



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências

Klotho: um novo alvo terapêutico no tratamento da doença de Parkinson?

Daniela de Jesus Alexandre

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Bioquímica
(2º ciclo de estudos)

Orientador: Prof.^a Doutora Carla Fonseca

Covilhã, outubro de 2016

Klotho: um novo alvo terapêutico no tratamento da doença de Parkinson?
| Daniela Alexandre

*“E digo-vos que a vida é de facto obscuridade
excepto onde há arrebatamento,
e todo o arrebatamento é cego excepto onde há saber,
e todo o saber é vão excepto onde há trabalho
e todo o trabalho é vazio excepto onde há amor.
E o que é trabalhar com amor?
É pôr em todas as coisas que fazeis
um sopro do vosso espírito.”*

Khalil Gibran

Klotho: um novo alvo terapêutico no tratamento da doença de Parkinson?
| Daniela Alexandre

Agradecimentos / Dedicatória

Esta dissertação de mestrado não estaria completa sem um agradecimento a todas as pessoas que me ajudaram a tornar isto possível, e por isso dedico este espaço a todos aqueles que de uma forma decisiva contribuíram para a concretização deste trabalho.

Em primeiro lugar, não posso deixar de agradecer à minha família. Foram e são a base de tudo. Muito obrigado pelo apoio a todos os níveis e esforço dedicado ao longo destes anos, de outra forma, não teria chegado hoje até aqui. Ao meu avô, quero deixar um agradecimento especial, não teria conseguido sem ti também.

Em segundo lugar, agradeço à minha orientadora, Professora Doutora Carla Fonseca, pela sua orientação e espírito crítico demonstrado, assim como por todos os ensinamentos transmitidos ao longo de todo o projeto. Para além disso, agradeço também todo o apoio, incentivo, paciência e disponibilidade em ajudar, que sempre demonstrou ter para comigo ao longo da investigação. Muito Obrigado por tudo.

Gostaria também de agradecer à Professora Graça Baltazar por sempre se mostrar disponível a ajudar.

A todos os meus colegas de laboratório, agradeço toda a ajuda, companhia e apoio demonstrado. Em especial à Julieta, à Daniela, ao Cláudio e ao Diogo, pela transmissão de conhecimentos no início desta fase, ao Hernâni e à Marta por terem partilhado e tornado os dias no laboratório mais animados. Sem vocês este percurso não teria tido tantas gargalhadas. Obrigado por me terem “aturado” e ouvido durante todo este tempo, foi bom poder trabalhar e passar bons momentos com todos.

Por último, um especial obrigado a todos os meus amigos, em especial à Ana e ao Vasco por toda a compreensão, amizade e pela presença incansável com que sempre me apoiaram. Obrigado, por se tornarem todos a minha segunda família. Uma família que faço questão de guardar para a vida.

A todos aqueles que não referi, mas que não foram esquecidos, e que sempre acreditaram em mim e sempre me apoiaram. Um muito obrigado.

Finalmente, espero que esta etapa agora terminada possa, de alguma forma, retribuir e compensar todo o carinho, amor e dedicação que, constantemente, me oferecem.

Esta dissertação é-vos dedicada.

Klotho: um novo alvo terapêutico no tratamento da doença de Parkinson?
| Daniela Alexandre

Resumo

O envelhecimento é o principal fator de risco para a doença de Parkinson, a segunda doença neurodegenerativa mais comum, caracterizada principalmente pela perda progressiva e seletiva dos neurónios dopaminérgicos da via nigroestriatal, resultando numa diminuição dos níveis de dopamina nesta região e consequentemente em sintomas motores. Vários são os mecanismos que desempenham um papel importante na perda neuronal, estando entre eles o stress oxidativo, que leva à formação de radicais livres, e os processos neuroinflamatórios. Um dos principais objetivos da investigação no âmbito da DP é o desenvolvimento de fármacos que retardem ou parem o processo neurodegenerativo.

A Klotho é uma proteína supressora do envelhecimento e a sua sobre-expressão em ratos está associada a uma extensão do tempo de vida. Estudos anteriores mostraram que os níveis circulantes de Klotho diminuem com a idade e que existe uma forte correlação entre os níveis elevados da sua expressão e o estado saudável dos animais. Apesar das múltiplas funções atribuídas a esta proteína, o seu mecanismo de ação no cérebro não está completamente compreendido. Contudo, tem sido relatado que esta proteína melhora a plasticidade sináptica, as funções cognitivas e, para além disso, pode influenciar uma variedade de estruturas e funções do sistema nervoso central durante a maturação e o envelhecimento. Esta proteína é altamente expressa no cérebro, principalmente no plexo coróide e nos neurónios.

Estudos recentes têm atribuído à Klotho um papel importante na neuroprotecção. Menores concentrações de Klotho foram detetadas no líquido cefalorraquidiano de doentes de Alzheimer, quando comparado com indivíduos saudáveis da mesma idade. Esta proteína aumenta a resistência ao stress oxidativo por ativação de algumas vias de sinalização e, quando adicionada exogenamente *in vitro*, protege os neurónios do hipocampo da excitotoxicidade induzida pelo glutamato, através do sistema Trx/Prx, tendo sido proposta como um novo alvo terapêutico para a doença de Alzheimer. No que diz respeito à doença de Parkinson, sabe-se apenas que em murganhos mutantes para o gene da Klotho existe uma diminuição no número de neurónios dopaminérgicos na *substantia nigra* e nos níveis de dopamina no estriado, e que animais transgénicos para a Klotho (que sobre-expressam esta proteína) são menos vulneráveis ao stress oxidativo induzido pela exposição a MPTP.

Posto isto, o primeiro objetivo deste trabalho, foi averiguar uma possível ação neuroprotetora da Klotho num modelo celular da doença de Parkinson. Para tal foram utilizadas culturas primárias enriquecidas em neurónios e co-culturas de neurónios-glia do mesencéfalo ventral, às quais foi adicionada Klotho recombinante. A toxicidade dopaminérgica foi induzida por exposição ao 1-metil-4-fenilpiridina (MPP⁺) e a extensão da lesão foi analisada por imunocitoquímica. Os resultados obtidos mostraram que a Klotho, quando aplicada exogenamente e previamente à lesão, previne a perda dos neurónios dopaminérgicos do

Klotho: um novo alvo terapêutico no tratamento da doença de Parkinson?

| Daniela Alexandre

mesencéfalo ventral induzida pela toxina dopaminérgica MPP⁺ e que a presença de astrócitos é importante para esta neuroprotecção. O mecanismo pelo qual exerce este efeito é ainda desconhecido e merece uma investigação mais aprofundada. A ação neuroprotetora da Klotho é abolida quando esta é administrada após ou no momento da indução da lesão dopaminérgica.

O segundo objetivo deste trabalho, foi avaliar o papel da Klotho no controlo da inflamação mediada pela microglia. Utilizando culturas primárias enriquecidas em microglia do mesencéfalo ventral e o lipopolissacarídeo (LPS) como agente estimulante, verificámos que a Klotho consegue diminuir a libertação de NO pela microglia, induzida pelo LPS, sendo uma possível via pela qual a Klotho modula a reatividade microglial e consequentemente poderá exercer um efeito neuroprotetor.

Conjuntamente, os resultados obtidos neste trabalho mostram pela primeira vez que a administração exógena da Klotho é neuroprotetora para os neurónios dopaminérgicos do mesencéfalo ventral e exerce um efeito anti-inflamatório na microglia, podendo ser um ponto de partida na compreensão do papel da Klotho no contexto da doença de Parkinson. Os efeitos da administração exógena desta proteína deverão ser investigados em modelos animais da doença de Parkinson a fim de avaliar o seu potencial terapêutico nesta doença.

Palavras-chave

Klotho, neurónios dopaminérgicos, microglia, neuroproteção, neuroinflamação, doença de Parkinson.

Abstract

Aging is the main risk factor for Parkinson's disease, the second most common neurodegenerative disease, mainly characterized by progressive and selective loss of the dopaminergic neurons in the nigrostriatal pathway, resulting in a decrease of dopamine levels in this region and therefore in motor symptoms. There are several mechanisms that play an important role in neuronal loss, among them the oxidative stress, which leads to the formation of free radicals, and neuroinflammatory processes. One of the major research goals in the field of PD is the development of drugs that can retard or stop the neurodegenerative process.

Klotho is an aging-suppressor protein and its overexpression in mice is associated with an extension of the lifetime. Previous studies have shown that circulating levels of Klotho decrease with age and there is a strong correlation between high levels of expression and animal's health status. Besides the multiple functions attributed to this protein, the mechanism of action in the brain is not fully understood. However, it has been reported that this protein enhances synaptic plasticity, cognitive functions and can influence a variety of structures and functions in the central nervous system during maturation and aging. This protein is highly expressed in the brain, especially in the choroid plexus and neurons.

Recent studies have assigned to Klotho an important role in neuroprotection. Low Klotho concentrations were detected in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients compared with age-matched healthy individuals. This protein increases the resistance to oxidative stress by activation of some signaling pathways and, when added exogenously in vitro, protects hippocampal neurons from excitotoxicity induced by glutamate through the Trx / Prx system. Therefore it has been proposed as a new therapeutic target for Alzheimer's disease. Concerning Parkinson's disease, it is known that in mutant mice for the Klotho gene there is a decrease in the number of dopaminergic neurons in the *substantia nigra* and in dopamine levels in the striatum. Furthermore, Klotho transgenic mice, over-expressing this protein, are less vulnerable to the oxidative stress induced by MPTP exposure.

Hence, the first objective of this work was to investigate a possible neuroprotective effect of Klotho in a cellular model of Parkinson's disease. To achieve this, neuron-enriched primary cultures as well as neuron-glia cocultures obtained from the ventral midbrain, were incubated with the recombinant Klotho protein. The dopaminergic toxicity was induced by exposure to 1-methyl-4-phenylpyridine (MPP⁺) and lesion extent of lesions was evaluated by immunocytochemistry. The results showed that Klotho, when applied exogenously and prior to the MPP⁺ incubation, prevented the loss of ventral midbrain dopaminergic neurons induced by dopaminergic toxin MPP⁺. Furthermore, our data suggested that the presence of astrocytes is required for Klotho's neuroprotective effect. The mechanism by which Klotho exerts this effect

Klotho: um novo alvo terapêutico no tratamento da doença de Parkinson? | Daniela Alexandre

is unknown and deserves further investigation. The neuroprotective effect of Klotho is abolished when this protein is administered simultaneously or after the induction of dopaminergic injury.

The second goal of this study was to evaluate the role of Klotho in the control of microglia-mediated inflammation. Using ventral midbrain microglia-enriched cultures and the lipopolysaccharide (LPS) as a pro-inflammatory agent we observed that Klotho can prevent the LPS-induced release of NO by microglia. Therefore, Klotho is able to modulate microglial reactivity which may contribute for its neuroprotective effect.

Taken together, the present results show for the first time that exogenous administration of Klotho is neuroprotective for dopaminergic neurons of the ventral mesencephalon and has an anti-inflammatory effect in microglia, contributing to a better understanding of the role of Klotho in the context of Parkinson's disease. The effects of exogenously administered Klotho should be investigated in animal models of Parkinson's disease in order to assess their therapeutic potential use in this disease.

Keywords

Klotho, dopaminergic neurons, microglia, neuroprotection, neuroinflammation, Parkinson's disease.

Índice

LISTA DE FIGURAS.....	XV
LISTA DE TABELAS	XVII
LISTA DE ABREVIATURAS	XVIII
<u>Capítulo 1: Introdução.....</u>	<u>2</u>
1.1. DOENÇA DE PARKINSON	2
1.1.1. NEUROLOGIA DA DOENÇA DE PARKINSON	3
1.1.1.1. MPP ⁺ como modelo experimental	4
1.1.2. ETIOLOGIA DA DOENÇA DE PARKINSON	6
1.1.3. NEUROINFLAMAÇÃO	7
1.1.3.1. Evidências na doença de Parkinson.....	7
1.1.3.2. Papel das células gliais: Microglia e Astrócitos	8
1.1.3.3. Modelo experimental - LPS, um potente indutor de inflamação... ..	11
1.2. PROTEÍNA KLOTHO.....	11
1.2.1. ESTRUTURA E EXPRESSÃO DA KLOTHO	12
1.2.2. FUNÇÕES DA KLOTHO	14
1.2.3. EVIDÊNCIAS DA ACÇÃO DA KLOTHO NA NEUROPROTEÇÃO	16
<u>Capítulo 2: Objetivos.....</u>	<u>19</u>
<u>Capítulo 3: Material e Métodos</u>	<u>21</u>
3.1. PREPARAÇÃO DAS CULTURAS CELULARES.....	21
3.1.1. CULTURA DA LINHA CELULAR N27	21
3.1.2. CULTURAS PRIMÁRIAS ENRIQUECIDAS EM NEURÓNIOS E CO-CULTURAS DE NEURÓNIOS - GLIA DO MESENCÉFALO VENTRAL	21
3.1.3. CULTURAS PRIMÁRIAS DE MICROGLIA DO MESENCÉFALO VENTRAL.....	23
3.2. ESTIMULAÇÃO CELULAR	24
3.2.1. AVALIAÇÃO DO EFEITO DA KLOTHO NA VIABILIDADE DOS NEURÓNIOS DOPAMINÉRGICOS	24
3.2.1.1. Culturas Primárias	24

Klotho: um novo alvo terapêutico no tratamento da doença de Parkinson?

| Daniela Alexandre

3.2.1.2. Linha Celular N27	25
3.2.2. INFLUÊNCIA DA KLOTHO NA LIBERTAÇÃO DE NO PELA MICROGLIA	26
3.3. IMUNOCITOQUÍMICA	26
3.3.1. CONTAGEM CELULAR E ANÁLISE QUANTITATIVA.....	27
3.4. ENSAIO MTT	27
3.5. QUANTIFICAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO	28
3.6. ANÁLISE DE DADOS E ESTATÍSTICA.....	29
<u>Capítulo 4: Resultados</u>	<u>31</u>
4.1. AVALIAÇÃO DO EFEITO DA KLOTHO NA VIABILIDADE DOPAMINÉRGICA.....	31
4.1.1. SERÁ QUE O TRATAMENTO COM KLOTHO PROTEGE AS CÉLULAS N27 DA TOXICIDADE INDUZIDA PELA TOXINA MPP+?	31
4.1.1.1. Avaliação da toxicidade induzida pelo MPP+	31
4.1.1.2. Avaliação do efeito da Klotho na toxicidade induzida pelo MPP+ na linha celular N27	32
4.1.2. AVALIAÇÃO DO EFEITO DA KLOTHO NA TOXICIDADE INDUZIDA PELO MPP+ EM CULTURAS PRIMÁRIAS MISTAS DO MESENCÉFALO VENTRAL	34
4.1.2.1. Determinação da concentração de Klotho capaz de proteger os neurónios dopaminérgicos da toxicidade induzida pelo MPP+	35
4.1.2.2. Influência do tempo de incubação e momento da administração na ação neuroprotetora da Klotho	37
4.1.3. INFLUÊNCIA DA PRESENÇA DE ASTRÓCITOS NA NEUROPROTECÇÃO EXERCIDA PELA KLOTHO	39
4.2. AVALIAÇÃO DO EFEITO DA KLOTHO NA REATIVIDADE MICROGLIAL INDUZIDA PELO LPS	43
<u>Capítulo 5: Discussão e Conclusões</u>	<u>46</u>
5.1. EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DA KLOTHO NA VIABILIDADE DOS NEURÓNIOS DOPAMINÉRGICOS EXPOSTOS A UMA TOXINA.	46
5.2. EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DA KLOTHO NA MODULAÇÃO DA REATIVIDADE DA MICROGLIA.....	48
<u>Capítulo 6: Perspetivas futuras</u>	<u>51</u>
<u>Capítulo 7: Referências bibliográficas</u>	<u>53</u>

Lista de Figuras

FIGURA 1. Características neuropatológicas da DP	4
FIGURA 2. Representação das vias intracelulares do MPP ⁺ dentro dos ND	5
FIGURA 3. Representação esquemática dos mecanismos inflamatórios envolvidos na patogénese da DP.	10
FIGURA 4. Esquema das duas isoformas da Klotho	13
FIGURA 5. A distribuição do RNAm da Klotho por hibridação <i>in situ</i> no cérebro de rato adulto	14
FIGURA 6. Dissecção do mesencéfalo ventral em embriões de 15-16 dias de gestação.....	22
FIGURA 7. Secção coronal do encéfalo de rato	24
FIGURA 8. Representação esquemática do procedimento usado na estimulação das culturas primárias com KL e MPP ⁺	24
FIGURA 9. Representação esquemática do tratamento da linha celular N27 com MPP ⁺	25
FIGURA 10. Representação esquemática do procedimento usado na estimulação das culturas de células N27 com KL e MPP ⁺	25
FIGURA 11. Representação esquemática do procedimento usado na estimulação das culturas de microglia com KL e LPS	26
FIGURA 12. Curva padrão representativa	29
FIGURA 13. Avaliação do efeito de diferentes concentrações de MPP ⁺ na viabilidade das células N27	32
FIGURA 14. O pré-tratamento com a proteína Klotho não protege as células N27 da morte celular induzida por exposição ao MPP ⁺	34
FIGURA 15. Imagens de fluorescência representativas de uma imunocitoquímica realizada em culturas mistas do mesencéfalo ventral	36
FIGURA 16. O pré-tratamento de co-culturas de neurónios-glia com a proteína Klotho protege os ND da toxicidade induzida pela exposição ao MPP ⁺	37

FIGURA 17. Influência do tempo de incubação e momento da administração da Klotho na proteção das células dopaminérgicas da toxicidade induzida pelo MPP ⁺ em co-culturas de neurónios-glia do MV	39
FIGURA 18. Caracterização celular das culturas primárias mistas e enriquecidas em neurónios do MV	41
FIGURA 19. Contribuição dos astrócitos na neuroprotecção exercida pela Klotho em neurónios dopaminérgicos expostos ao MPP ⁺	42
FIGURA 20. Efeito da pré-incubação com KL na libertação de NO induzida pelo LPS em culturas enriquecidas em microglia do MV	44

Lista de Tabelas

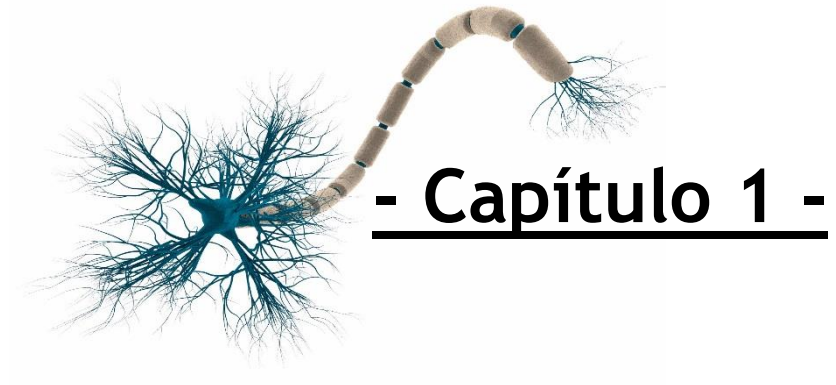
TABELA 1- Descrição dos anticorpos primários e secundários utilizados nos ensaios de imunocitoquímica.

Lista de Abreviaturas

BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
cAMP	Monofosfato de adenosina cíclico
CLs	Corpos de Lewy
COX-2	Ciclooxigenase 2
DA	Dopamina
DAT	Transportadores de dopamina
DP	Doença de Parkinson
ERO	Espécies reativas de oxigênio
ERS	Espécies reativas de enxofre
FBS	Soro fetal bovino
FGFRs	Recetores do fator de crescimento de fibroblastos
FGF23	Fator de crescimento de fibroblastos-23
GDNF	Fator neurotrófico derivado de uma linha de células da glia
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina 1
IL	Interleucina
INF-γ	Interferão- γ
iNOS	Sintase do óxido nítrico indutível
KL	Klotho
KL-i	Isoforma intracelular da Klotho
KL-m	Isoforma transmembranar da Klotho
KL-s	Isoforma solúvel da Klotho
LCR	Líquido cefalorraquidiano
L-DOPA	L-3,4-di-hidroxifenilalanina ou levodopa
LPS	Lipopolissacarídeo
MAO-B	Monoamina oxidase B
MNB	Meio neurobasal
MPP⁺	1-metil-4-fenilpiridina
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetra-hidropiridina
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
MV	Mesencéfalo ventral
ND	Neurónios dopaminérgicos
NED	N-1-naftiletilenodiamina
NF-κB	Fator nuclear kappa B
NGF	Factor de crescimento nervoso
PBS	Tampão fosfato salino

Klotho: um novo alvo terapêutico no tratamento da doença de Parkinson?
| Daniela Alexandre

PFA	Paraformaldeído
PKC	Proteína cinase C
Prx	Peroxirredoxina
RIG-I	Gene indutível do ácido retinóico-I
SN	<i>Substantia nigra</i>
SNC	Sistema nervoso central
SNpc	<i>Substantia nigra pars compacta</i>
TGF- β	Fator de crescimento transformador β
TH	Tirosina hidroxilase
TNF- α	Fator de necrose tumoral- α
Trx	Tiorredoxina
6-OHDA	6-hidroxi-dopamina



Introdução

- 1.1 Doença de Parkinson
- 1.2 Proteína Klotho

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO

1.1. Doença de Parkinson

As doenças neurodegenerativas são um grupo heterogêneo de doenças crônicas e progressivas caracterizadas pela perda lenta e gradual de neurónios em áreas discretas do sistema nervoso central (SNC), levando conseqüentemente a perturbações e à perda progressiva das funções específicas associadas à região do SNC afetada, como por exemplo, a coordenação motora, a mobilidade, a memória e a cognição (Ransohoff, 2016). Devido a fatores genéticos, ambientais e endógenos, vários são os processos que podem levar à perda neuronal nestas doenças, tais como defeitos na degradação e agregação de proteínas, stress oxidativo, disfunções bioenergéticas e mitocondriais, interrupções do aparelho de Golgi neuronal e transporte axonal, chaperones moleculares, neurotrofinas, entre outros (Jellinger, 2009). Estas doenças ocorrem principalmente nas fases posteriores da vida e incluem a doença de Alzheimer, doença de Parkinson (DP), esclerose lateral amiotrófica e doença de Huntington (Lin and Beal, 2006).

