jenner P. (2000) Adenosine A2A receptor mRNA expression in Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* 291: 54-58.
- Iancu R., Mohapel P., Brudin P., Paul G. (2005) Behavioral characterization of a unilateral 6-OHDA-lesion model of Parkinson's disease in mice. *Behavioural Brain Res.* 162: 1-10.
- Ikeda K., Kurokawa M., Aoyama S., Kuwana Y. (2002) Neuroprotection by adenosine A2A receptor blockade in experimental models of Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 80: 262-270.
- Inoue T., Tsui J., Wong N., Wong S., Suzuki F., Kwok Y. (1999) Expression of glial cell line-derived neurotrophic factor and its mRNA in the nigrostriatal pathway following MPTP treatment. *Brain Res.* 826: 306-308.

- Jenner P., Mori A., Hauser R., Morelli M., Fredholm B., Chen J. (2009) Adenosine, adenosine A2a antagonists, and Parkinson's disease. *Parkinson and Related Dis.* 15: 406-413.
- Kalda A., Yu L., Oztas E., Chen J-F (2006) Novel neuroprotection by caffeine and adenosine A2A receptor antagonists in animal models of Parkinson's disease. *J. Neurological Sci.* 248: 9-15.
- Katoh-Semba R., Tsuzuki M., Miyazaki N., Yoshida A., Nakajima H., Nakagawa C., Kitajima S., Matsuda M. (2007) Distribution and immunohistochemical localization of GDNF protein in selected neural and non-neural tissues of rats during development and changes in unilateral 6-hydroxydopamine lesions. *Neurosci. Res.* 59: 277-287.
- Ke R-H, Xiong J., Liu Y., Ye Z-R. (2009) Adenosine A2a receptor induced gliosis via Akt/NF-kB pathway in vitro. *Neurosci. Res.* 65: 280-285.
- Kelsey J., Langelier N., Oriel B., Reedy C. (2009) The effects of systemic, intrastriatal, and intrapallidal injections of caffeine and systemic injections of A2A and A1 antagonists on forepaw stepping in the unilateral 6-OHDA-lesioned rat. *Psychopharmacol.* 201:529-539.
- Kirik D., Rosenblad C., Bjorklund A. (1998) Characterization of Behavioral and Neurodegenerative Changes Following Partial Lesions of the Nigrostriatal Dopamine System Induced by Intrastriatal 6-Hydroxydopamine in the Rat. *Exp. Neurobiol.* 152: 259-277.
- Kordower J., Emborg M., Bloch J., Ma S., Chu Y., Leventhal L., McBride J., Chen E., Palfi S., Roitberg B., Brown W., Holden J., Pyzalski R., Taylor M., Carvey P., Ling Z., Trono D., Hantraye P., Deglon N., Aebischer P. (2000) Neurodegeneration prevented by lentiviral vector delivery of GDNF in primate models of Parkinson's disease. *Science* 290: 767-773.
- Kostrzewa R., Nowak P., Kostrzewa J., Kostrzewa R., Brus R. (2005) Peculiarities of L-DOPA treatment of Parkinson's disease. *Amino Acids* 28: 157-164.
- Kozlowski D., Connor B., Tillerson J., Schallert T., Bohn M. (2000) Delivery of a GDNF Gene into the Substantia Nigra after a Progressive 6-OHDA Lesion Maintains Functional Nigrostriatal Connections. *Exp. Neurol.* 166: 1-15.
- Latini S., Pedata F. (2001) Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations. *J. Neurochem.* 79: 463-484.
- Lees A., Hardy J., Revesz T. (2009) Parkinson's disease. *Lancet.* 373: 2055-66.
- Lee C., Saueri H., Bjorklund A., 1996. Dopaminergic neuronal degeneration and motor impairments following axon terminal lesion by intrastriatal 6-hydroxydopamine in the rat. *Neurosci.* 28: 57-87.
- Liberto M., Albrecht J., Herx M., Yong W., Levison W. 2004. Pro-regenerative properties of cytokine-activated astrocytes. *J Neurochem.* 89: 1092-1100.
- Lin F., Doherty H., Lile D., Bektesh S., Collins F. (1993) GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science.* 260: 1130-1132.

- Liu H-Q, Zhang W-Y, Luo X-T, Y Y., Zhu X-Z. (2006) Paeoniflorin attenuates neuroinflammation and dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson's disease by activation of adenosine A1 receptor. *Br. J. Pharmac.* 148: 314-325.
- Lopez-Real A., Rodriguez-Pallares J., Guerra M., Labandeira-Garcia J., (2003) Localization and functional significance of striatal neurons immunoreactive to aromatic L-amino acid decarboxylase or tyrosine hydroxylase in rat Parkinsonian models. *Brain Res.* 969: 135-146.