A DP tem vindo a tornar-se cada vez mais prevalente nos últimos anos como resultado de um envelhecimento populacional, sendo atualmente a segunda doença neurodegenerativa mais comum depois da doença de Alzheimer. Em termos epidemiológicos, a DP apresenta uma prevalência nos países industrializados de aproximadamente 0.3% da população em geral, atingindo cerca de 1% em pessoas com mais de 60 anos, e aumentando para cerca de 4-5% na população com mais de 85 anos de idade (Schrag et al., 2000). O género também parece influenciar, sendo vários os estudos que demonstram existir maior incidência nos indivíduos do sexo masculino numa proporção de 2:1 (Miller and Cronin-Golomb, 2010), possivelmente devido aos conhecidos efeitos neuroprotetores dos estrogénios (Dexter and Jenner, 2013).

Clinicamente, esta patologia foi caracterizada por várias alterações motoras importantes, primeiramente por James Parkinson, no século 19 e, mais tarde aprofundadas por Jean-Martin Charcot. Tremor em repouso, rigidez muscular, bradicinesia (ou acinesia) e instabilidade postural são atualmente considerados os principais sintomas motores e, normalmente surgem de forma assimétrica (Fahn, 2003). Embora a DP seja considerada uma doença do movimento e os sintomas motores dominem o quadro clínico, os doentes também apresentam uma variedade de sintomas não motores, subvalorizados, e que podem antecipar os sintomas motores, nomeadamente disfunções autonómicas, deficiências cognitivas e sensoriais, alterações psiquiátricas, fadiga anormal e perturbações do sono (Postuma et al., 2012).

Esta patologia apresenta uma incidência de 5 a 346 casos em cada cem mil pessoas por ano (Chen and Tsai, 2010) no entanto, o tratamento existente é apenas sintomático e ineficaz na paragem do processo neurodegenerativo. Desde 1960, a terapêutica nas fases iniciais da doença

tem sido mais focada no uso de fármacos para a substituição ou suplementação de dopamina (DA) e para a estimulação direta dos seus recetores (Kalia and Lang, 2015). Contudo, a utilização de anticolinérgicos e inibidores de enzimas, como a dopa-descarboxilase, a monoamina oxidase B (MAO-B) e a catecol-orto-metil-transferase (COMT), também têm sido uma alternativa eficaz na melhoria dos sintomas motores (Dexter and Jenner, 2013; Müller, 2012). De entre as alternativas farmacológicas, a mais usada é a L-3,4-di-hidroxifenilalanina (L-DOPA ou levodopa), todavia o seu uso prolongado é frequentemente acompanhado por complicações motoras, incluindo flutuações motoras e discinesia induzida por L-DOPA, sendo necessário um posterior ajuste da dosagem ou a combinação com outros agonistas dopaminérgicos, como a apomorfina, que controlem os sintomas adversos (Salat and Tolosa, 2013). Além disso, embora algumas disfunções motoras da DP, tais como os tremores e a discinesia, possam ser aliviados com esta terapia, a instabilidade postural e sintomas não motores, nomeadamente as perturbações neuropsiquiátricas, são menos sensíveis e requerem abordagens alternativas. Recentemente, a investigação tem-se centrado em abordar diferentes estratégias não farmacológicas, recorrendo à estimulação cerebral profunda, estimulação magnética transcraniana repetitiva, à terapia génica e de reposição celular. Para além disso, tem sido também sugerido o uso de fatores neurotróficos e anti-inflamatórios (Li et al., 2016; Armando et al., 2016; Sarkar et al., 2016) como terapias neuroprotetoras.

1.1.1. Neuropatologia da doença de Parkinson

Neuropatologicamente, a DP é caracterizada pela perda progressiva dos neurónios dopaminérgicos (ND) da *substantia nigra pars compacta* (SNpc) do mesencéfalo. Estes ND projetam os seus axónios principalmente para o corpo estriado (caudado-putamen), formando a via nigroestriatal. É no corpo estriado que se dá uma depleção de DA em consequência da degeneração dos terminais dopaminérgicos, originando os sintomas motores referidos anteriormente. Os primeiros sintomas aparecem quando os níveis de DA no estriado são reduzidos em 80% ou quando 60% dos ND nigrostriatais são perdidos (Dauer and Przedborski, 2003). Uma vez que, a via nigroestriatal contém grandes quantidades de neuromelanina, a perda acentuada destes neurónios induz a despigmentação da SNpc característica desta doença (Wakabayashi et al., 2006) (Figura 1).

Para além dos ND da via nigroestriatal outros sistemas de neurotransmissores (por exemplo colinérgico, adrenérgico e serotoninérgico) também são afetados e a perda de células é vista em outros núcleos do tronco cerebral e no córtex, uma importante causa dos sintomas não motores (Hirsch and Hunot, 2009).

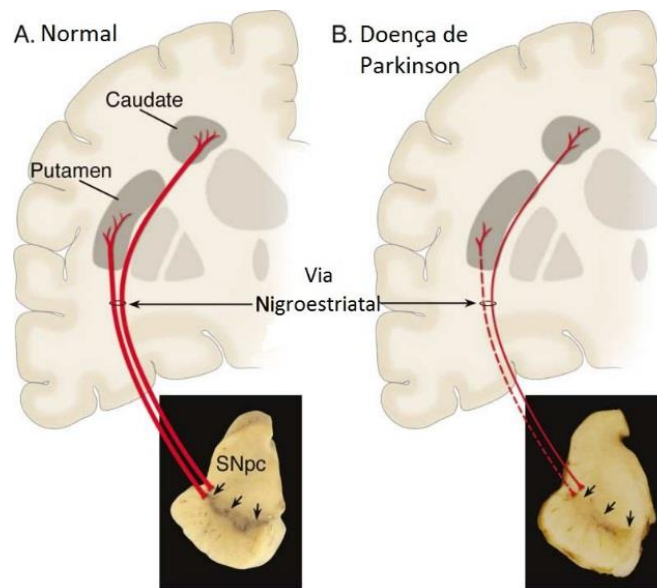


Figura 1 - Características neuropatológicas da DP. Representação esquemática da via nigroestriatal normal (A) e característica da DP (B). As fotografias mostram a pigmentação da SNpc num indivíduo saudável, resultante da presença de neuromelanina nos ND, e a sua despigmentação num doente de Parkinson. Adaptado de Dauer and Przedborski 2003.

Esta patologia é ainda caracterizada pela presença de inclusões citoplasmáticas eosinofílicas neuronais, designadas corpos de Lewy (CLs), em consequência da acumulação anormal de uma vasta gama de proteínas, maioritariamente da α -sinucleína, uma pequena proteína que é amplamente expressa no cérebro, e outras substâncias. Contudo, a presença apenas destes corpos não explica o aparecimento e a progressão da DP (Dickson et al., 2009).

Patologicamente, tem sido sugerido que tanto a perda seletiva dos ND como a acumulação da α -sinucleína é influenciada por vários fatores, entre eles disfunções no sistema ubiquitina-proteossoma, disfunções mitocondriais, perturbações na homeostase do cálcio, neuroinflamação e alterações nos mecanismos de proteção contra stress oxidativo e apoptose (Zuo and Motherwell, 2013; Hirsch et al., 2013; Ciechanover and Kwon, 2015; Michel et al., 2016). Os modelos experimentais da DP são essenciais, pois permitem o estudo dos mecanismos patogénicos assim como de diferentes abordagens terapêuticas.

1.1.1.1. MPP⁺ como modelo experimental

Apesar de nenhum dos modelos validados atualmente mimetizar por completo a doença, os baseados no uso de neurotoxinas dopaminérgicas estão entre os primeiros modelos desenvolvidos e têm sido amplamente utilizados (Jagmag et al., 2015). Estes modelos conseguem reproduzir muitas, mas não todas, as características patológicas e permitem analisar a base molecular da neurodegeneração nigroestriatal de forma objetiva e com relevância direta para a doença. As toxinas mais frequentemente utilizadas são a 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA) e o 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetra-hidropiridina (MPTP), ambas

Klotho: um novo alvo terapêutico no tratamento da doença de Parkinson? | Daniela Alexandre

relativamente seletivas para os ND e indicadas quando o objetivo de estudo é diminuir/impedir a morte destes neurónios (Schober, 2004).

O MPTP foi acidentalmente descoberto como um contaminante, num grupo de toxicodependentes que desenvolveram uma síndrome Parkinsoniana após injeções intravenosas de 1-metil-4-fenil-4-propionoxipiperidina (MPPP), um análogo da heroína sintética. Os efeitos neurotóxicos causados pelo MPTP, levaram a fenótipos clínicos motores e histopatológicos semelhantes aos observados na DP, à exceção dos CLs (Bove, et al., 2005).

A molécula MPTP é bastante lipossolúvel e rapidamente atravessa a barreira hematoencefálica (BHE). Uma vez no cérebro, é convertido no seu metabolito ativo 1-metil-4-fenilpiridina (MPP^+), pela ação da MAO-B presente nas células gliais e, libertado para o espaço extracelular (Jackson-Lewis and Przedborski, 2007). Uma vez que o MPP^+ é uma molécula polar e apresenta uma maior afinidade para os transportadores de dopamina (DAT, do inglês “DopAmine Transporter”) comparativamente aos transportadores de norepinefrina e serotonina, este consegue entrar nos ND e seguir pelo menos três vias: (1) ser sequestrado em vesículas sinápticas (Del Zompo et al., 1993); (2) acumular-se dentro das mitocôndrias por um mecanismo que depende do potencial transmembranar (Ramsay and Singer, 1986); e (3) permanecer no citosol e interagir com enzimas citosólicas (Adams et al., 1993) (Figura 2). Dentro da mitocôndria, o MPP^+ bloqueia a cadeia transportadora de eletrões através da inibição do complexo I mitocondrial, levando à depleção de energia, ao aumento da produção de espécies reativas de oxigénio (ERO), danos oxidativos irreversíveis na membrana mitocondrial e ainda à ativação da cascata apoptótica nas células (Chong et al., 2015).

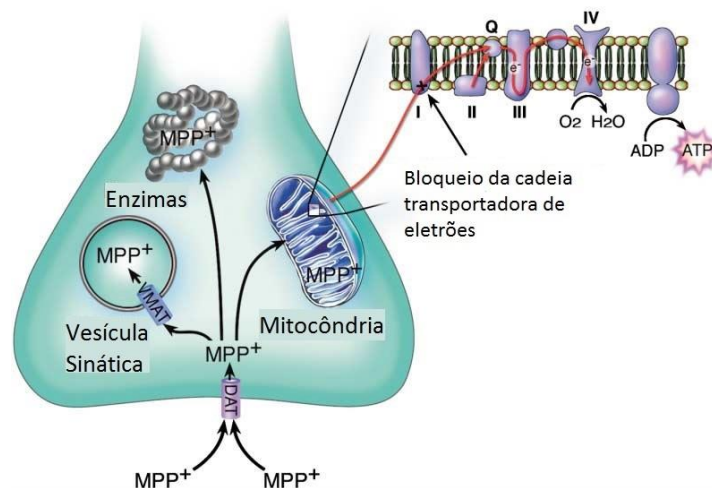


Figura 2 - Representação das vias intracelulares do MPP^+ dentro dos ND. O MPP^+ pode seguir uma de três vias: (1) acumulação dentro da mitocôndria através de um processo ativo (tóxico); (2) interação com enzimas citosólicas (tóxico); (3) captação em vesículas sinápticas através dos transportadores vesiculares de monoaminas (VMAT-2) (proteção). Dentro da mitocôndria bloqueia o complexo I, interrompendo a transferência de eletrões para a ubiquinona (Q) e consequentemente a síntese de ATP. Adaptado de Dauer and Przedborski 2003.

Klotho: um novo alvo terapêutico no tratamento da doença de Parkinson?

| Daniela Alexandre

Numa outra perspectiva, a inflamação também desempenha um papel importante na neurotoxicidade induzida pelo MPTP. Este composto provoca uma reação caracterizada pela infiltração de células T, pela ativação microglial e pelo aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina (IL)-1 beta (IL-1B), fator de necrose tumoral (TNF, do inglês “Tumour Necrosis Factor”) - α (TNF α) e interferão (IFN, do inglês “InterFeroN”)- γ (IFN γ) na *substantia nigra* (SN) e no estriado. Além disso, a microglia ativada pode libertar compostos citotóxicos para os neurónios, inclusive fatores pró-inflamatórios, que por sua vez também estimulam a expressão da iNOS, e a libertação de óxido nítrico (NO), assim como a produção de ERO, como óxido nítrico (NO), peróxido de hidrogénio (H₂O₂) e anião superóxido (O₂⁻) (Machado et al. 2016; Kurkowska-Jastrzebska I., et al., 2009). Além disso, estudos *postmortem* em humanos e macacos realizados vários anos após a exposição ao MPTP mostraram evidências de microglia ativada na SN, característica neuropatológica da DP (Bove et al., 2005; McGeer et al., 2003).

Posto isto, todas estas observações permitiram a que deste então, o MPTP, seja utilizado para o estudo da patogénese da doença em vários modelos, uma vez que tem a capacidade de causar bilateralmente a degeneração seletiva dos ND, principalmente os nigroestriatais, e a perda de DA no estriado após a sua administração sistémica, contrariamente ao que muitas vezes acontece com outras neurotoxinas documentadas (Meredith and Rademacher, 2011). Para além disso, a degeneração dos terminais nervosos que projetam para o putamen é maior do que aqueles que projetam para o núcleo caudado, assemelhando-se também ao fenótipo da DP (Jagmag, S. A., et al., 2015). A escolha do modelo perfeito dependerá sempre dos objetivos específicos de cada um.

1.1.2. Etiologia da doença de Parkinson

De longe, a idade representa o maior fator de predisposição para a DP, possivelmente devido a falhas nos processos celulares bioquímicos normais, através da acumulação de mutações no DNA mitocondrial e produção de ERO que ocorrem com o envelhecimento e tornam os ND mais vulneráveis a agressões tóxicas (Lin and Beal, 2006). A maioria dos casos da DP acontecem de forma idiopática, contudo existem evidências que apoiam que a neurodegeneração está também interligada com uma variedade de fatores, incluindo fatores genéticos, ambientais e imunológicos (Armando et al., 2016).

Os fatores genéticos parecem contribuir em aproximadamente 10% dos casos da DP. Mutações nos genes que codificam a α -sinucleína, a parkina (PRKN), a UCH-L1 (do inglês “Ubiquitin C-terminal Hydrolase L1”), a PINK1 (do inglês “PTEN-Induced putative Kinase 1”) e a LRRK2 (do inglês “Leukine-Rich Repetition Kinase 2”) foram já identificadas em formas familiares da DP em que os CLs também são identificados, e podem levar a disfunções no “handling” das proteínas e consequentemente à degeneração (Rosner et al., 2008). Os fatores ambientais que têm vindo a ser associados são vários, entre eles a exposição a pesticidas, a ocupação agrícola

e o uso de β -bloqueadores (Noyce et al., 2012). Recentemente, estudos também apontam para um possível papel dos mecanismos autoimunes no desenvolvimento da doença. Um aumento significativo dos níveis de citocinas da imunidade inata, incluindo a IL-1, IL-2, IL-6, e TNF na SN e no líquido cefalorraquidiano (LCR) têm sido observados em doentes de Parkinson (Armando et al., 2016). Por outro lado, existem vários mecanismos endógenos que em conjunto podem também contribuir para a patogênese, entre eles o stress oxidativo, disfunções mitocondriais, “folding” anormal de proteínas, inclusões citoplasmáticas de proteínas, excitotoxicidade e ainda a perda de fatores neurotróficos (fator neurotrófico derivado de uma linha de células da glia (GDNF, do inglês “Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor”), neurturina, etc.) (Yacoubian, 2009).

Apesar de todos os processos que desencadeiam a DP, uma característica proeminente das várias doenças neurodegenerativas ainda não referida, mas bastante importante e cada vez mais apontado como uma causa é a neuroinflamação, na qual ocorre uma ativação crónica imunitária, em particular da microglia (Amor et al., 2010).

1.1.3. Neuroinflamação

Têm surgido cada vez mais evidências de que a neurodegeneração progressiva que ocorre durante alguns anos está também muito associada à inflamação crónica. O conceito de inflamação, mais particularmente neuroinflamação, sofreu uma grande transformação nos últimos anos e é definida como a resposta do cérebro a lesões, infeções ou doença. A nível cerebral, os mecanismos neuroinflamatórios incluem as respostas exercidas pelas células da microglia (microglia reativa), em menor grau pelos astrócitos (astroglia) e pelos leucócitos. Contudo, estas alterações não são específicas da DP e estes processos podem contribuir para várias doenças neurodegenerativas (Hirsch and Hunot, 2009).

1.1.3.1. Evidências na doença de Parkinson

A neuroinflamação é uma característica evidente nesta patologia, contudo ainda não foi determinado se esta neuroinflamação protege ou promove a neurodegeneração.

Em 1988, surgiram as primeiras evidências do envolvimento da neuroinflamação na DP. McGeer et al, por imunohistoquímica, conseguiram identificar microglia reativa na SNpc em cérebros *postmortem* de doentes com Parkinson (McGeer et al., 1988). Posteriormente, através da mesma abordagem, mais estudos realizados por Imamura et al. permitiram também observar que esta ativação microglial não estava limitada à SN, mas também se estendia ao putamen, hipocampo, córtex transentorrinal, córtex cingulado e córtex temporal (Imamura et al., 2003). Desde então, diversas são as evidências que suportam e cada vez mais confirmam a ideia de que as respostas inflamatórias mediadas pela microglia contribuem significativamente para o processo de degeneração. Alterações na ativação microglial correspondentes à perda de terminais dopaminérgicos, na via nigroestriatal, no início da doença (Ouchi et al., 2005) e

concentrações aumentadas de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1 β , IFN- γ , na via nigroestriatal, no LCR e soro de doentes com Parkinson (Nagatsu and Sawada, 2007), são exemplos de algumas descobertas. De facto, alguns estudos induziram uma menor expressão destas citocinas na SN e como expectável foi visível um retardo na degeneração progressiva dos ND e nos sintomas motores (De Lella Ezcurra et al., 2010).

Num outro ponto de vista, a reação astrocítica é outra bem conhecida característica neuropatológica da SN na DP. Embora, Mirza e seus colaboradores não conseguissem identificar astrócitos reativos na SN e no estriado de tecidos *postmortem* de doentes de Parkinson (Mirzra, 2000), estudos posteriores revelaram uma astrogliose ativa que pode manter a degeneração dos ND. Em muitos casos de doentes com Parkinson, é observado um ligeiro aumento no número de astrócitos reativos que expressam a proteína ácida fibrilar glial (GFAP, do inglês “Glial Fibrillary Acidic Protein), e adicionalmente este aumento correlaciona-se inversamente com a degeneração dos ND (Damier et al., 1993). Mais recentemente, tem sido sugerido que nem todos os astrócitos expressam GFAP a uma concentração detetável, e que alternativamente a Cistatina C e Conexina 43 podem ser utilizadas como marcadores em astrócitos GFAP-negativos (Wilhelmsson et al., 2006). Modelos animais injetados com MPTP e depois sacrificados em tempos diferentes mostraram também uma correlação direta entre o número de astrócitos reativos e a degeneração dopaminérgica em ambas as regiões, SN e estriado (Aoki et al., 2009).

1.1.3.2. Papel das células gliais: microglia e astrócitos

As células microgлияis são macrófagos especializados do SNC e um dos principais tipos de células moduladoras das respostas inflamatórias. O ambiente do SNC é geralmente imunossupressor, levando a que a microglia seja mantida num estado de repouso, com uma morfologia ramificada, em relação aos outros macrófagos teciduais. No entanto, após a sua ativação elas adquirem uma morfologia ameboide para facilitar a migração para o local da lesão, e podem realizar por um lado acções benéficas importantes, e por outro, acções prejudiciais (Block et al. 2007).

Especificamente em resposta a lesões, a microglia ativada tem a capacidade de rodear os neurónios danificados e participar no seu processo de reparação e desenvolvimento, através da libertação de fatores neuroprotetores, nomeadamente o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF, do inglês “Brain-Derived Neurotrophic Factor”) e o GDNF (Lull and Block, 2010; Yokoyama et al., 2011). Para além disso, estas células podem contribuir com a secreção de fatores anti-inflamatórios e também estimular os astrócitos a remover o glutamato durante uma resposta inflamatória. Porém, a sua ativação persistente, por exemplo em resposta a danos neuronais ou toxinas ambientais, pode amplificar o dano progressivo dos neurónios circundantes através da produção de fatores neurotóxicos, tais como o glutamato, metabolitos do ácido araquidónico, histamina e citocinas pró-inflamatórias que induzam a expressão da iNOS ou da

Klotho: um novo alvo terapêutico no tratamento da doença de Parkinson?

| Daniela Alexandre

ciclo-oxigenase 2 (COX2), e de enzimas produtoras de ERO (Smith et al. 2012; Lull and Block, 2010; Block and Hong, 2007; Klegeris et al. 1997).

Existem evidências que indicam que a microglia pode adquirir dois fenótipos de ativação distintos, sendo eles (1) o fenótipo M1 (pró-inflamatório), que leva à produção de ERO, NO, quimiocinas, citocinas, tais como o TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-1 e excitotoxinas, nomeadamente o glutamato que foi referido anteriormente, e (2) o fenótipo M2 (anti-inflamatório), que leva à libertação de citocinas anti-inflamatórias, como IL-4, IL-13, IL-10 e o fator de transformação do crescimento beta (TGF- β , do inglês “Transforming Growth Factor”)- β (TGF- β). Foi demonstrado que o tratamento LPS/IFN- γ induz o fenótipo M1, enquanto que o tratamento com IL-4/IL-13, desencadeia o fenótipo M2 (Wang et al., 2015). Em doentes com Parkinson, existem evidências de que a proliferação da microglia ocorre no estágio inicial da doença e que esta permanece relativamente estática (Sastre et al., 2014). No entanto, a degeneração dopaminérgica durante a progressão da doença, tem sido associada a um aumento de produção de citocinas pró-inflamatórias, evidenciando mais uma vez que a microglia tem a capacidade de adquirir fenótipos distintos ao longo da progressão da doença, sendo estes caracterizados por secretar diferentes quantidades de citocinas. No entanto, até à data, tem havido poucos estudos do fenótipo da microglia e de estratégias terapêuticas que sejam capazes de mudar o fenótipo com a finalidade de reduzir a progressão da doença (Pisanu et al., 2014).

Os astrócitos estão presentes em todas as regiões do cérebro e desempenham um papel crucial no controlo homeostático do meio extracelular no SNC e, tal como a microglia, estão também envolvidos nos processos neuroinflamatórios. Em resposta a situações patológicas, como danos neuronais, agressões tóxicas e isquémia, estas células ficam ativadas e têm a capacidade de proliferar e migrar para o local da lesão (Tilleux and Hermans, 2007). Esta astrogliose reativa tem sido verificada em vários modelos animais e é caracterizada por alterações morfológicas hipertróficas e pela sobre-expressão de GFAP e da proteína Conexina 43 (Haupt et al., 2007).

Na verdade, tal como a microglia, os astrócitos também respondem a estímulos inflamatórios, inclusive à IL-1 β e ao TNF- α , suportando a hipótese de que estas citocinas podem levar à ativação astrocitária após lesão do SNC (Yokoyama et al., 2011). Ou seja, a libertação de mediadores pró-inflamatórios pela própria microglia ativada, também podem contribuir para uma astrogliose reativa. Para além disso, está também descrito que, ao mesmo tempo, os astrócitos secretam moléculas com potencial neurotóxico, como NO, espécies reativas de enxofre (ERS) e várias citocinas pró-inflamatórias, tanto *in vitro* como *in vivo*, contribuindo desta forma para a degeneração neuronal e neuroinflamação (Saijo et al., 2009; Tanaka et al., 2013). Por outro lado, também um papel neuroprotetor é atribuído aos astrócitos, pois estes adicionalmente secretam citocinas anti-inflamatórias e múltiplos agentes de proteção neuronal, como fatores neurotróficos, inclusive o fator de crescimento nervoso (NGF), a neurotrofina-3, o GDNF, o BDNF, entre outros, que são essenciais na proteção neuronal e parecem estar envolvidos no controlo da ativação microglial (Yokoyama et al., 2011; Rocha et

Klotho: um novo alvo terapêutico no tratamento da doença de Parkinson?

| Daniela Alexandre

al., 2012), garantindo assim a sobrevivência e o correto funcionamento dos neurónios. Além disso, os astrócitos podem ainda reduzir o stress oxidativo e impedir a produção de NO por um mecanismo dependente da glutatona (Yokoyama et al., 2011). O aumento de 30% de astrócitos reativos na SN de doentes com Parkinson, poderá indicar uma tentativa de neuroprotecção em resposta ao dano oxidativo (Mythri et al., 2011).

Portanto, a neuroinflamação descontrolada causada pela ativação sinérgica da microglia e dos astrócitos contribui em parte para a neurodegeneração dos ND na SNpc (Figura 3). Todavia, todos estes estudos não implicam que a neurodegeneração seja apenas uma consequência da neuroinflamação. Outras linhas de evidência sugerem também que a degeneração neuronal pode ser a causa dos processos inflamatórios (Block et al. 2007).

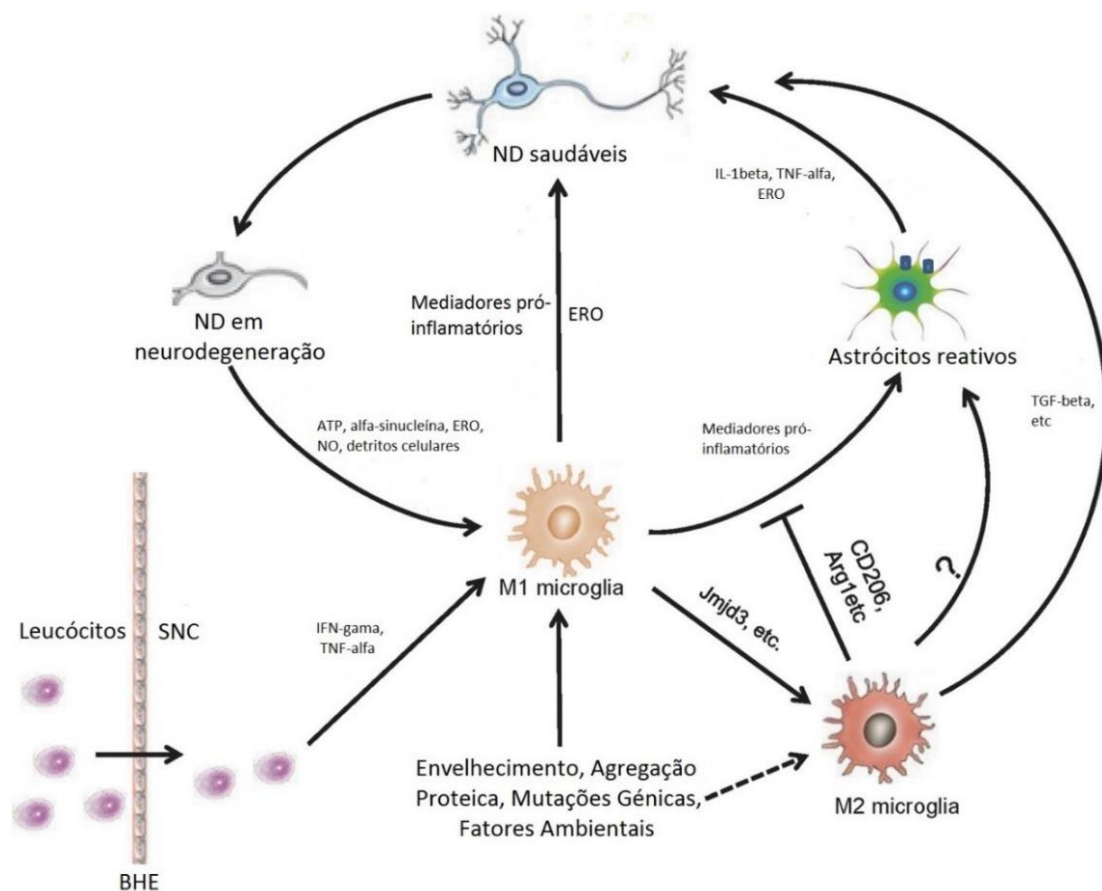


Figura 3 - Representação esquemática dos mecanismos inflamatórios envolvidos na patogênese da DP. A microglia adquire o fenótipo M1 em condições patológicas, tais como a agregação de proteínas, mutações de genes, fatores ambientais e citocinas libertadas pelos linfócitos infiltrados. Os mediadores pró-inflamatórios libertados pela microglia M1 ativam os astrócitos, que por sua vez produzem fatores pró-inflamatórios, NO e o radical SO_2^- , contribuindo para a degeneração dos ND. Os ND em degeneração libertam moléculas que podem promover a ativação das células da glia e potenciar a resposta inflamatória. Em determinada fase da DP, uma subpopulação da microglia pode adquirir o fenótipo ativado M2, libertando fatores anti-inflamatórios, incluindo TGF- β , e exercer um efeito neuroprotetor na DP. Adaptado de Wang et al., 2015.

1.1.3.3. Modelo experimental - LPS, um potente indutor de inflamação

O LPS é um componente central da membrana externa das bactérias Gram-negativas e frequentemente atua como uma endotoxina ativa, sendo responsável por iniciar uma cascata de eventos durante infecções bacterianas através da produção de citocinas e outros mediadores inflamatórios e do aumento dos níveis de stress oxidativo, eventos estes também presentes na DP. Está documentado que existem vários locais de ligação do LPS à membrana, tendo sido também identificadas algumas proteínas solúveis com a capacidade de se ligarem ao LPS. A proteína de ligação ao LPS, a proteína CD14 e a família de recetores *toll-like* (TLR do inglês “Toll-Like Receptors”), parecem estar entre os mais importantes (Liu and Bing, 2011). Posteriormente, as células microgliais foram reconhecidas como as principais células no cérebro responsivas ao LPS. Portanto, após uma ativação microglial induzida pelo LPS, há libertação de várias citocinas como a IL-1 β , a IL-6, o TNF- α , o factor nuclear kappa B (NF- κ B do inglês “Nuclear Factor κ B”) e uma maior expressão da iNOS (com conseqüente aumento na produção e libertação de NO), de prostaglandinas e um aumento na libertação de ERO pela NADPH oxidase, fatores que em conjunto contribuem para a morte neuronal (Hurley and Tizabi, 2013; Liu and Bing, 2011; Lull and Block, 2010).

Durante as duas últimas décadas, estudos têm demonstrado que a inflamação induzida pelo LPS pode efetivamente replicar algumas características presentes na DP, tanto *in vivo* como *in vitro*, incluindo a extensa ativação da microglia e a degeneração progressiva do sistema dopaminérgico (Qin et al., 2007). Por outro lado, estudos *in vitro* a partir de culturas mesencefálicas de ratos, permitiram aos investigadores concluir que, existe uma suscetibilidade diferencial das regiões cerebrais ao LPS. Embora pareça ter impacto sobre os neurónios do mesencéfalo em geral, existe uma correlação positiva entre a abundância de microglia da região e a neurotoxicidade induzida pelo LPS (Bronstein et al., 1995).

Posto isto, o modelo de LPS é uma ferramenta útil nos estudos dos mecanismos envolvidos na reatividade microglial e também no estudo dos mecanismos pelos quais a reatividade microglial pode causar a degeneração dopaminérgica.

1.2. Proteína Klotho

O gene da proteína Klotho (KL) foi originalmente identificado por Matsumura et al, em 1997, através de uma mutação espontânea na região promotora numa estirpe de murganhos que apresentavam múltiplos aspetos característicos do envelhecimento humano de uma forma autossómica recessiva. Estes fenótipos não eram visíveis até 3-4 semanas de idade, mas posteriormente a deficiência em KL resultava em sintomas como retardo do crescimento,

arteriosclerose, atrofia cutânea e das gônadas, infertilidade, hipoglicemia, osteoporose, enfisema pulmonar, deficiências cognitivas, degeneração dos neurônios motores, e a morte prematura entre 2 a 3 meses de idade (Kuro-o et al., 1997). Assim, uma redução no nível desta proteína é prejudicial para todo o organismo. Por outro lado, a sobre expressão do gene da KL em murganhos transgênicos, leva do tempo de vida destes animais entre 20% a 30%, a uma melhoria do desempenho cognitivo a uma maior resistência ao stress oxidativo. Em conjunto, estes resultados suportam a ideia de que a KL pode desempenhar um papel importante na regulação do processo de envelhecimento (Kurosu et al., 2005; Masuda et al., 2005).

O gene humano da KL localiza-se no cromossoma 13q12 e é altamente conservado entre as espécies, tendo 98% de homologia entre humanos e murganhos. Por conseguinte, os dados em humanos são muito concordantes com os descritos em animais experimentais (Xu and Sun, 2015; Matsumura et al., 1998). Em humanos, os níveis séricos desta proteína diminuem com a idade após os 40 anos (Yamazaki et al., 2010; Pedersen et al., 2013; Sihanidou et al., 2012), sendo que esta diminuição pode ser observada em indivíduos com várias doenças relacionadas com a idade, tais como cancro, hipertensão e doença renal (Xu and Sun, 2015). Deste modo, recentemente foi sugerido que os níveis séricos da KL podem servir como um biomarcador do envelhecimento (Koyama et al., 2015). Contudo, apenas um caso de mutação da KL humana foi descrito até à data, mas vários polimorfismos de um único nucleótido têm sido detetados no gene desta proteína e associados com o envelhecimento humano (Di Bona et al., 2014). Notavelmente, alguns desses polimorfismos estão associados com tempos de vida mais curtos (Arking et al., 2002) e ao aumento do risco de múltiplas desordens relacionadas com a idade, como a doença arterial coronária, osteoporose e acidente vascular cerebral (Kim et al., 2015).

1.2.1. Estrutura e expressão da Klotho

Em murganhos e humanos, o gene da KL é composto por cinco exões e codifica uma glicoproteína transmembranar do tipo 1 de 130 kDa com 1014 e 1012 aminoácidos de comprimento, respetivamente (Kuro-o, et al., 1997). O domínio intracelular é muito curto e não tem domínios funcionais conhecidos. Já o domínio extracelular é composto por duas repetições internas com uma sequência de aminoácidos semelhante à família de glicosidasas I que hidrolisam as ligações β -glucosídicas. Três tipos de proteínas KL já foram descritas, sendo elas a transmembranar (KL-m), a intracelular (KL-i) e a secretada (KL-s). Estas três proteínas foram detetadas em seres humanos e murganhos (Wang and Sun, 2009; Matsumura et al., 1998). A região ligante entre estas duas repetições do domínio extracelular contém quatro aminoácidos básicos (Lys-Lys-Arg-Lys), um local propício para clivagem proteolítica. Consequentemente, o domínio extracelular da proteína KL-m, pode ser clivado por proteases de membrana, como ADAM10, ADAM17 e BACE1, e ser libertado para o espaço extracelular, dando origem à KL-s com 65 kDa (Figura 4). Esta s-KL já foi detetada na circulação sistémica, urina e LCR, podendo funcionar como uma hormona autócrina e parácrina em células alvo de múltiplos tecidos e órgãos (Bloch et al., 2009; Kim et al., 2015; Pavlatou et al., 2016).

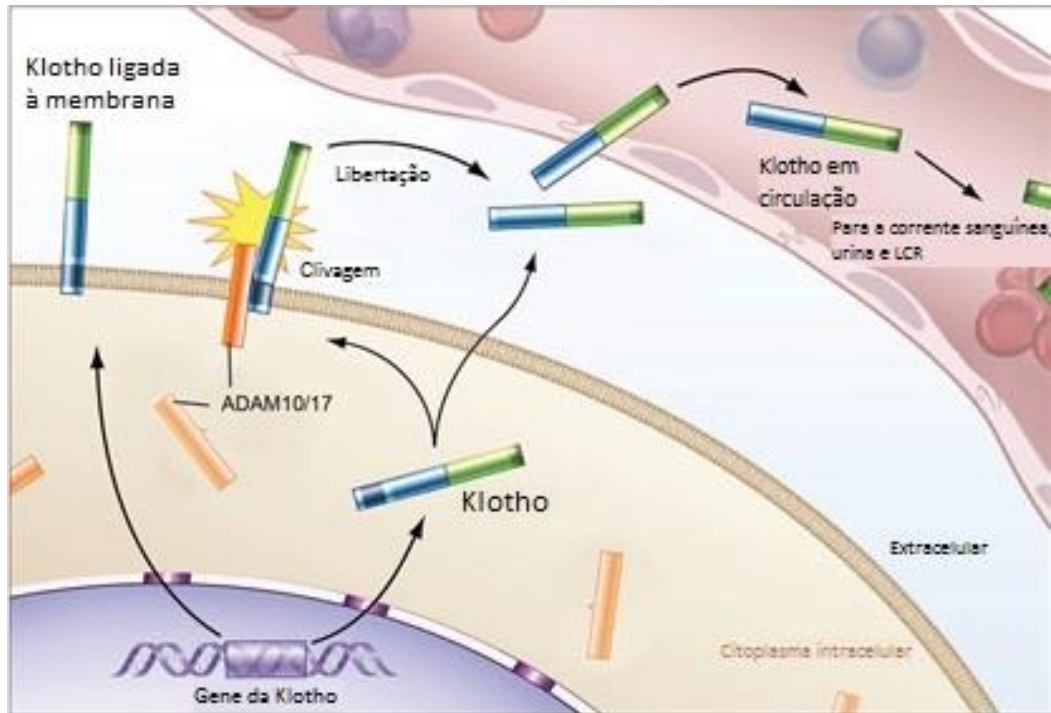


Figura 4 - Esquema das duas isoformas da Klotho. A proteína KL transmembranar é clivada por α -secretases, ADAM10 e ADAM 17, assim como pela β -secretase BACE-1. Por sua vez, esta clivagem resulta num domínio (KL solúvel) que é libertado para a circulação sistémica, líquido cefalorraquidiano (LCR) e urina, podendo ter efeitos generalizados. Adaptado de Pavlatou et al. 2016.

Subsequentemente, também foi descoberto que o gene da KL codifica duas outras proteínas, a β -Klotho e a γ -Klotho, que partilham homologia com a KL, todas elas com um único segmento transmembranar (Kim et al., 2015).

Atualmente, sabe-se que a KL é expressa em diversos tecidos e tipos de células em murganhos, ratos e humanos, sendo predominantemente expressa nos rins e no cérebro (Kuro-o et al., 1997). Para além disso, uma menor expressão é detetada na hipófise, glândula da paratiróide, pâncreas, ovário, testículo, placenta, músculo esquelético, bexiga, cólon e células epiteliais da mama (Kuro-o, 2009). Recentemente, esta proteína foi também encontrada como sendo localmente expressa na área adventícia da aorta (Ritter et al., 2015). No cérebro em particular, em 2013, um estudo da co-localização do RNAm da KL em encéfalos de rato, demonstrou que no plexo coróide é onde existe uma maior expressão; contudo, o RNAm da KL foi também detetado noutras regiões do encéfalo, tais como o mesencéfalo (com níveis mais elevados na SN) e o estriado (Clinton et al., 2013) (Figura 5). Para além disso, e ao nível celular, é nos neurónios, especialmente nos do hipocampo e da hipófise, e nas células de Purkinje do cerebelo que se verifica uma maior expressão da proteína KL (Kuro-o et al., 1997; Shiozaki et al., 2008; German et al., 2012).

Klotho: um novo alvo terapêutico no tratamento da doença de Parkinson?

| Daniela Alexandre

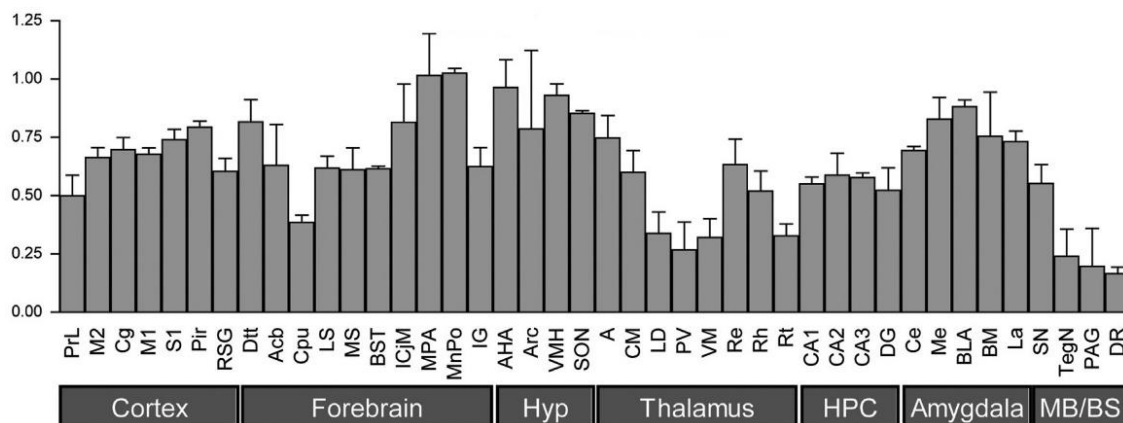


Figura 5 - A distribuição do RNAm da Klotho por hibridação *in situ* no encéfalo de rato adulto. O sinal foi quantificado em várias regiões do encéfalo de ratos adultos (n=3 ou 4). O RNAm da Kl foi amplamente expresso em todo o encéfalo, incluindo várias áreas corticais, estruturas do cérebro anterior, núcleos do hipotálamo (Hyp) e tálamo, hipocampo (HPC) e amígdala e mesencéfalo/tronco cerebral (MB/BS). (Clinton et al., 2013)

Segundo a análise de diversos tecidos, o principal transcrito do gene desta proteína é a KL-s (Matsumura et al., 1998). Recentemente, um estudo mostrou, pela primeira vez, que o domínio solúvel libertado pela clivagem gera uma proteína estável e que, em contraste com a KL-m, é dez vezes mais expressa no cérebro do que no rim, sugerindo que as duas isoformas podem ter funções distintas. Além disso, também observaram uma forte correlação entre os níveis de expressão das isoformas e o estado de saúde dos animais em estudo (Masso et al., 2015).