- Matsuya T., Takuma K., Sato K., Asai M., Murakami Y., Miyoshi S., Noda A., Nagai T., Mizoguchi H., Nishimura S., Yamada K. (2007) Synergistic Effects of Adenosine A2A Antagonist and L-DOPA on Rotational Behaviors in 6-Hydroxydopamine-Induced Hemi-Parkinsonian Mouse Model. *J. Pharmacol. Sci.* 103: 329-332.
- Mattson P., Magnus T. (2006) Ageing and neuronal vulnerability. *Nat Rev Neurosci.* 7: 278-294.
- McGeer P., McGeer E. (2008) Glial Reactions in Parkinson's Disease. *Mov. Dis.* 23: 474-483.
- Mertens B., Massie A., Michotte Y., Sarre S. (2009) Effect of nigrostriatal damage induced by 6-hydroxydopamine on the expression of glial cell Line-derived neurotrophic factor in the striatum of the rat. *Neurosci.* 162: 148-154.
- Mogi M., Togari A., Kondo T., Mizuno Y., Kogure O., Kuno S., Ichinose H., Nagatsu T. (2001) Glial cell line-derived neurotrophic factor in the substantia nigra from control and parkinsonian brains. *Neurosci. Lett.* 300: 179-181.
- Moore D., West A., Dawson V., Dawson T. (2005) Molecular Pathophysiology of Parkinson's Disease. *Annu. Rev. Neurosci.* 28:57-87.
- Nakagawa T., Schwartz P. (2004) Gene expression profiles of reactive astrocytes in dopamine-depleted striatum. *Brain Pathol.* 14: 275-280.
- Nakajima K, Hida H, Shimano Y, Fujimoto I, Hashitani T, Kumazaki M, Sakurai T, Nishino H. (2001) GDNF is a major component of trophic activity in DA-depleted striatum for survival and neurite extension of DAergic neurons. *Brain Res.* 916:76-84.
- Nishizaki T., Nagai K., Nomura T., Tada H., Kanno T., Tozaki H., Li X., Kondoh T., Kodama,3 e. Takahashi,3 n. Sakai,3 k. Tanaka,4 Saito N. (2002) A New Neuromodulatory Pathway With a Glial Contribution Mediated Via A2a Adenosine Receptors. *Glia* 39: 133-147.
- Nobre H., Cunha G., Vasconcelos L., Magalhães H, Neto R., Maia F., Moraes M., Leal K., Viana G. (2010) Caffeine and CSC, adenosine A2A antagonists, offer neuroprotection against 6-OHDA-induced neurotoxicity in rat mesencephalic cells. *Neurochem. Inter.* 56: 51-58.
- Obeso J., Rodriguez-Oroz M., Benitez-Temino B., Blesa F., Guridi J., Marin C., Rodriguez M. (2008) Functional Organization of the Basal Ganglia: Therapeutic Implications for Parkinson's disease. *Mov. Dis.* 23: S548-559.

- Ongini E., Monopoli A., Impagnatiello F., Fredduzzi S., Schwarzschild M., Chen J-F. (2001) Dual Actions of A2A Adenosine Receptor Antagonists on Motor Dysfunction and Neurodegenerative Processes. *Drug Development Res.* 52: 379-386.
- Orr A., Orr A., Li X-J, Gross R., Traynelis S. (2009) Adenosine A2A receptor mediates microglial process retraction. *Nat Neurosci.* 12: 872-878.
- Parish C., Finkelstein D., Tripanichkul W., Satoskar A., Drago J., Horne M. (2002) The Role of Interleukin-1, Interleukin-6, and Glia in Inducing Growth of Neuronal Terminal Arbors in Mice. *J. Neurosci.* 22: 8034-8041.
- Petzer J., Castagnoli N., Schwarzschild M., Chen J-F, Van der Schyf C. (2009) Dual-Target-Directed Drugs that Block Monoamine Oxidase B and Adenosine **A2A** Receptors for Parkinson's Disease. *The American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 6: 141-151.
- Pierri M., Vaudano E., Sager T., Englund U. (2005) KW-6002 protects from MPTP induced dopaminergic toxicity in the mouse. *Neuropharmac.* 48: 517-524.
- Pinna A., Corsi C., Carta A., Valentini V., Pedata F., Morelli M. (2002) Modification of adenosine extracellular levels and adenosine A2A receptor mRNA by dopamine denervation. *Eur. J. Pharmacol.* 446: 75-82.