Assim, apesar de o gene da KL ser apenas expresso em alguns tecidos, é visível que o déficit desta proteína leva a fenótipos de envelhecimento em quase todos os tecidos e órgãos, confirmando que esta funciona como uma hormona e atua sobre os tecidos que não a expressam. No entanto, a maior fonte de KL em circulação ainda não é conhecida, assim como também não estão completamente compreendidos os mecanismos moleculares e as suas funções biológicas exatas.

1.2.2. Funções da Klotho

As três formas possíveis desta proteína podem desempenhar funções distintas. Por um lado, a KL-m forma complexos com diversos recetores do fator de crescimento de fibroblastos (FGFRs, do inglês “Fibroblast Growth Factor Receptors”) em seres humanos, nomeadamente FGFR1c, FGFR3c e FGFR4, aumentando assim seletivamente a afinidade para o fator de crescimento de fibroblastos (FGF, do inglês “Fibroblast Growth Factor)-23 (FGF23), uma hormona que inibe a reabsorção de fosfato e a biossíntese de vitamina D no rim, regulando negativamente a homeostase do cálcio (Urakawa et al., 2006; Wang and Sun, 2009). Assim, o déficit em KL leva ao aumento da produção de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, um metabolito ativo da vitamina D que desempenha um papel importante no metabolismo do cálcio (Kuro-o et al., 1997) e aumento do stress

Klotho: um novo alvo terapêutico no tratamento da doença de Parkinson?

| Daniela Alexandre

oxidativo (Kurosu et al., 2005). A superprodução de $1,25(OH)_2D_3$ pode ser o principal responsável pelos fenótipos de envelhecimento como hiperfosfatemia e hipercalcemia, semelhantes em murganhos deficientes em KL (Kuro-o et al., 1997). Deste modo, sem a KL, a função da hormona FGF23 fica literalmente anulada.

Por outro lado, a KL-s funciona como uma hormona, independente de FGFRs, com diferentes atividades em várias células alvo. Primeiramente, esta isoforma regula negativamente a via de sinalização do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1, do inglês “Insulin Growth Factor-1”)/insulina (Kurosu et al., 2005). Um estudo revelou que a inibição moderada da via de sinalização IGF-1/insulina é um dos mecanismos mais conservados evolutivamente para suprimir o envelhecimento e estender o tempo de vida (Tatar et al., 2003). Sabe-se que a KL pode ligar-se com elevada afinidade a recetores expressos à superfície das células, ainda não identificados, e consequentemente ativar a via de sinalização IGF-1/insulina. Apesar do mecanismo exato ainda não ter sido determinado, pensa-se que poderá envolver a resistência aos níveis de stress oxidativo em mamíferos, através da redução de ERO (Yamamoto et al., 2005). Por outro lado, a KL-s tem ainda um papel na homeostase de iões, através da regulação de canais e transportadores iónicos, nomeadamente o TRPV5, ressaltando mais uma vez com um papel antioxidante. O TRPV5 participa na manutenção da homeostase do cálcio através da sua reabsorção do espaço intracelular e, particularmente, a atividade β -glucuronidase da KL desempenha um papel importante na ativação deste canal de iões (Chang et al., 2005). Além disso, esta proteína tem ainda a capacidade de regular a produção de NO. Estudos demonstraram que os níveis de metabolitos do NO na urina, tais como NO_2^- e NO_3^- , eram significativamente reduzidos em murganhos deficientes em KL, contudo o mecanismo da síntese de NO mediado pela KL é ainda em parte desconhecido (Nagai et al., 2000).

Quanto à KL-i, foi demonstrado que esta consegue em alguns tecidos, como os rins e o plexo coróide, interagir com a bomba Na^+K^+ ATPase em organelos intracelulares, e não na membrana plasmática, e estimular a sua expressão e atividade, facilitando assim o transporte de Ca^{2+} (Imura et al., 2007). Está também descrito que esta isoforma consegue interagir com o gene indutível do ácido retinóico I (RIG-I) e inibir a expressão das citocinas inflamatórias como, a IL-6 e IL-8. Para além destas, também a expressão de outras citocinas são inibidas pela KL, como por exemplo a TNF- β e IFN- γ (Kim et al., 2015; Thurston et al. 2010). Estes dados, sugerem que a Klotho funciona como um fator intracelular anti-inflamatório e anti-envelhecimento.

Por último, estudos recentes revelaram que a KL pode influenciar outras vias de sinalização, como (1) a via de sinalização p21/p53, regulando uma série de genes envolvidos no ciclo celular, (2) a via do monofosfato de adenosina cíclico (cAMP) e (3) a via da proteína cinase C (PKC) e Wnt (Wang and Sun, 2009).

A função biológica da proteína KL e o mecanismo pelo qual a sua ausência contribui para as doenças neurodegenerativas são ainda desconhecidos. No entanto, de entre todas as funções

referidas anteriormente, é importante destacar que as propriedades anti envelhecimento atribuídas à KL estão muito associadas com o aumento da resistência ao stress oxidativo e ao seu papel-anti-inflamatório.

1.2.3. Evidências da ação da Klotho na neuroproteção

É importante realçar que a KL neuronal pode desempenhar um papel importante nos fenótipos de envelhecimento e proteger contra o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas relacionadas com a idade. Contudo, contrariamente ao rim, onde a função da proteína KL já foi mais aprofundada, atualmente não existe um consenso sobre o seu papel no cérebro, principalmente na suscetibilidade do sistema dopaminérgico na DP. A maioria das evidências que correlacionam a KL com o SNC, advêm de estudos realizados em animais “knockout”, deficientes ou com sobre-expressão de KL.

Aquando da realização de ensaios com murganhos “knockout” para a KL, foi evidente a presença de degeneração neuronal em algumas regiões do SNC, essencialmente no hipocampo, mas também no córtex, e menos células de Purkinje no cerebelo (Kuro-o et al., 1997; Kosakai et al., 2011). Níveis reduzidos de proteínas anti-apoptóticas, filamentos gliais, bem como de GFAP em astrócitos foram também algumas das observações, que curiosamente são semelhantes em animais e humanos idosos (Gotow, 2008). Para além disso, outros estudos dos cérebros nestes murganhos knockout, demonstraram ainda que adicionalmente à neurodegeneração, ocorre uma redução na expressão de proteínas sinápticas, perturbações no transporte axonal (Shun-Ai Li, 2004; Shiozaki et al., 2008) e aumento dos marcadores de apoptose e stress oxidativo (Nagai et al, 2003).

Mais recentemente, tem sido demonstrado que o TNF regula negativamente a expressão da KL através do NF- κ B e curiosamente, estudos revelaram que, à semelhança de outras doenças inflamatórias, esta regulação se mantém em doentes com inflamações crónicas do hipocampo (Teocchi et al., 2013). A análise do papel antioxidante da KL, quando adicionado a culturas de neurónios do hipocampo, revelou que a KL aumenta significativamente a expressão do sistema tiorredoxina/ peroxirredoxina (Trx/Prx) através da indução de peroxirredoxinas (Prx-2 e Prx-3) e da tiorredoxina redutase 1 (Trxrd-1), enzimas antioxidantes que em conjunto reduzem as ERO, e leva à proteção dos neurónios do hipocampo da morte induzida por glutamato. Assim sendo, a Prx-2 poderá ser um modelador chave do papel antioxidante neuroprotetor da KL (Zeldich, et al. 2014).

Outros estudos comportamentais realizados em murganhos “knockout”, apresentaram défices de memória, provavelmente devido a um aumento do stress oxidativo no cérebro e alterações na função colinérgica (Nagai et al., 2003). A partir de modelos da doença de Alzheimer, confirmou-se que a expressão da KL nas áreas afetadas diminuía bastante comparativamente aos animais saudáveis da mesma ninhada; para além disso, a prática de exercício contínuo

Klotho: um novo alvo terapêutico no tratamento da doença de Parkinson?

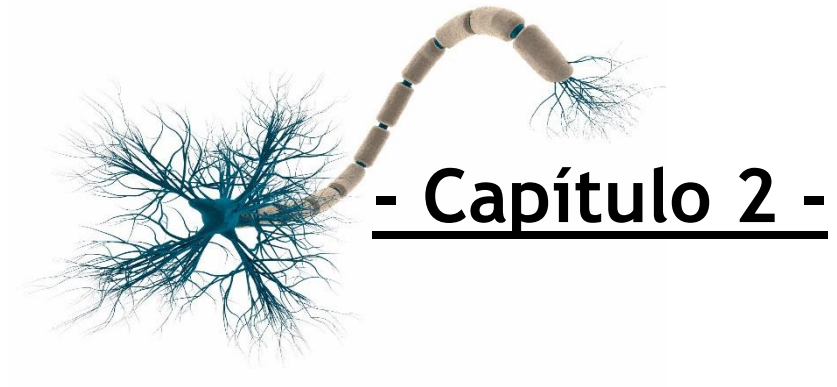
| Daniela Alexandre

moderado na idade adulta impedia a diminuição de ambas as formas da KL, KL-m e KL-s (Massó et al., 2015).

Está também descrito que, especificamente na substância branca de cérebros de macacos, ratos e murganhos, é possível observar uma diminuição da KL com o envelhecimento, provavelmente devido à perda de mielina que acontece com a idade (Chen et al., 2013; Duce et al., 2006). Além disso, demonstrou-se que em culturas de células, a KL aumenta a maturação e diferenciação de oligodendrócitos e a mielinização do SNC. Bioquimicamente, os cérebros de ratinhos “knockout” da KL expressam níveis mais baixos de RNAm e proteínas de mielina (King et al., 2012; Shiozaki et al., 2008). Curiosamente, quando em estudos decidiram limitar a expressão da KL ao cérebro e aos testículos, ao contrário dos “knockout”, todos os fenótipos sistêmicos associados aos “knockout” foram melhorados (Kuro-o, 1997), sugerindo assim que a expressão de KL no cérebro é importante para o envelhecimento do SNC.

Um estudo publicado em 2011 mostrou que ratinhos mutantes para o gene da KL apresentavam, especificamente, uma diminuição no número de ND na SN e nos níveis de DA no estriado, que possivelmente está relacionada com a regulação da vitamina D mediada pela KL, onde uma exposição aumentada à vitamina D seria a causa do fenótipo observado. Para além disso, descobriram que os níveis de DA no estriado diminuía significativamente com o envelhecimento nestes animais (Kosakai et al., 2011). Muito recentemente, os resultados de ensaios com murganhos transgênicos, mostraram que a sobre-expressão desta proteína protege significativamente os ND contra os danos oxidativos, induzidos pelo MPTP, em parte, através da modulação da ativação p38 MAPK, uma via importante na regulação do stress oxidativo (Brobey et al. 2015).

Posto isto, e tendo em conta todas as observações, verifica-se que a ausência da KL tem um grande impacto sobre a morfologia e funcionamento de algumas células, como os neurónios e os oligodendrócitos, e conseqüentemente na saúde.



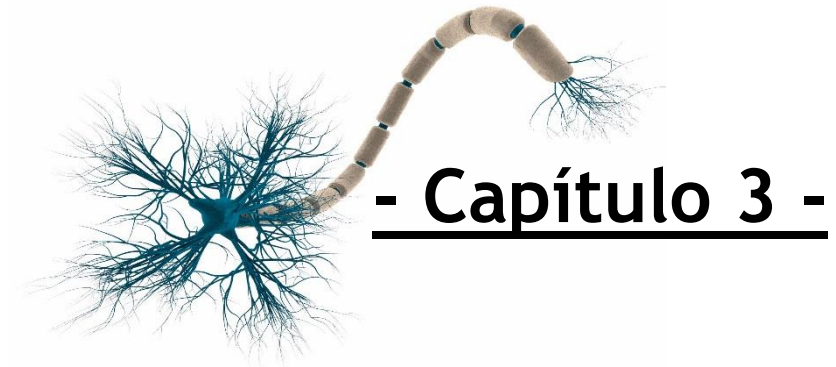
Objetivos

CAPÍTULO 2: OBJETIVOS

O papel neuroprotetor da KL, assim como propriedades anti-inflamatórias têm vindo a ser descritas recentemente em alguns artigos. Evidências anteriores mostraram que ratinhos com défices em KL apresentam maior degeneração dopaminérgica e, por outro lado, a sua sobre-expressão parece proteger os ND contra danos oxidativos. Estes resultados sugerem que a KL exerce um papel importante na proteção dopaminérgica. Para além disso, a capacidade de regular a expressão de algumas citocinas inflamatórias e a libertação de NO poderá também contribuir para o seu papel neuroprotetor.

Posto isto, o principal objetivo deste trabalho é avaliar se a KL, administrada exogenamente, é neuroprotetora e anti-inflamatória em culturas primárias do mesencéfalo ventral (MV), no contexto da DP, podendo vir a ser considerada um novo alvo terapêutico na prevenção e tratamento desta doença. Para isso, o presente trabalho encontra-se orientado segundo dois objetivos específicos:

- 1) Avaliar o efeito da KL recombinante, administrada exogenamente, na viabilidade dos ND expostos à toxina MPP⁺ e determinar a importância dos astrócitos nos efeitos observados;
- 2) Determinar se a administração da KL é capaz de prevenir a reatividade da microglia do MV, induzida por LPS, através da modulação da libertação de NO.



Material e Métodos

- 3.1 Preparação das culturas celulares
- 3.2 Estimulação Celular
- 3.3 Imunocitoquímica
- 3.4 Ensaio MTT
- 3.5 Quantificação de NO
- 3.6 Análise de Dados e Estatística

CAPÍTULO 3: MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Preparação das Culturas Celulares

Todos os animais utilizados na preparação das culturas celulares foram tratados em conformidade com os protocolos aprovados de acordo com os requisitos éticos de pesquisa animal e com a convenção europeia para a proteção dos animais vertebrados utilizados para fins experimentais ou outros propósitos científicos (Diretiva 2010/63/EU).

3.1.1. Cultura da Linha Celular N27

A linha celular 1RB3AN27 (N27) corresponde a clones imortalizados que derivam de ND do mesencéfalo fetal de rato (12 dias de gestação). Esta linha celular é frequentemente usada como modelo de ND, uma vez que as suas células são maioritariamente TH positivas, expressam o DAT a maioria das enzimas para a síntese e metabolismo da DA (Clarkson et al., 1998). Alíquotas armazenadas a -80°C foram descongeladas e colocadas a proliferar em fracos de cultura de 75 cm^2 (Orange) em meio de cultura RPMI-1640 (Sigma) suplementado com 2 g/L de bicarbonato de sódio (NaHCO_3), 10% de FBS (Biochrom AG), 1% de antibiótico (penicilina e estreptomicina; Sigma) e 1% de L-Glutamina (Sigma). A cultura foi mantida a 37°C numa atmosfera com 5% de CO_2 e 95% de ar atmosférico, com substituição do meio de cultura todos os dias. Quando atingiu uma confluência de aproximadamente 70%, efetuou-se a passagem das células por tripsinização. Para tal, incubaram-se as células com uma solução de tripsina (0,5 g/L Tripsina, 0,2 g/L EDTA, dissolvidos em PBS), durante aproximadamente 3 minutos a 37°C . Posteriormente, terminou-se a tripsinização com a adição do meio RPMI-1640 suplementado, previamente aquecido. As células foram transferidas para um tubo e centrifugadas a 120xg durante 5 minutos (3K18C Bioblock Scientific; Sigma Laboratory Centrifuges) e depois do sobrenadante removido, ressuspensas em RPMI-1640 suplementado. Procedeu-se à contagem das células viáveis através do método de exclusão pelo azul de tripano, numa câmara de Neubauer, e efetuou-se o plaqueamento em placas de cultura de 96 poços, a uma densidade de $0,715 \times 10^4$ células/ cm^2 . A cultura celular foi mantida a 37°C , numa atmosfera com 5% de CO_2 e 95% de ar atmosférico e utilizada 24 horas após a sua preparação.

3.1.2. Culturas primárias enriquecidas em neurónios e co-culturas de neurónios - glia do mesencéfalo ventral

Para cada preparação foram usadas fêmeas Wistar com 15 ou 16 dias de gestação. Após anestesia com isoflurano foi aberta a cavidade abdominal e os embriões foram removidos, sendo posteriormente a fêmea sacrificada por deslocamento cervical. Os sacos uterinos foram

Klotho: um novo alvo terapêutico no tratamento da doença de Parkinson?

| Daniela Alexandre

colocados em tampão fosfato salino estéril e frio (PBS, do inglês “Phosphate Buffered Saline”): 140 mM NaCl, 81 mM Na₂HPO₄, 27 mM KCl, 15 mM KH₂PO₄, pH 7,4).

Dentro da câmara de fluxo laminar, em ambiente estéril, as membranas amnióticas foram removidas e a região correspondente ao MV foi dissecada, como ilustrado na figura 6. Ao tecido resultante foram retiradas cuidadosamente as meninges, sendo depois colocado num tubo com 5 mL de PBS frio. Posteriormente, procedeu-se à dissociação mecânica através de passagens sequenciais e repetitivas por uma micropipeta (P1000) e por *tectips*, pontas estéreis com orifícios de tamanho 20G, 23G e 25G, e seguidamente realizada uma centrifugação de 3 minutos a 269xg (3K18C Bioblock Scientific; Sigma Laboratory Centrifuges). O sobrenadante foi rejeitado e o sedimento resultante ressuspensão em Meio Neurobasal (MNB; Gibco) suplementado com 2% B27 (Invitrogen), 0,05 µg/mL de L-Glutamina (Sigma), 120 µg/mL de gentamicina (Sigma) e 25 µM ácido L-Glutâmico (Sigma). Para a contagem celular as células foram diluídas (1:1) em azul de tripano (0,4% em NaCl 0,81% e K₂HPO₄ 0,06%) e as células viáveis foram contadas usando uma câmara de Neubauer. Por fim, cultivaram-se as células em placas de cultura de 24 poços, com lamelas de 13 mm de diâmetro, previamente revestidas com poli-D-lisina 0,1 mg/mL (Sigma), a uma densidade de 0,207 x 10⁶ células/cm². Para a obtenção de co-culturas de neurónios-glia, foi adicionado ao meio de cultura 10% de Soro Fetal Bovino (FBS, do inglês “Foetal Bovine Serum”) previamente inativado pelo calor (Biochrom AG). As culturas foram mantidas a 37°C, numa atmosfera com 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico. As experiências nestas culturas foram realizadas cinco dias após a sua preparação.

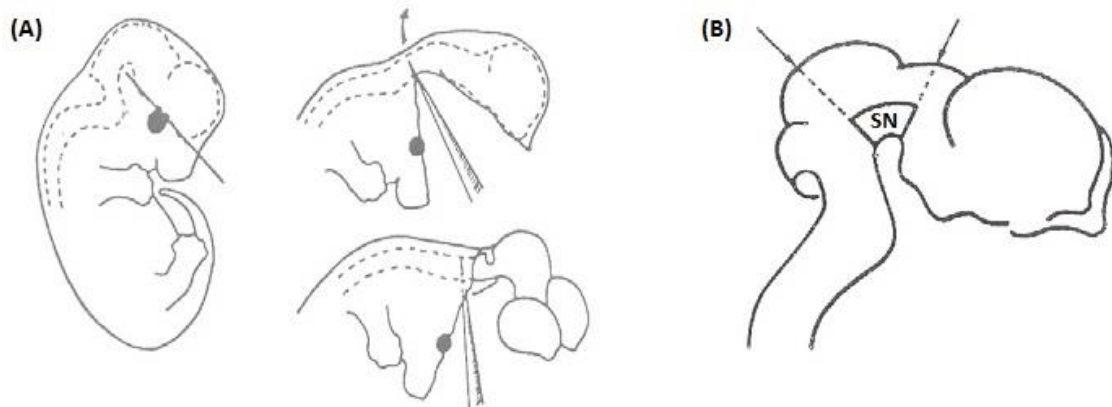


Figura 6 - Dissecção do mesencéfalo ventral em embriões de 15-16 dias de gestação. Representação das incisões para a exposição de um encéfalo de um embrião de rato (A). Dissecção da substância nigra (SN) a partir do mesencéfalo ventral (B). (Dunnet and Björklund, 1999).

3.1.3. Culturas primárias de microglia do mesencéfalo ventral

Ratos Wistar com 2 a 4 dias de idade foram colocados em gelo até se encontrarem num estado de hipotermia. Dentro da câmara de fluxo, em ambiente estéril foram decapitados e os encéfalos removidos e colocados numa caixa de Petri contendo PBS frio e estéril.

Procedeu-se à disseção para obtenção da região correspondente ao MV como é mostrado na Figura 6. Retiraram-se cuidadosamente as meninges e no final o tecido resultante foi colocado num tubo com 5 mL de PBS frio. Posteriormente, foi feita a dissociação do tecido por digestão enzimática em água de cisteína (1,9 mM CaCl_2 , 1,3 mM cisteína), solução de H&B (116 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 26 mM NaHCO_3 , 12 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 mM EDTA, 25 mM glicose, pH 7,3), 0,5% de vermelho fenol e 4 mg/mL de papaína, durante 4 minutos a 37°C. Para parar a digestão enzimática e remover a solução de papaína fizeram-se 3 lavagens com meio de cultura M10C-G constituído por MEM (do inglês “Minimum Essential Medium, Sigma) e suplementado com 2,2 g/L NaHCO_3 , 0,75% glicose, 0,12% de antibiótico (penicilina e estreptomicina; Sigma), 0,02% de insulina (Sigma) e 10% FBS (Biochrom AG). De seguida, foi efetuada uma dissociação mecânica através de passagens sequenciais e repetitivas por uma micropipeta (P1000) e por *techtips*, pontas estéreis com orifícios de tamanho 20G, 23G e 25G, e seguidamente realizada uma centrifugação a 269xg durante 3 minutos (3K18C Bioblock Scientific; Sigma Laboratory Centrifuges). As células foram ressuspensas em meio M10C-G e procedeu-se à contagem das células viáveis através do método de exclusão pelo azul de tripano, numa câmara de Neubauer. Por último, procedeu-se ao plaqueamento a uma densidade de $0,069 \times 10^6$ células/cm² em placas de 24 poços revestidas previamente com poli-D-lisina (Sigma) e mantidas a 37°C numa atmosfera com 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico. Passados 10 a 15 dias em cultura, a microglia foi obtida por remoção dos astrócitos após incubação da cultura mista glial com uma solução de tripsina (0,5 g/L de Tripsina e 0,2 g/L de EDTA dissolvidos em PBS) diluída numa proporção de 1:6 em MEM, durante aproximadamente 15-30 min. Após este período de incubação, a solução de tripsina, em conjunto com a camada de astrócitos em suspensão, foram removidos. A microglia resultante após a tripsinização foi mantida em meio M10C-G a 37°C numa atmosfera com 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico durante 5 dias, até se encontrar num estado de repouso.

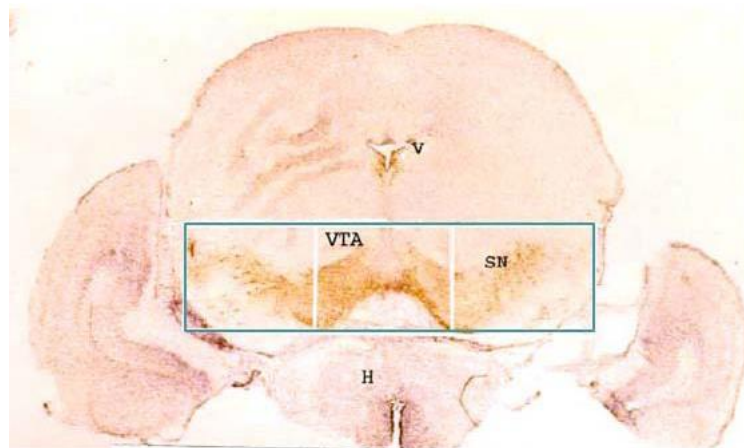


Figura 7 - Secção coronal do encéfalo de rato. As linhas azuis indicam a zona de corte feitas durante a disseção (VTA, do inglês “Ventral Tegmental Area”: Área Tegmental Ventral, V: Aqueduto cerebral, H: hipotálamo) (Staal et al., 2007).

3.2. Estimulação Celular

3.2.1. Avaliação do efeito da Klotho na viabilidade dos neurónios dopaminérgicos

3.2.1.1. Culturas Primárias

Doze horas antes da estimulação celular o meio de cultura foi substituído por MNB sem soro. As culturas primárias de neurónios e mistas foram incubadas com diferentes concentrações de KL (R&D Systems, ref.1819-KL-050) (0,05, 0,1, 0,2, 0,4 e 0,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$), por diferentes períodos de incubação, e ainda expostas a 10 μM MPP⁺ (Sigma), de acordo com o esquema apresentado na figura 8. Nestas experiências, a KL foi administrada antes (1, 4, 8, 12 e 24 h), simultaneamente ou após a adição do MPP⁺ (1, 2, 4 e 8 h). Os estímulos terminaram 24 horas após a adição de MPP⁺, com a remoção do meio experimental e a posterior fixação das células com paraformaldeído (PFA) 4% durante 10 minutos, para avaliação da viabilidade dopaminérgica por imunocitoquímica.

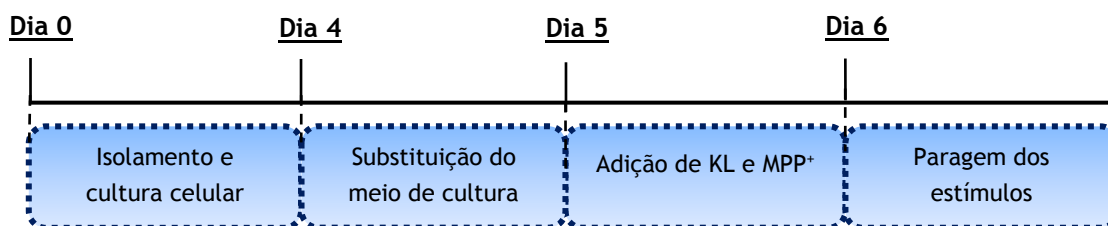


Figura 8 - Representação esquemática do procedimento usado na estimulação das culturas primárias com KL e MPP⁺. Procedimento experimental efetuado em culturas de neurónios e co-cultura de neurónios-glia de modo a avaliar o efeito da KL na sobrevivência dopaminérgica antes, simultaneamente ou após o estímulo oxidativo.

3.2.1.2. Linha Celular N27

Imediatamente antes da estimulação celular o meio de cultura foi substituído por RPMI-1640 suplementado. Primeiramente, de forma a determinar a concentração ideal de MPP⁺ capaz de induzir uma diminuição significativa na viabilidade das células N27, diferentes concentrações de MPP⁺ (100, 250, 500, 750 e 1000 μ M) foram aplicadas (Figura 9).

Para avaliar o possível efeito protetor da KL na lesão induzida pelo MPP⁺, as culturas foram pré-incubadas com diferentes concentrações de KL (0,1, 0,2, 0,4 e 0,8 μ g/mL), durante diferentes períodos de incubação (4 e 8 h), e posteriormente expostas a 500 μ M MPP⁺ durante 36 horas (Figura 9). As células foram então incubadas a 37°C, numa atmosfera humidificada contendo 5% de CO₂ e 95% de ar durante um período adicional de 36 horas. No final da experiência foi removido o meio de cultura e a viabilidade celular foi avaliada através do ensaio do 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio brometo (MTT).

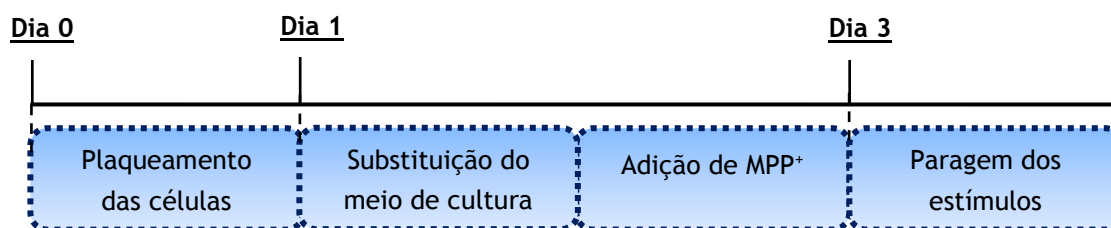


Figura 9 - Representação esquemática do tratamento da linha celular N27 com MPP⁺. Procedimento experimental efetuado para determinar a concentração ideal de MPP⁺ que induz uma diminuição significativa da viabilidade das células N27. As células foram incubadas com diferentes concentrações de MPP⁺ (100, 250, 500, 750 e 1000 μ M) durante 36h.

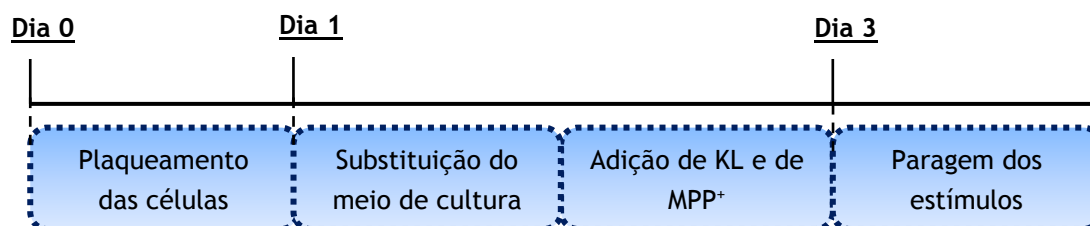


Figura 10 - Representação esquemática do procedimento usado na estimulação das culturas de células N27 com KL e MPP⁺. Procedimento experimental efetuado para avaliar o efeito da KL na sobrevivência dopaminérgica antes do estímulo oxidativo. As células N27 foram pré-tratadas com diferentes concentrações de KL (0,1, 0,2, 0,4 e 0,8 μ g/mL), durante diferentes períodos de incubação (4 e 8 h). Após o período de pré-incubação, as células foram expostas a 500 μ M MPP⁺ por 36h adicionais.

3.2.2. Influência da Klotho na liberação de NO pela Microglia

Doze horas antes da estimulação celular o meio de cultura foi substituído por M10C-G. As culturas primárias de microglia do MV foram pré-incubadas com diferentes concentrações de KL (0,1, 0,2, e 0,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$), por diferentes períodos de incubação (1, 8, 12, e 24 h). O agente pró-inflamatório LPS (Sigma), numa concentração de 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, foi posteriormente adicionado e as células permaneceram em cultura por um período adicional de 24h. Após este tempo, os sobrenadantes foram recolhidos para medição da concentração de NO libertado para o meio. O procedimento experimental está representado na figura 11.

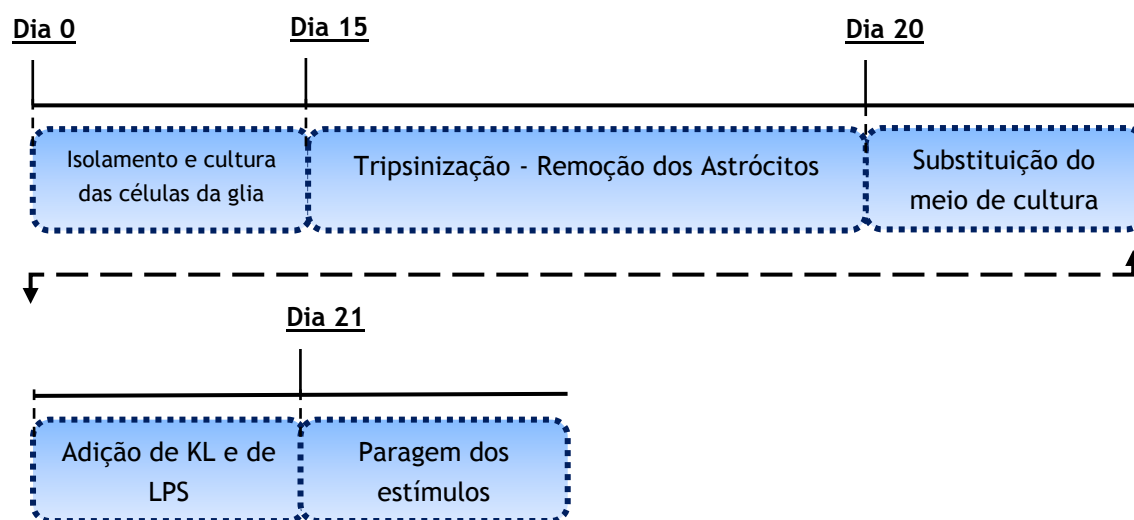


Figura 11 - Representação esquemática do procedimento usado na estimulação das culturas de microglia com KL e LPS. Procedimento experimental efetuado para avaliar o efeito da KL (0,1, 0,2, 0,4 e 0,8 $\mu\text{g}/\text{ml}$) na liberação de NO quando aplicada 1, 8, 12 e 24 horas antes da administração do estímulo inflamatório (LPS, 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

3.3. Imunocitoquímica

A imunocitoquímica iniciou-se pela fixação das células com PFA 4% durante 10 minutos. De seguida, efetuou-se a permeabilização das células com Triton X-100 1% em PBS durante 5 minutos à temperatura ambiente. As ligações inespecíficas foram bloqueadas por incubação das células com 20% de FBS em PBS 0,1% Tween (PBS-T) durante uma hora à temperatura ambiente. Depois do bloqueio, as lamelas foram lavadas com PBS-T e incubadas com o anticorpo primário diluído em PBS-T com 1% FBS, de acordo com a Tabela 1, durante uma hora à temperatura ambiente. Após este passo e para remover o excesso de anticorpo, as lamelas foram lavadas seis vezes com PBS-T durante 15 minutos. O anticorpo secundário correspondente foi também diluído em PBS-T com 1% FBS e as lamelas incubadas durante uma hora à temperatura ambiente. Após esta incubação realizaram-se novamente seis lavagens sequenciais com PBS-T e as células

foram posteriormente incubadas durante 10 minutos com Hoescht 33342 2mM (Invitrogen), dissolvido em PBS-T. Depois desta incubação as lamelas foram lavadas três vezes com PBS-T, seguindo-se as respetivas montagens em lâminas utilizando o meio de montagem para fluorescência DAKO (Glostrup, Denmark). A selagem das mesmas foi posteriormente feita com verniz. Por último, as preparações foram observadas num microscópio de fluorescência Zeiss (Axiobserver Z1, Zeiss).

Tabela 1- Descrição dos anticorpos primários e secundários utilizados nos ensaios de imunocitoquímica.

<u>Proteína</u>	<u>Anticorpo Primário</u>	<u>Diluição</u>	<u>Empresa</u>	<u>Anticorpo Secundário</u>	<u>Diluição</u>	<u>Empresa</u>
TH	Monoclonal Murganho Anti-TH	1:1000	BD Biosciences	Ig de cabra Anti-Mouse conjugado com Alexa 488	1:1000	Invitrogen, Molecular Probes
GFAP	Policlonal Coelho Anti-GFAP	1:2000	DAKO Cytomation	Ig de cabra Anti-coelho conjugado com Alexa 546	1:1000	Invitrogen, Molecular Probes
MAP2	Policlonal Coelho Anti-MAP2	1:500	Santa Cruz			

3.3.1. Contagem celular e Análise quantitativa

Em cada experiência foram realizadas várias preparações diferentes e quantificaram-se 3 lamelas por cada condição experimental. De cada lamela foram analisados 20 campos e excecionalmente 40 em alguns casos, com uma ampliação de 63x. Os resultados são apresentados como o número médio de células TH-positivas em relação ao número total médio de células estimadas pela marcação com Hoescht.

3.4. Ensaio MTT

O ensaio do MTT foi o teste escolhido para analisar a viabilidade na linha celular N27. O MTT é um corante de um sal tetrazólio com uma cor amarelo pálido que pode ser clivado por desidrogenases intracelulares e formar cristais de formazano de cor roxa nas células

metabolicamente ativas. A quantidade de formazano produzido é proporcional ao número de células metabolicamente ativas e, portanto, viáveis. Após a remoção do meio de cultura dos poços, MTT dissolvido numa solução salina equilibrada de Hank (HBSS, do inglês “Hank’s Balanced Salt Solution”) (0,5 mg/mL) foi adicionado a cada poço, sendo as células posteriormente incubadas no escuro durante uma hora a 37°C. Após este período de incubação, o meio foi removido e, de forma a dissolver todos cristais de formazano formados, foram adicionados 200 µL de 0,04 M de HCl em isopropanol e a placa colocada a agitar num agitador orbital durante 10 a 15 minutos. A determinação colorimétrica da redução do MTT foi medida a 570 nm com um filtro de referência de 620 nm, utilizando um leitor de microplacas (Anthos 2020).

3.5. Quantificação de Óxido Nítrico

Após 24 h de estimulação com LPS, os meios de cultura foram recolhidos e a produção de NO foi determinada por quantificação do nitrito (NO_2^-) total acumulado. O nitrito é um dos produtos primários da oxidação de NO que é libertado para o meio e, ao reagir com a sulfanilamida e o N-1-naftiletilenodiamina (NED) origina, em condições ácidas, um composto colorido. Este ensaio baseia-se numa reação de diazotização descrita originalmente por Griess em 1879 (Griess P., 1879). Para a realização deste ensaio, 50 µL de cada amostra foram recolhidos e transferidos para uma placa de 96 poços e de seguida adicionou-se a mesma quantidade da solução de sulfanilamida (1% de sulfanilamida e 5% de ácido fosfórico diluídos em água). A mistura foi incubada no escuro durante 10 min à temperatura ambiente antes de se adicionarem 50 µL da solução NED (0,1% N-1-naftiletilenodiamina diluído em água). Após uma nova incubação de 10 minutos observou-se a mudança de cor, que foi quantificada por leitura da absorvância a 550 nm. Para garantir a a quantificação de NO_2^- nas amostras, a sua concentração foi determinada a partir de uma curva padrão de nitrito de sódio (NaNO_2) utilizando como matriz o meio M10C-G (Figura 12).

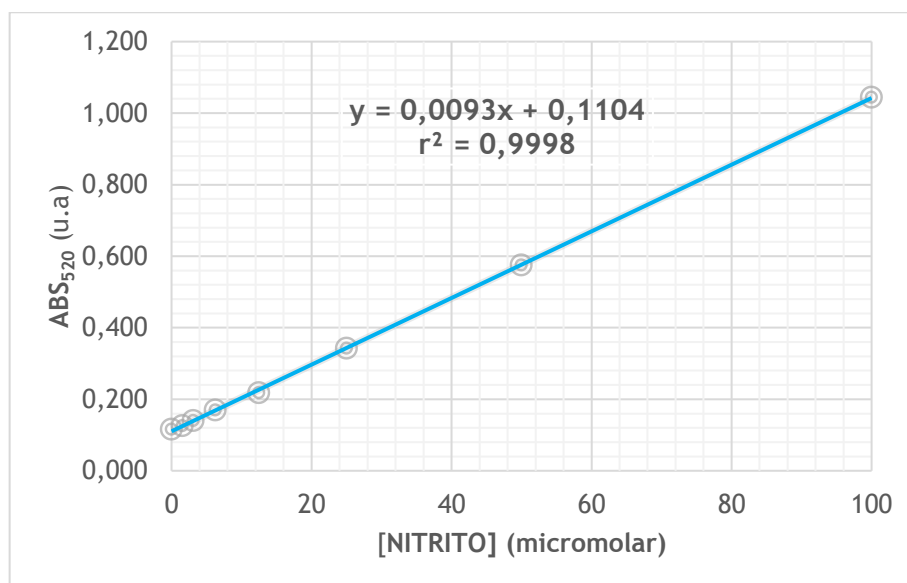
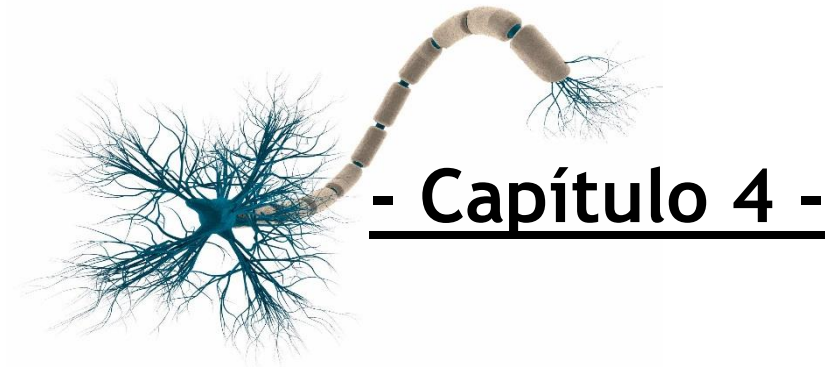


Figura 12 - Curva padrão representativa mostrando a variação da absorvância (ABS) a 520nm com a concentração de nitrito presente no meio.

3.6. Análise de Dados e Estatística

Os dados nas figuras encontram-se expressos em percentagem do controlo e representam a média \pm S.E.M do número de experiências indicado na legenda das figuras. A análise estatística foi realizada utilizando o teste one-way ANOVA seguido pelo Bonferroni Post Test, à exceção de uma experiência na qual foi usado o Dunnett Post Test (devidamente indicado na legenda da figura). Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc).