- Pinna A., Wardas T., Simola N., Morelli M. (2005) New therapies for the treatment of Parkinson's disease: Adenosine A2A receptor antagonists. *Life Sciences* 77: 3259-3267.
- Pinna A., Pontis S., Borsini F., Morelli M. (2007) Adenosine A2A Receptor Antagonists Improve Deficits in Initiation of Movement and Sensory Motor Integration in the Unilateral 6-Hydroxydopamine Rat Model of Parkinson's Disease. *Synapse* 61: 606-614.
- Porritt M., Batchelor P., Hughes A., Kalnins R., Donnan G., Howells D. (2000) New dopaminergic neurons in Parkinson's disease striatum. *Lancet* 356: 44-45.
- Rebola N., Canas P., Oliveira C., Cunha R. (2005) Different synaptic and subsynaptic localization of adenosine A2a receptors in the hippocampus and striatum of the rat. *Neurosci.* 132: 893-903.
- Ribeiro J., Sebastião A., Mendonça A. (2003) Adenosine receptors in the nervous system: pathophysiological implications. *Prog. Neurobiol.* 68: 377-392.
- Rosenblad C., Martinez-Serrano A., Björklund A. (1998) Intra-striatal glial cell line-derived neurotrophic factor promotes sprouting of spared nigrostriatal dopaminergic afferents and induces recovery of function in a rat model of Parkinson's disease. *Neurosci.* 82: 129-137.
- Rosin D., Robeva A., Woodard R., Guyenet P., Linden J. (1998) Immunohistochemical Localization of Adenosine A2A Receptors in the Rat Central Nervous System. *J. Comparative Neurology* 401: 163-186.

- Saavedra A., Baltazar G., Santos P., Carvalho C., Duarte E. (2006) Selective injury to dopaminergic neurons up-regulates GDNF in substantia nigra postnatal cell cultures: role of neuroglia crosstalk. *Neurobiol. Dis.* 23: 533-542.
- Saavedra A., Baltazar G., Duarte E. (2007) Interleukin-1 β mediates GDNF up-regulation upon dopaminergic injury in ventral midbrain cell cultures. *Neurobiol. Dis.* 25: 92-104.
- Saavedra A., Baltazar G., Duarte E. (2008) Driving GDNF expression: the green and red traffic lights. *Prog. Neurobiol.*
- Sánchez-Pernautea R., Brownella A., Jenkinsd B., Isacson O. (2005) Insights into Parkinson's disease models and neurotoxicity using non-invasive imaging. *Toxicology and Applied Pharmacol.* 207: S251-S256.
- Sanchez B., Relova J., Gallego R., Ben-Batalla I., Perez-Fernandez R. (2009) 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ Administration to 6-Hydroxydopamine-Lesioned Rats Increases Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor and Partially Restores Tyrosine Hydroxylase Expression in Substantia Nigra and Striatum. *J. Neurosci. Res.* 87: 723-732.
- Sauer H., Rosenblad C., Bjorklund A. (1995) Glial cell line-derived neurotrophic factor but not transforming growth factor beta 3 prevents delayed degeneration of nigral dopaminergic neurons following striatal 6-hydroxydopamine lesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92: 8935-8939.
- Saura J., Angulo E., Ejarque A., Casado V., Tusell J., Moratalla R., Chen J-F, Schwarzschild M., Lluís C., Franco R., Serratos J. (2005) Adenosine A_{2A} receptor stimulation potentiates nitric oxide release by activated microglia. *J. Neurochem.* 95: 919-929.
- Savitt J., Dawson V., Dawson T. (2006) Diagnosis and treatment of Parkinson disease: molecules to medicine. *J. Clin. Invest.* 116: 1744-1754.
- Sebastião A., Ribeiro J. (2009) Triggering neurotrophic factor actions through adenosine A_{2A} receptor activation: implications for neuroprotection. *Bri. J. Pharmacol.* 158: 15-22.
- Schiffmann S., Vanderhaeghen J-J. (1993) Adenosine A_{2A} Receptors Regulate the Gene Expression of Striatopallidal and Striatonigral Neurons. *J. Neurosci.* 3: 1080-1087.
- Schiffmann S., Fisone G., Moresco R., Cunha R., Ferre S. (2007) Adenosine A_{2A} receptors and basal ganglia physiology. *Prog Neurobiol.* 83: 277-292.
- Schwarzschild M., Agnati L., Fuxe K., Chen J-F, Morelli M. (2006) Targeting adenosine A_{2A} receptors in Parkinson's disease. *Trends in Neurosci.* 29: 11.