Resultados

- 4.1 Avaliação do efeito da Klotho na viabilidade dopaminérgica.
- 4.2 Avaliação do efeito da Klotho na modulação da reatividade microglial.

CAPÍTULO 4: RESULTADOS

4.1. Avaliação do efeito da Klotho na viabilidade dopaminérgica

Como mencionado anteriormente, a primeira parte deste trabalho teve como objetivo avaliar se a proteína KL, quando adicionada exogenamente a culturas celulares, exerce um efeito protetor nos ND quando expostos a uma toxina dopaminérgica. Estudos anteriores publicados, mostraram que a degeneração dos ND do mesencéfalo de ratos transgênicos, com déficit desta proteína, estava possivelmente relacionada com mecanismos mediados pela KL. Contudo não existem ainda resultados sobre o seu efeito direto na viabilidade dos ND, quando sujeitos a um estímulo tóxico.

Assim, a fim de averiguar se esta proteína tem a capacidade neuroprotetora no contexto da DP, começou-se por analisar o seu efeito numa linha celular dopaminérgica e, posteriormente, em culturas primárias do MV, enriquecidas em neurónios e co-culturas neurónios-glia, expostas ao MPP⁺.

4.1.1. Será que o tratamento com Klotho protege as células N27 da toxicidade induzida pela toxina MPP⁺?

A linha celular N27 foi usada, numa primeira abordagem, para avaliar o efeito da KL na toxicidade induzida pelo MPP⁺. Esta toxina foi escolhida devido à sua capacidade de causar a morte neuronal seletiva das células dopaminérgicas. Este processo ocorre através da sua captação pelos transportadores de dopamina que o deslocam para o interior dos ND. Nestes neurónios bloqueia a atividade do complexo I mitocondrial, levando à produção de ERO com consequente morte apoptótica das células (Dauer and Przedborski, 2003).

4.1.1.1. Avaliação da toxicidade induzida pelo MPP⁺

A fim de determinar a concentração de MPP⁺ necessário para induzir lesão nas células N27, estas células foram estimuladas com diferentes concentrações de MPP⁺ (100, 250, 500, 750 e 1000 μ M) durante 36h e foram realizados ensaios de MTT como indicador direto de citotoxicidade. Nos resultados observados foi evidente uma diminuição no número de células viáveis na maioria das culturas que foram tratadas com MPP⁺, diminuição essa tanto maior quanto a concentração deste agente. A exposição a 250, 500, 750 e 1000 μ M de MPP⁺ induziu uma diminuição significativa na viabilidade celular, quando comparado com a situação controlo (ausência de MPP⁺). Apenas a concentração de 100 μ M de MPP⁺ não induziu uma alteração significativa na viabilidade destas células (Figura 13).

A concentração de 500 μM de MPP^+ , capaz de induzir uma morte celular de 37,5%, foi a escolhida para utilização nas experiências seguintes.

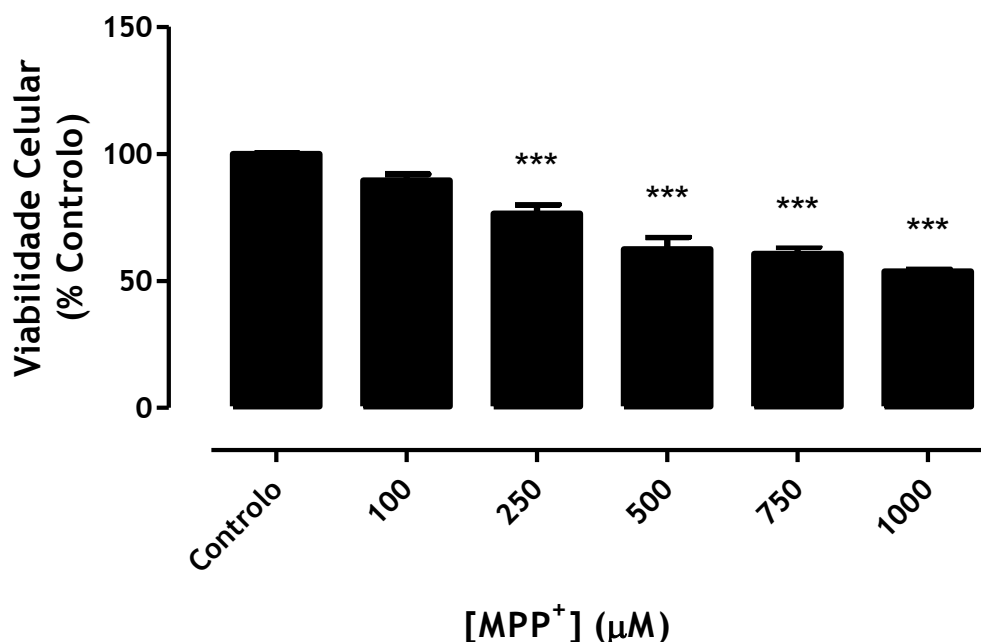


Figura 13 - Avaliação do efeito de diferentes concentrações de MPP^+ na viabilidade das células N27. A avaliação da viabilidade celular foi feita através do ensaio de MTT na linha celular N27 exposta a diferentes concentrações de MPP^+ (100, 250, 500, 750 e 1000 μM) durante 36 h. Os resultados encontram-se expressos em percentagem de controlo (sem MPP^+) e representam a média \pm S.E.M de três experiências independentes com cinco replicados por condição. A análise estatística foi realizada utilizando o teste one-way ANOVA seguido do Dunnett post Test (***) $P < 0,001$ quando comparado com o controlo).

4.1.1.2. Avaliação do efeito da Klotho na toxicidade induzida pelo MPP^+ na linha celular N27

Utilizando a mesma linha celular dopaminérgica avaliou-se se o pré-tratamento destas culturas com diferentes concentrações de KL (0,1, 0,2, 0,4 e 0,8 $\mu\text{g/ml}$) seria capaz de proteger estas células da lesão induzida pelo MPP^+ (500 μM).

A exposição da cultura ao MPP^+ provocou uma redução de 42,6 % na viabilidade celular. Para além disso, a pré-incubação da cultura com KL durante 4h, em todas as concentrações testadas, não foi capaz de proteger os ND da lesão induzida pelo MPP^+ . A exposição das células com KL (na ausência de lesão) não afetou a viabilidade celular relativamente ao controlo (Figura 14 A).

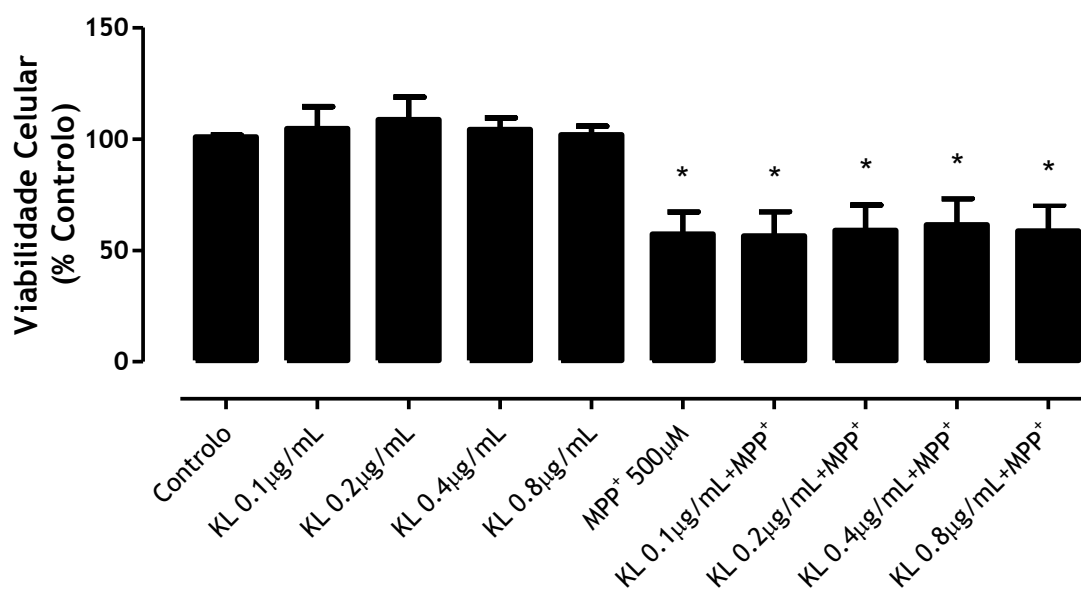
Klotho: um novo alvo terapêutico no tratamento da doença de Parkinson?

| Daniela Alexandre

Este tempo de pré-incubação foi o selecionado como ponto de partida uma vez que existem dados na literatura que mostram uma ação neuroprotetora da KL em culturas primárias de neurónios do hipocampo, adicionada 4 h antes do estímulo tóxico e numa concentração de 0,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Zeldich et al., 2014).

Com o objetivo de averiguar se a falta de efeito neuroprotetor de KL poderia dever-se a um insuficiente tempo de pré-incubação, procedeu-se a experiências semelhantes, mas com tempos de incubação com KL (0,2 e 0,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) superiores (8, 12 e 24 h). Como ilustra a figura 14 B, os resultados mostram que mais uma vez a exposição ao MPP^+ provocou uma redução significativa na viabilidade celular (35,9 %) e as células pré-incubadas com 0,2 e 0,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de KL nos diferentes períodos de incubação testados, não parecem ser capazes de resistir à lesão induzida pelo MPP^+ , tendo-se observado percentagens de células TH^+ semelhantes às observadas na presença de MPP^+ apenas. No entanto, estes dados devem ser analisados com alguma cautela uma vez que apenas foi realizada uma experiência.

(A)



(B)

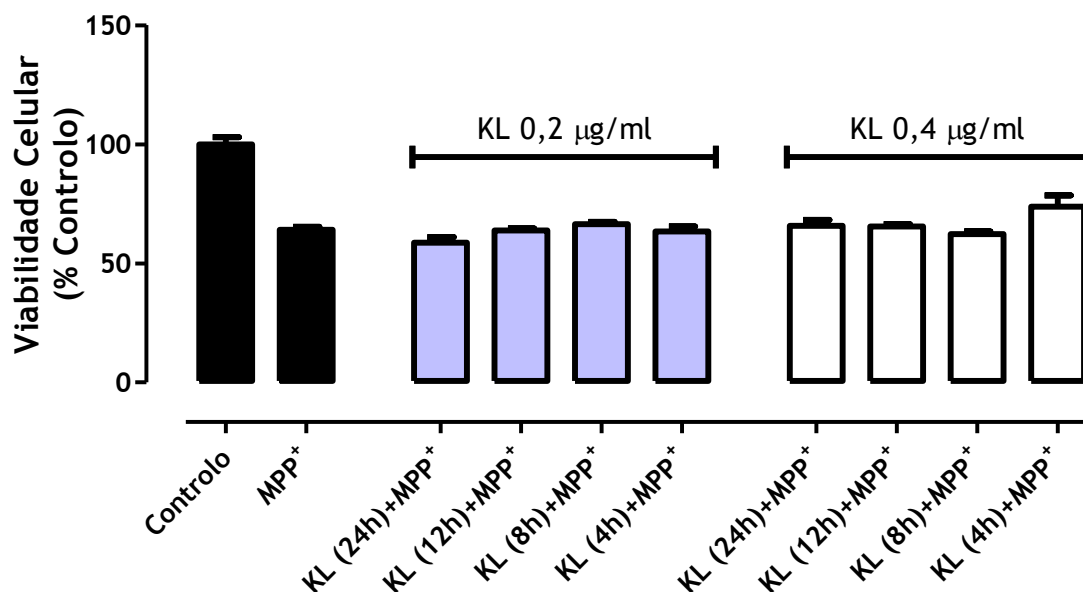


Figura 14 - O pré-tratamento com a proteína Klotho não protege as células N27 da morte celular induzida por exposição ao MPP⁺. As células N27 foram pré-tratadas durante 4 h com diferentes concentrações de Klotho (KL) (A, n=3) ou pré-tratadas com 0,2 ou 0,4 µg/mL de KL durante diferentes períodos de pré-incubação (B, n=1). Após o período de pré-incubação, as células foram expostas a 500 µM MPP⁺ por 36 h adicionais. Os resultados foram expressos em percentagem de controlo (sem KL, sem MPP⁺) e representam a média ± S.E.M de três experiências (A) ou uma experiência (B) independentes com cinco replicados por condição. A análise estatística foi realizada utilizando o teste one-way ANOVA seguido do Bonferroni Post Test (* P <0,05 quando comparado com o controlo).

4.1.2. Avaliação do efeito da Klotho na toxicidade induzida pelo MPP⁺ em culturas primárias mistas do mesencéfalo ventral

Como foi já referido, existem algumas evidências que apontam para um possível envolvimento da KL na viabilidade dopaminérgica (Kosakaia et al., 2011) e, uma vez que não se observaram efeitos protetores da KL nas células N27, optou-se, então, por utilizar co-culturas de neurónios-glia preparadas a partir do MV de embriões de rato. Estas culturas apresentam uma maior semelhança com os sistemas vivos, já que, para além dos neurónios, as células gliais também estão presentes e não se sabe de que modo a presença destas células pode influenciar os mecanismos protetores mediados pela KL. Com o objetivo de avaliação a capacidade neuroprotetora da KL, numa situação de lesão dopaminérgica, delinear-se 3 conjuntos de experiências com vista a determinar: 1) qual(quais) a(s) concentração(ões) de KL capaz(es) de exercer um efeito protetor nos ND quando expostos a um agente tóxico; 2) qual o tempo de pré-incubação mais eficaz; 3) qual a contribuição dos astrócitos na ação neuroprotetora da KL. Os resultados obtidos serão descritos a seguir.

4.1.2.1. Determinação da concentração de Klotho capaz de proteger os neurónios dopaminérgicos da toxicidade induzida pelo MPP⁺

Com o objetivo de avaliar o efeito da KL na toxicidade dopaminérgica induzida pelo MPP⁺ e determinar qual a concentração mais eficaz para proteger os ND, as culturas primárias mistas foram pré-tratadas com diferentes concentrações de KL (0,05, 0,1, 0,2, 0,4, e 0,8 µg/mL) durante 4h e, posteriormente, expostas a 10 µM de MPP⁺ durante um período adicional de 24h. No final dos ensaios, realizou-se uma imunocitoquímica para avaliar a viabilidade dopaminérgica utilizando o marcador nuclear Hoescht 33342 e o anticorpo primário anti-TH, marcador de ND (Figura 15), procedendo-se à contagem do número de células imuno-positivas para TH (TH⁺) e relacionando com o número total de células.

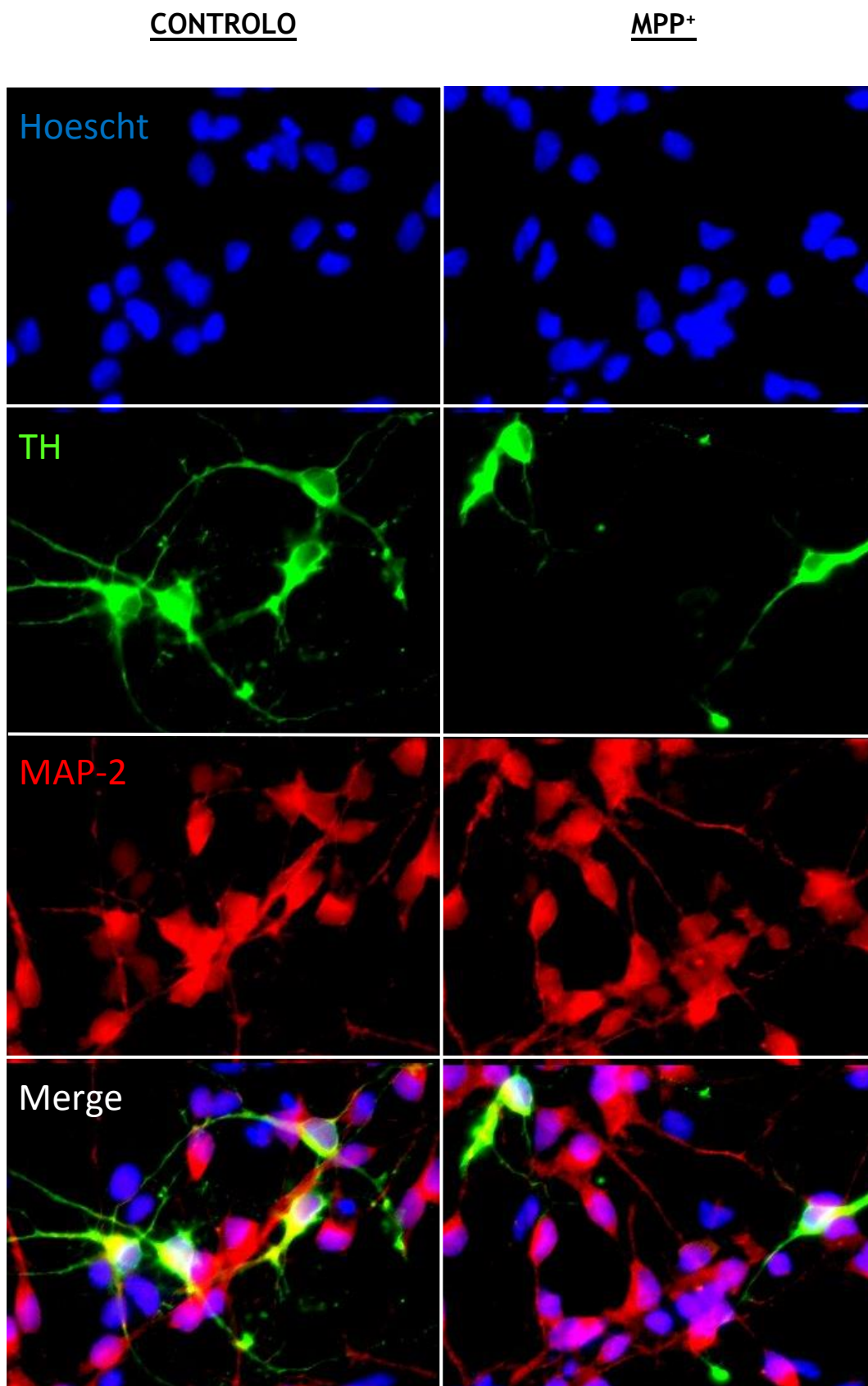


Figura 15 - Imagens de fluorescência representativas de uma imunocitoquímica realizada em culturas mistas do mesencéfalo ventral, marcadas para TH e MAP2, de modo a avaliar a lesão induzida pelo MPP⁺. O núcleo das células marcado com Hoescht é visível a azul (A). Os neurónios marcados com anti-MAP2 aparecem a vermelho (B) e os neurónios dopaminérgicos marcados com anti-TH aparecem marcados a verde (C).

Nos resultados apresentados na Figura 16, é possível observar que a exposição da cultura mista ao MPP⁺ provocou uma redução de 38,6% no número de células TH⁺. Não se verificaram alterações significativas no número de células TH⁺ quando as culturas foram incubadas apenas com KL, relativamente à situação controlo, para todas as concentrações testadas. Para além disso, pode-se verificar um efeito protetor da KL quando esta é adicionada previamente à toxina dopaminérgica, numa concentração de 0,2 µg/mL; nestas condições observou-se um aumento significativo de 30,03 % no número de células TH⁺ em relação à condição experimental MPP⁺. Concentrações de KL inferiores ou superiores a 0,2 µg/mL não conseguem proteger significativamente os ND da toxicidade induzida pelo MPP⁺.

Com estes resultados concluiu-se que existe uma concentração ideal (0,2 µg/mL) na qual a proteína KL consegue proteger os ND da toxicidade induzida pelo MPP⁺ em culturas mistas neurónios-glia do MV, por mecanismos e vias ainda desconhecidas.

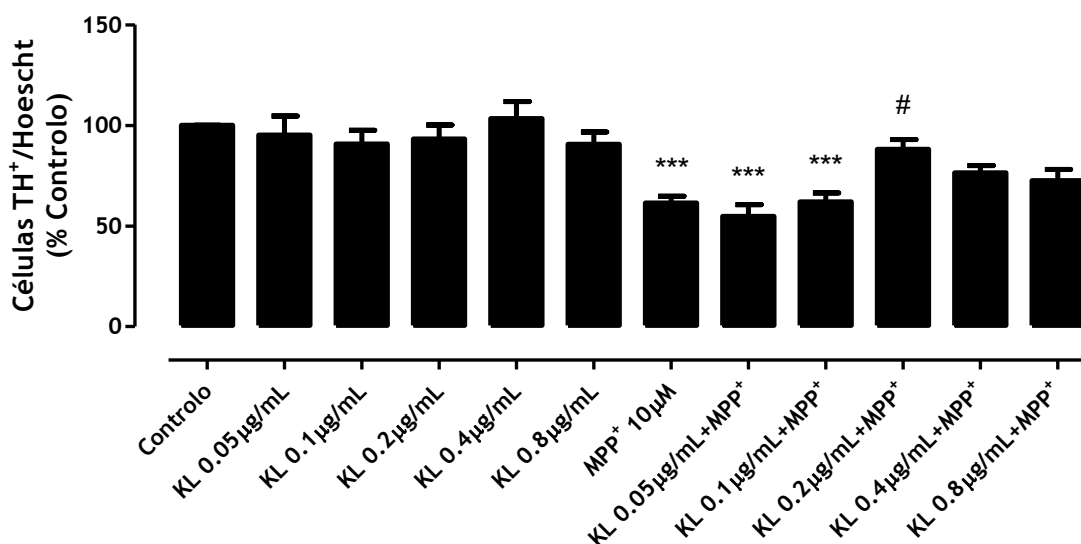


Figura 16 - O pré-tratamento de co-culturas de neurónios-glia com a proteína Klotho protege os ND da toxicidade induzida pela exposição ao MPP⁺. As células foram pré-tratadas durante 4 h com diferentes concentrações de Klotho (KL) e foram posteriormente expostas a 10 µM MPP⁺ por um período adicional de 24 h. Os resultados foram expressos em percentagem de controlo (sem KL, sem MPP⁺) e representam a média ± S.E.M de cinco ou mais experiências independentes com triplicados por condição. A análise estatística foi realizada utilizando o teste one-way ANOVA seguido do Bonferroni Post Test. (***) P < 0,001 quando comparado com o controlo; # P < 0,05 quando comparado com o MPP⁺).

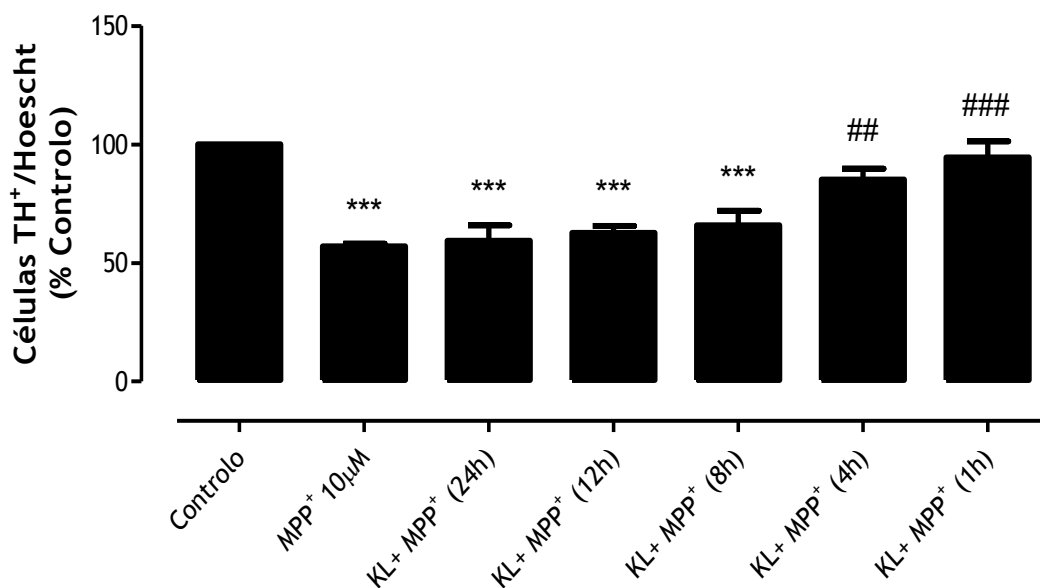
4.1.2.2. Influência do tempo de incubação e momento da administração na ação neuroprotetora da Klotho

Depois de avaliada a capacidade da KL em promover a proteção dopaminérgica na presença de MPP⁺, determinou-se o tempo de pré-incubação para o qual se verifica um maior efeito protetor. Deste modo, as co-culturas primárias de neurónios-glia foram tratadas com KL durante

diferentes períodos de tempo, 1, 4, 8, 12 e 24 h, previamente à adição do MPP⁺. Pretendeu-se também avaliar se a KL teria igualmente uma ação protetora para os ND se administrada simultaneamente ou posteriormente (1, 2, 4 e 8 h) à adição do MPP⁺.

Após as contagens do número de células TH⁺, os resultados obtidos por imunocitoquímica mostraram que para tempos superiores a 4 horas de pré-incubação, a KL não consegue proteger os ND da toxicidade induzida pelo MPP⁺. Contudo, o efeito protetor da KL continua a verificar-se quando as células são incubadas com KL 1 hora antes da aplicação do MPP⁺; nestas condições verificou-se um aumento significativo no número de células TH⁺, quando comparado com a condição experimental MPP⁺, chegando a atingir os 94,6% de células TH⁺ comparativamente ao controlo (Figura 17 A). Por outro lado e surpreendentemente, quando a KL foi adicionada ao mesmo tempo que o MPP⁺ observou-se uma grande diminuição do seu efeito protetor comparativamente ao verificado quando adicionada 1 hora antes do agente tóxico. Para além disso, o pós-tratamento da cultura com KL, para todos os tempos de incubação testados, não apresentou diferenças significativas face às células tratadas apenas com MPP⁺ (Figura 17 B). Estes resultados mostram que a KL consegue proteger os ND apenas quando adicionada 1 e 4 horas antes da lesão, numa concentração de 0,2 µg/mL, sendo o efeito neuroprotetor abolido quando a KL é adicionada simultaneamente com agente tóxico ou posteriormente a este.

(A)



(B)

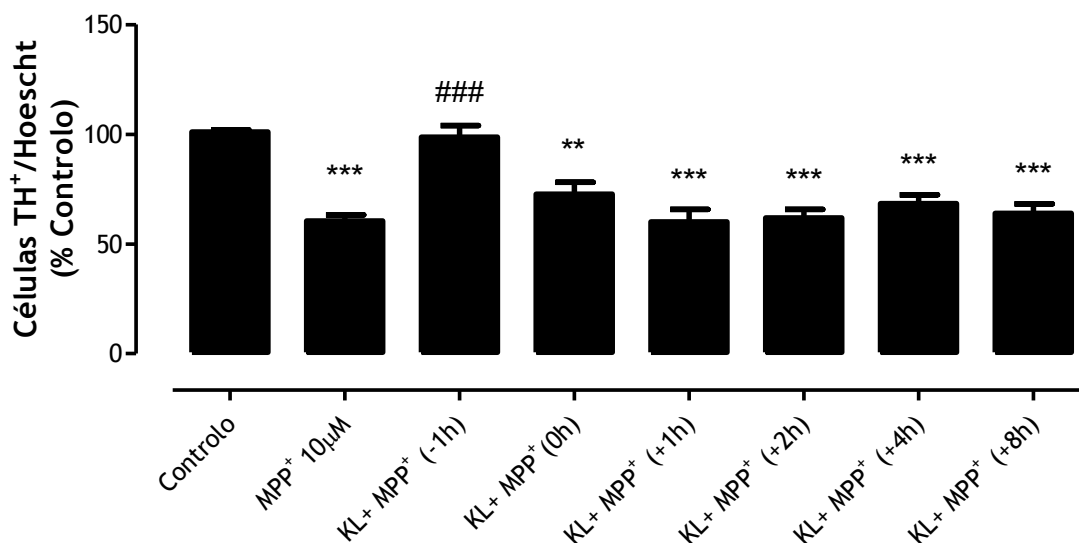


Figura 17 - Influência do tempo de incubação e momento da administração da Klotho na proteção das células dopaminérgicas da toxicidade induzida pelo MPP⁺ em co-culturas de neurónios-glia do MV. As células foram tratadas com 0,2 µg/mL de Klotho (KL) para diferentes períodos de incubação e expostas a 10 µM MPP⁺ durante 24 horas. A administração da KL ocorreu em diferentes momentos: antes da incubação com MPP⁺ (1, 4, 8, 12 e 24h - A), simultaneamente e após a administração de MPP⁺ (1, 2, 4 e 8 h - B). Os resultados foram expressos em percentagem de controlo (sem Klotho, sem MPP⁺) e representam a média ± S.E.M de quatro experiências independentes realizadas em triplicado. A análise estatística foi feita utilizando o teste one-way ANOVA seguido do Bonferroni Post Test. (***) P<0,001 e ** P<0,01 quando comparado com o controlo; ### P <0,001 quando comparado com o MPP⁺).

4.1.3. Influência da presença de astrócitos na neuroprotecção exercida pela Klotho

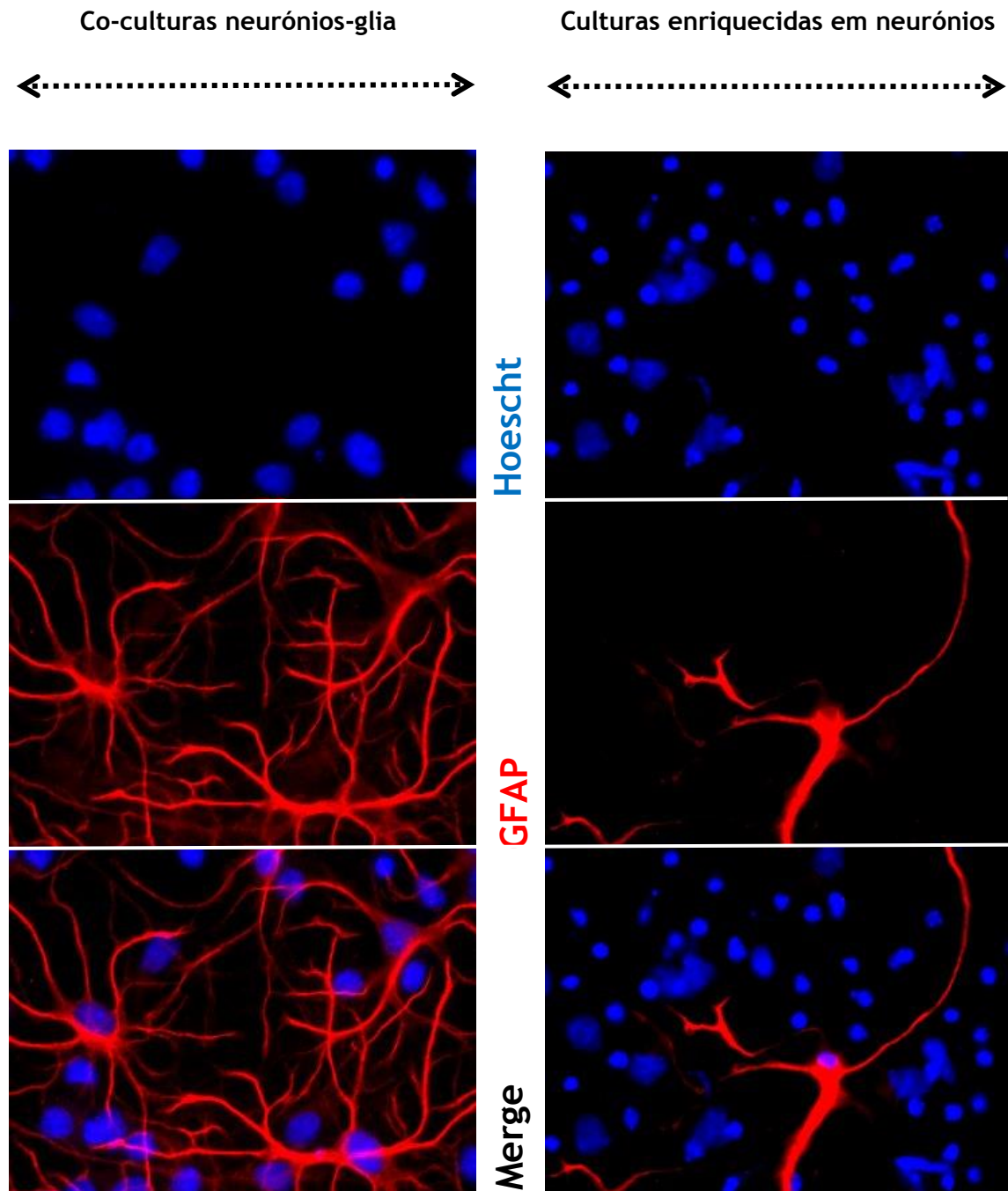
Os astrócitos desempenham funções essenciais no SNC. Estas células têm um papel importante na defesa antioxidante e em condições patológicas secretam fatores neurotróficos essenciais à sustentação, nutrição e proteção neuronal (Yokoyama et al., 2011; Rocha et al., 2012). Os resultados apresentados até agora mostram que a pré-incubação (1h e 4h) com 0,2 µg/mL de KL tem um efeito protetor nos ND em co-culturas de neurónios-glia do MV expostas a MPP⁺. No entanto, os mecanismos e as células que medeiam esta proteção são desconhecidos.

Posto isto, achou-se relevante também averiguar se esta proteção se mantinha na ausência de astrócitos. Deste modo, optou-se por realizar o mesmo procedimento em culturas primárias enriquecidas em neurónios do MV e avaliar, comparando com os resultados obtidos em co-culturas neurónios-glia, se a proteína KL consegue, nestas condições, proteger os ND da lesão induzida pelo MPP⁺. Para tal, foi necessário também avaliar a percentagem de astrócitos presentes nas culturas enriquecidas em neurónios, relativamente ao número total de células, para garantir que as alterações observadas se devem à ausência dos astrócitos. Os resultados

Klotho: um novo alvo terapêutico no tratamento da doença de Parkinson?
| Daniela Alexandre

mostraram que apenas existem 2,5% de astrócidos nas culturas enriquecidas em neurónios e 34,6% nas culturas neurónios-glia, face ao número total de células marcadas com Hoescht. Os resultados estão apresentados na Figura 18.

(A)



(B)

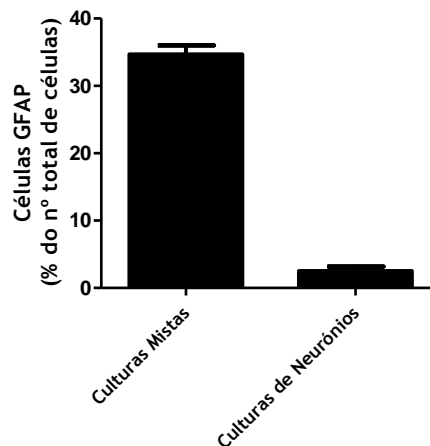
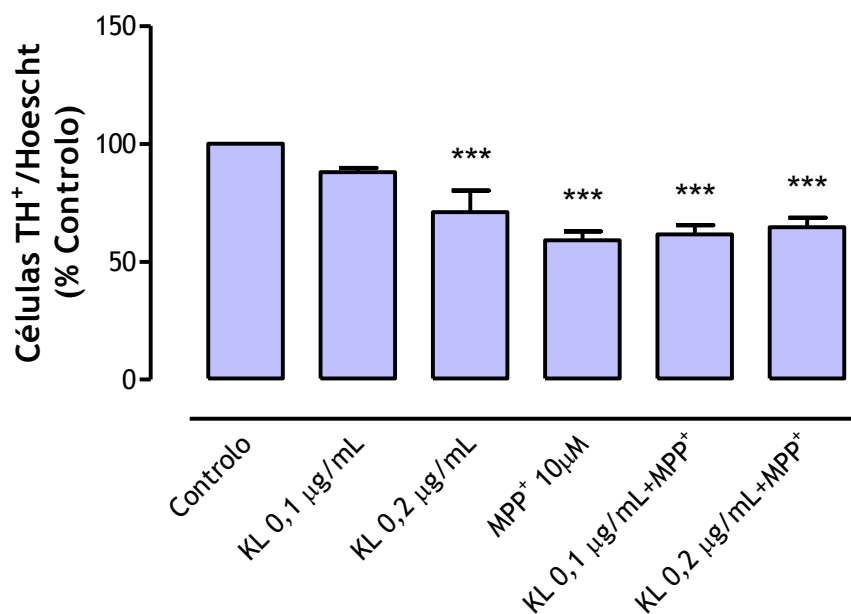


Figura 18 - Caracterização celular das culturas primárias mistas e enriquecidas em neurónios do MV. (A) Imagem representativa de uma imunocitoquímica em que os astrócitos foram marcados com anti-GFAP (vermelho) e os núcleos com Hoescht 33342 (azul). A imagem foi adquirida no microscópio de fluorescência utilizando a objetiva de 63x. (B) Quantificação da percentagem de células com marcação para GFAP (GFAP⁺), relativamente ao número total de células marcadas com Hoescht. Cada barra representa a média \pm S.E.M. de quatro experiências independentes, realizadas em triplicado.

Posteriormente, tanto as co-culturas de neurónios-glia, como as culturas enriquecidas em neurónios foram sujeitas, em paralelo, às mesmas condições experimentais: inicialmente foram incubadas com duas concentrações distintas de KL (0,1 e 0,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 1h, e posteriormente expostas a 10 μM MPP⁺ durante um período adicional de 24 horas. No final, realizou-se uma imunocitoquímica e procedeu-se à contagem do número de células TH⁺, relativamente ao número de células total, em ambas as experiências. Os resultados obtidos encontram-se representados na Figura 19. Pode observar-se que em ambas as culturas, mistas e enriquecidas em neurónios, existiu, tal como esperado, uma diminuição significativa no número de células TH⁺ após exposição ao MPP⁺, comparativamente ao controlo. Essa diminuição foi semelhante nos dois tipos de culturas, sendo de 39,93 % nas culturas mistas e 40,93 % nas culturas enriquecidas em neurónios. Os resultados obtidos nas culturas de neurónios também mostraram que, ao contrário do que acontece na presença de astrócitos, o pré-tratamento com KL não protege as células TH⁺ da toxicidade induzida pelo MPP⁺. Para além disso, e curiosamente, nas culturas enriquecidas em neurónios tratadas apenas com KL, observou-se uma diminuição de 28,9% no número de células TH⁺ para a concentração de 0,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($P < 0,001$) e de 11,96% para a concentração de 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, comparativamente ao controlo. Ou seja, na ausência de astrócitos, a proteína KL não consegue proteger os ND da toxicidade induzida pelo MPP⁺ e, para além disso, aparenta ser citotóxica para estes neurónios quando adicionada sozinha na concentração de 0,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Contudo, este efeito citotóxico da KL que se observa

não é específico dos ND. Segundo a análise do número de células totais, nesta condição para além de um menor número de TH⁺, ocorre uma diminuição do número total de células.

(A) Cultura enriquecida em neurónios



(B) Co-cultura neurónios-glia

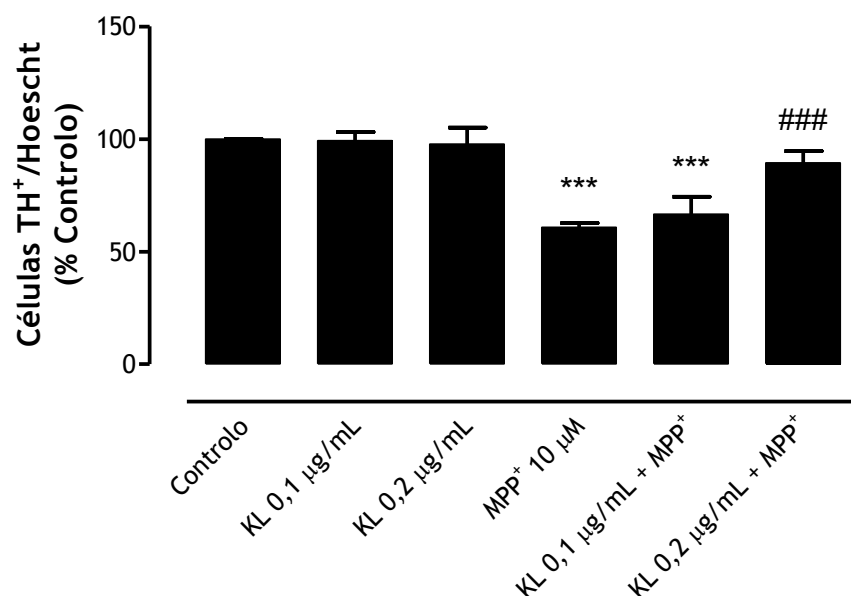


Figura 19 - Contribuição dos astrócitos na neuroprotecção exercida pela Klotho em neurónios dopaminérgicos expostos ao MPP⁺. Co-culturas de neurónios-glia (A) ou culturas enriquecidas em neurónios mesencefálicos (B) foram pré-tratadas durante 1h com 0,2 µg/mL de Klotho (KL) e, em seguida, expostas a 10 µM de MPP⁺ durante 24h adicionais. Os resultados foram expressos em percentagem de controlo (sem KL, sem MPP⁺) e representam a média ±

S.E.M de três experiências independentes realizadas em triplicado. A análise estatística foi realizada utilizando o teste one-way ANOVA seguido do Bonferroni Post Test. (***) $P < 0,001$ quando comparado com o controlo; ### $P < 0,001$ quando comparado com o MPP+).