- Singh S., Singha K., Gupta S., Patela D., Singhb V., Singhb R., Singh M. (2009) Effect of caffeine on the expression of cytochrome P450 1A₂, adenosine A_{2A} receptor and dopamine transporter in control and 1-methyl 4-phenyl 1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine treated mouse striatum. *Brain Res.* 1283: 115-126.

- Schober A. (2004) Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. *Cell Tissue Res.* 318: 215-224.
- Schulz J., Falkenburger B. (2004) Neuronal pathology in Parkinson's disease. *Cell Tissue Res.* 318: 135-147.
- Sofroniew M. (2009) Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci.* 32: 638-647.
- Stanic D., Finkestein D., Bourke D., Drago J., Horne M. (2003) Timecourse of striatal re-innervation following lesions of dopaminergic SNpc neurons of the rat. *Eur. J. Neurosci.* 18: 1175-1188.
- Tomiya M., Kimura T., Maeda T., Tanaka H., Kannari K., Baba M. (2004) Upregulation of Striatal Adenosine A2A Receptor mRNA in 6-Hydroxydopamine-Lesioned Rats Intermittently Treated With L-DOPA. *Synapse* 52: 218-222.
- Trincavelli M., Melani A., Guidi S., Cuboni S., Cipriani S., Pedata F., Martini C. (2008) Regulation of A2A adenosine receptor expression and functioning following permanent focal ischemia in rat brain. *J. Neurochem.* 104: 479-490.
- Uversky V. (2004) Neurotoxicant- induced animal models of Parkinson's disease: understanding the role of rotenone, maneb and paraquat in neurodegeneration. *Cell Tissue Res.* 318: 225-241.
- Von Bohlen O., Halbach (2005) Animals models of Parkinson's disease. *Neurodegenerative Dis.* 2: 313-320.
- Wardas J. (2002) Neuroprotective role of adenosine in the CNS. *Pol. J. Pharmacol.* 54: 313-326.
- Wichmann T., DeLong M. (2002) Neurocircuitry of Parkinson's disease. *Neuropsychopharmacol.* 122.
- Wu D., Jackson-Lewis V., Vila M., Tieu K., Teismann P., Vadseth C., Choi D-K, Ischiropoulos H., Przedborski S. (2002) Blockade of Microglial Activation Is Neuroprotective in the 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine Mouse Model of Parkinson Disease. *J. Neurosci.* 22: 1763-1771.
- Xie X., Ramkumar V., Toth L. (2007) Adenosine and Dopamine Receptor Interactions in Striatum and Caffeine-induced Behavioral Activation. *Comparative Med.* 57(6): 538-545.
- Xu K., Bastia E., Schwarzschild M. (2005) Therapeutic potential of adenosine A2a receptor antagonists in Parkinson's disease. *Pharm & Ther.* 105: 267-310.
- Xu K., Xu Y-H, Chen J-F, Schwarzschild M. (2010) Neuroprotection by caffeine: time course and role of its metabolites in the mptp model of parkinson's disease. *Neurosci.* 167: 475-481.
- Yaar R., Jones M., Chen J-F, Ravid K. (2005) Animal Models for the Study of Adenosine Receptor Function. *J. Cellular Physiol.* 202: 9-20.

- Yamagata K. , Hakata K., Maeda A., Mochizuki C., Matsufuji H., Chino M., Yamori Y. (2007) Adenosine induces expression of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) in primary rat astrocytes. *Neurosci. Res.* 59: 467-474.
- Yasuhara T., Shingo T., Date I. (2007) Glial Cell Line-derived Neurotrophic factor (GDNF) Therapy for Parkinson's Disease. *Acta Med. Okayama* 61: 51-56.
- Yu L., Shen H-Y, Coelho J., Araújo I., Huang Q-Y, Day Y-J, Rebola N., Canas P., Rapp E., Ferrara J., Taylor D., Muller C., Linden J., Cunha R., Chen J-F. (2008) Adenosine A2A Receptor Antagonists Exert Motor and Neuroprotective Effects by Distinct Cellular Mechanisms. *Ann. Neurol.* 63: 338-346.
- Yurek D., Fletcher-Turner A. (2001) Differential expression of GDNF, BDNF, and NT-3 in the aging nigrostriatal system following a neurotoxic lesion. *Brain Res.* 891: 228-235.
- Zigmond M. (1997) Do Compensatory Processes Underlie the Preclinical Phase of Neurodegenerative Disease? Insights from an Animal Model of Parkinsonism. *Neurobiol. Dis.* 4: 247-253.
- Zimmermann H. (1992) 5'-Nucleotidase: molecular structure and functional aspects. *Biochem. J.* 285: 345-365.