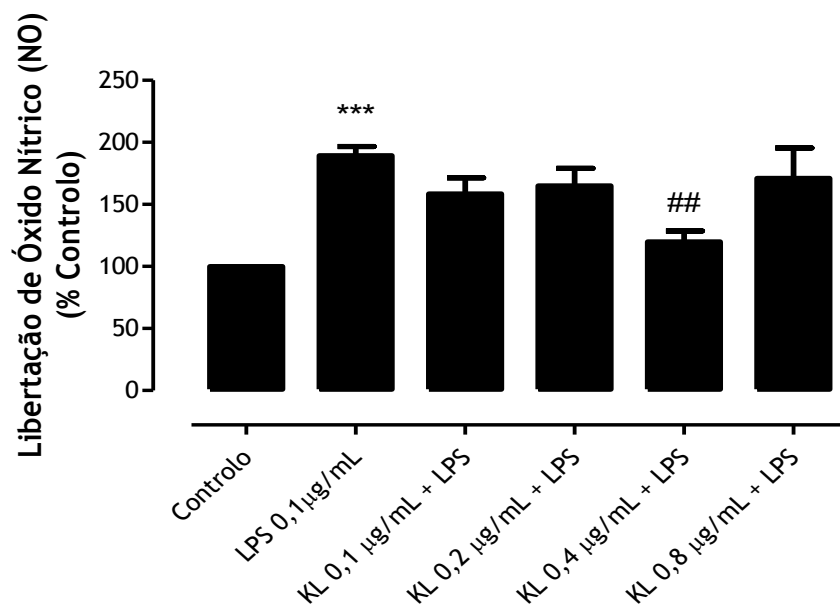
4.2. Avaliação do efeito da Klotho na reatividade microglial induzida pelo LPS

Evidências crescentes sugerem que a inflamação e o stress oxidativo mediado pela microglia reativa desempenham um papel fundamental na progressão de várias doenças neurodegenerativas, como a doença de Parkinson. Em condições fisiológicas normais, o NO é um importante segundo mensageiro, tendo um papel crucial na sinalização intracelular no sistema nervoso. No entanto, em grandes quantidades, pode ser citotóxico (Gibbons and Dragunow, 2006). O NO é produzido pela iNOS, que é expressa nas células microgliais e em situações patológicas a sua expressão é aumentada nestas células, que assim produzem grandes quantidades de NO e amplificam o dano neuronal. Posto isto, torna-se essencial atuar ao nível do controlo da reatividade microglial, que parece desempenhar um papel crucial no desenvolvimento e progressão da DP, de modo a parar o ciclo de amplificação da morte neuronal. (Block et al., 2007). Estudos prévios demonstraram algumas propriedades anti-inflamatórias da KL, inclusive a capacidade de diminuir a produção de mediadores pró-inflamatórios nos rins (Kim et al, 2015; Thurston et al. 2010). No entanto a nível cerebral, não se sabe nada acerca do seu efeito no controlo da inflamação neuronal.

No presente trabalho, pretendeu-se avaliar se a Klotho é capaz de modular a reatividade microglial induzida pelo LPS, um conhecido agente pró-inflamatório, exercendo algum efeito ao nível da produção de NO por estas células. As culturas primárias enriquecidas em microglia foram obtidas a partir de culturas primárias de células gliais do MV, nas quais os astrócitos foram removidos por tripsinização.

As culturas enriquecidas em microglia foram incubadas com diferentes concentrações de KL (0,1, 0,2, e 0,4 $\mu\text{g/mL}$), durante diferentes períodos de incubação (1, 8, 12 e 24 h) e posteriormente estimuladas com o agente pró-inflamatório LPS (0,1 $\mu\text{g/mL}$) durante 24 horas. Olhando para os resultados, como esperado, a estimulação da cultura com LPS provocou um aumento significativo na libertação de NO, em comparação com o controlo (sem KL, sem LPS). A pré-incubação das células microgliais com 0,4 $\mu\text{g/mL}$ de KL inibiu o aumento da libertação de NO induzida pelo LPS em cerca de 36,7%. No entanto, para as outras concentrações de KL testadas, esta inibição não se verificou (Figura 20 A). Por outro lado, a avaliação dos diferentes tempos de incubação com KL mostrou que a maior inibição da libertação de NO (cerca de 46,4%, comparativamente com o LPS) ocorre para o tempo de pré-incubação de 24 horas com 0,4 $\mu\text{g/mL}$ KL.

(A)



(B)

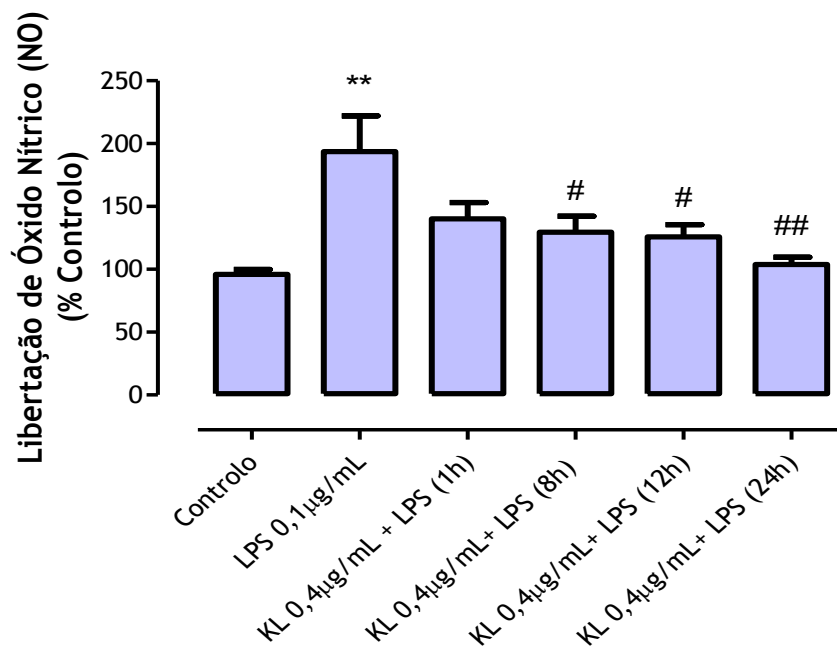
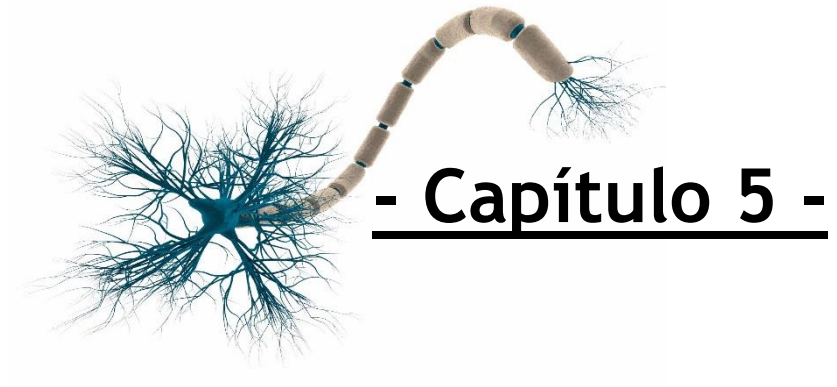


Figura 20 - Efeito da pré-incubação com KL na liberação de NO induzida pelo LPS em culturas enriquecidas em microglia do MV. As culturas primárias de microglia foram pré-tratadas durante 4 horas com diferentes concentrações de Klotho (KL) (0,1, 0,2, 0,4 e 0,8 µg/ml) (A) e pré-tratadas com 0,4 µg/mL durante diferentes tempos de incubação (1, 8, 12 e 24 h) (B). Após incubação com LPS (0,1µg/mL) durante 24h, mediu-se a liberação de NO no sobrenadante da cultura, utilizando o método de Griess. Os resultados estão representados como a média \pm S.E.M. de três a quatro experiências independentes, realizadas em triplicado e expressas em porcentagem de controle. A análise estatística foi realizada usando o teste one-way ANOVA seguido do Bonferroni Post Test. (***) $P < 0,001$ quando comparado com o controle; ## $P < 0,01$ e # $P < 0,05$ quando comparado com o LPS).



Discussão e
Conclusões

CAPÍTULO 5: DISCUSSÃO E **CONCLUSÕES**

A proteína KL é uma hormona anti-envelhecimento descrita mais extensivamente em estudos utilizando modelos animais que apresentam alterações na longevidade (aumentada ou diminuída), dependendo do grau de expressão desta proteína. Desde a descoberta do gene Klotho em 1997 (Kuro-o et al., 1997), tem surgido cada vez mais o interesse em compreender as múltiplas funções desta proteína e o seu papel na proteção contra o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas relacionadas com a idade, inclusive a DP. Algumas das funções conhecidas como, o controlo do stress oxidativo, o papel anti-inflamatório, a participação na homeostase do fosfato e na sinalização da insulina (Ji-Hee Kim, et al, 2015) poderão consideravelmente ser importantes na elucidação da função básica da KL-s no cérebro, e principalmente, segundo o contexto deste trabalho, no seu possível papel no sistema dopaminérgico.

Recentemente, surgiram algumas evidências importantes que desencadearam este interesse acrescido em investigar o papel da KL no contexto da DP. O seu efeito neuroprotetor foi demonstrado no contexto de uma outra doença neurodegenerativa, a doença de Alzheimer, tendo-se observado que a KL protege os neurónios do hipocampo da excitotoxicidade induzida pelo glutamato através da regulação do sistema redox (Zeldich et al, 2014). Um estudo publicado em 2011 mostrou que ratinhos envelhecidos e mutantes para o gene da KL apresentavam, especificamente, uma diminuição no número de ND na SN e nos níveis de DA no estriado (Kosakai et al. 2011). Mais recentemente, ensaios com murganhos transgênicos mostraram que a sobre-expressão desta proteína protege significativamente os ND contra os danos oxidativos induzidos pelo MPTP, em parte através da modulação os níveis de ativação da p38 MAPK, uma via importante na regulação do stress oxidativo (Brobey et al. 2015).

5.1. Efeito da administração da Klotho na viabilidade dos neurónios dopaminérgicos expostos a uma toxina.

Com a realização deste trabalho, pretendeu-se primeiramente avaliar o efeito da proteína recombinante KL (correspondendo à KL-s) na viabilidade dos ND expostos a uma toxina dopaminérgica. Para tal, culturas primárias de neurónios-glia do MV foram tratadas com KL e expostas ao MPP⁺. Os resultados obtidos mostraram que a KL, quando aplicada exogenamente e previamente à lesão, previne a morte dos ND induzida pelo MPP⁺. No entanto, esta proteção só se verifica quando a proteína é aplicada até 4 h antes da indução da lesão e apenas para a

concentração de 0,2 µg/mL. Concentrações inferiores não foram eficazes na proteção dos ND da citotoxicidade induzida pelo MPP⁺ e concentrações superiores, apesar de se verificar uma tendência para a neuroprotecção, tal efeito não foi estatisticamente significativo. Curiosamente, o co-tratamento destas culturas com KL mostrou-se ineficaz na proteção destes neurónios. Da mesma forma, quando adicionada após a indução da lesão dopaminérgica, a KL foi incapaz de recuperar os ND lesados pelo MPP⁺. A ausência de efeito da KL quando co-administrada com o agente tóxico foi também reportada em neurónios do hipocampo (Zeldich et al, 2014), tendo-se verificado um efeito protetor quando administrada previamente à lesão (1, 4 e 6 h, sendo o efeito neuroprotetor superior aos dois últimos tempos). Não foram reportados tempos de pré-incubação com KL superiores a 6 h, pelo que não é possível determinar se a perda de efeito neuroprotetor também se verifica nos neurónios do hipocampo. No nosso estudo, tempos de pré-incubação com KL iguais ou superiores a 8 h foram incapazes de proteger os ND. Poderia levantar-se a hipótese de que a KL recombinante poderia não ser suficientemente estável em cultura durante períodos tempo prolongados. No entanto, tal não parece ser provável uma vez que um tempo de pré-incubação de 24 h foi eficaz na redução da reatividade microglial. No seu conjunto, os nossos dados sugerem que a KL é neuroprotetora para os ND mas para uma gama estreita de concentrações e uma janela de tempo de atuação curta. Como foi referido anteriormente na secção 1, o MPP⁺ tem a capacidade de ser tóxico e causar a degeneração seletiva dos ND, essencialmente através da depleção de ATP e produção de ERO (Chong et al. 2015). Os mecanismos de proteção destes neurónios desencadeados pela KL, assim como os recetores envolvidos, não são ainda conhecidos mas sabe-se que vias de sinalização envolvidas na regulação do stress oxidativo estarão provavelmente envolvidas (Brobey et al, 2015; Zeldich et al, 2014) e sem dúvida que merecem uma investigação mais aprofundada neste modelo celular da DP. A ausência de efeito protetor da KL na linha celular N27 não foi explorada, mas provavelmente dever-se-á à ausência dos recetores (ou outros alvos celulares da KL como transportadores e canais iónicos) que medeiam o seu efeito nestas células e/ou à incapacidade de ativar as vias de sinalização referidas anteriormente. Apesar das semelhanças entre estes dois modelos celulares (expressão de TH, DAT e enzimas envolvidas na síntese e metabolismo da DA) (Clarkson et al, 1998), diferenças existentes entre uma linha celular e uma cultura primária podem justificar os resultados observados. Tais diferenças são desde logo evidentes na concentração de MPP⁺ necessária para induzir uma extensão de lesão dopaminérgica semelhante nas culturas primárias (10 µM) e na linha celular N27 (500 µM). Provavelmente, concentrações muito superiores de KL teriam que ser utilizadas para se observar um efeito protetor desta proteína nas células N27.

Os efeitos neuroprotetores da KL foram observados em culturas primárias contendo neurónios e células da glia (maioritariamente astrócitos) do mesencéfalo ventral. Torna-se, portanto, pertinente avaliar qual a contribuição dos astrócitos na neuroprotecção mediada pela KL. Os astrócitos desempenham um papel essencial no SNC. Estas células exercem um papel importante na defesa antioxidante, pois possuem a capacidade de reduzir o stress oxidativo

através da síntese de glutatona, redução da produção de ERO pela microglia e indução da enzima antioxidante hemoxigenase 1 microglial (Min et al., 2006). Além disso, em condições patológicas também expressam níveis elevados de fatores neurotróficos (Appel et al., 1997) e libertam citocinas anti-inflamatórias (Sofroniew, M. V. (2005). Neste estudo, e para avaliar a contribuição dos astrócitos na neuroproteção mediada pela KL, foram utilizadas culturas primárias enriquecidas em neurónios do MV, contendo uma muito baixa percentagem de astrócitos (cerca de 2,5%). Avaliando mais uma vez a sobrevivência dos ND na presença de KL e MPP⁺, observou-se que a proteção mediada pela KL nas co-culturas neurónios-glia é dependente da presença de astrócitos. Até ao momento, não existem evidências que suportem uma ação da proteína KL nos astrócitos, e por esse motivo o mecanismo inerente a esta função neuroprotetora é desconhecido. No entanto, os nossos resultados sugerem que a ação neuroprotetora da KL nos ND poderá ser indireta e mediada pelos astrócitos. Curiosamente, verificou-se também que, quando número de astrócitos na cultura é significativamente reduzido, a administração exógena da proteína KL sozinha pode, dependendo da concentração administrada, ser ela própria tóxica para os ND. A concentração de 0,2 µg/mL mostrou ser neuroprotetora e não tóxica para os ND quando aplicada nas culturas mistas, e neurotóxica e incapaz de proteger os ND nas culturas enriquecidas em neurónios. Uma concentração de KL inferior e não tóxica para os ND (0,1 µg/mL) mostrou, ainda assim, ser ineficaz na proteção dos ND nas culturas enriquecidas em neurónios. Em conjunto, estes resultados sugerem que os astrócitos são importantes mediadores da ação neuroprotetora da proteína KL nos ND do mesencéfalo ventral, sendo necessários mais estudos no sentido de esclarecer os mecanismos envolvidos.

5.2. Efeito da administração da Klotho na modulação da reatividade da microglia.

Tem sido demonstrado que a KL apresenta propriedades anti-inflamatórias (Kim et al., 2015; Thurston et al., 2010) no entanto a nível cerebral não existem ainda evidências desta ação anti-inflamatória. Uma vez que a ativação permanente e excessiva das células microgliais tem sido apontada como uma das possíveis causas da neurodegeneração (Amor et al., 2010), seria benéfico caso se verificasse algum efeito desta proteína na diminuição de parâmetros de reatividade microglial, nomeadamente na produção de NO. Sabe-se que quando a microglia é ativada em resposta ao LPS há um aumento na produção de várias citocinas pró-inflamatórias, na produção de ERO e uma regulação positiva da iNOS com conseqüente aumento da libertação de NO (Hurley and Tizabi, 2013; Liu and Bing, 2011; Lull and Block, 2010).

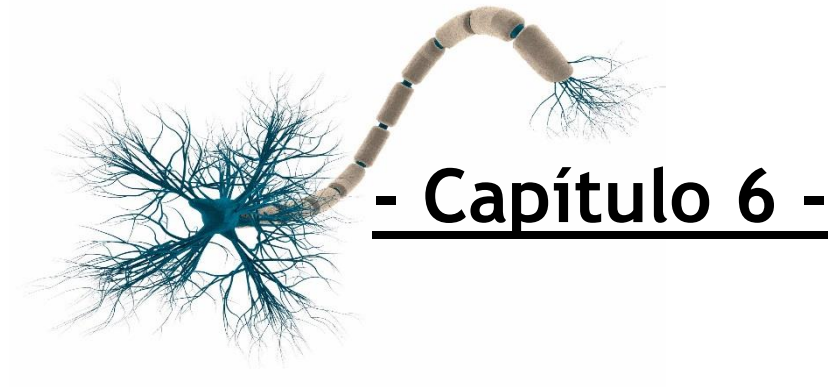
No presente estudo, optou-se então por averiguar se a administração da KL seria capaz de modular a reatividade da microglia, através da incubação de culturas primárias de microglia do MV com a proteína e a estimulação das mesmas com LPS. Quando as células foram pré-incubadas

Klotho: um novo alvo terapêutico no tratamento da doença de Parkinson? | Daniela Alexandre

com 0,4µg/mL de KL houve uma inibição da produção de NO pela microglia estimulada com LPS. Para além disso, este efeito inibitório na libertação de NO é mais evidente para o tempo de pré-incubação de 24 horas.

Assim sendo, os resultados obtidos neste estudo, vão de alguma forma ao encontro do efeito anti-inflamatório que a proteína KL parece assumir noutros órgãos (Yi Zeng. Et al., 2015). Futuramente, será necessário avaliar outros parâmetros de reatividade microglial para se confirmar este efeito da KL e, se confirmado, investigar se é relevante para a neuroprotecção dos ND.

Estudos em modelos animais da DP serão também importantes para determinar se, de facto, a KL continua a exercer um efeito neuroprotetor nos ND e um efeito anti-inflamatório na microglia *in vivo*, podendo ou não ser utilizada em estratégias terapêuticas que visem o retardar da progressão desta doença.



Perspetivas
Futuras

CAPÍTULO 6: PERSPETIVAS FUTURAS

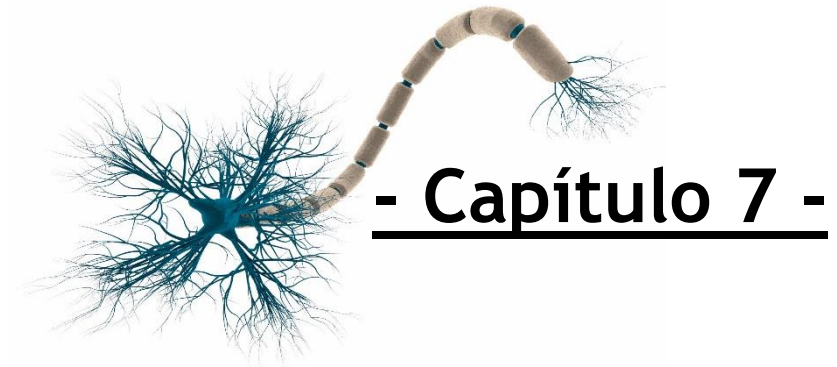
Com este trabalho comprovámos que a administração exógena da proteína KL protege os ND da toxicidade induzida pelo MPP⁺, através de um mecanismo que parece ser dependente da presença de astrócitos. Para exercer esse efeito neuroprotetor, a KL tem que ser administrada até 4 horas antes da indução da lesão. Adicionalmente, também verificámos que esta proteína consegue prevenir a libertação de NO induzida pelo LPS na microglia do MV.

Nas próximas tarefas, relativamente à proteção dopaminérgica seria interessante analisar marcadores de stresse oxidativo, tanto na presença como na ausência de KL, em condições controlo e oxidantes. Visto que a KL parece proteger os ND apenas na presença de astrócitos, seria interessante também averiguar e perceber de que forma isto acontece. Propomos por exemplo expor apenas os neurónios ao meio condicionado de culturas mistas e verificar se os astrócitos participam nessa proteção por intermédio de mediadores solúveis libertados para o espaço extracelular.

Não está também bem esclarecido se a KL que é adicionada aos meios de cultura exerce o seu efeito por ligação a recetores membranares ou se tem a capacidade de ser internalizada e assim ativar intracelularmente mecanismos protetores. Usando como ferramenta anticorpos específicos para a KL, seria possível determinar o seu local de ação na célula (extracelular, ao nível da membrana, ou intracelular).

Visto que a capacidade neuroprotetora da KL foi comprovada, seria importante dar continuidade a este estudo, de modo a completar e confirmar estes resultados com recurso a uma abordagem diferente e tentar perceber de que forma a proteína efetua essa proteção, nomeadamente verificar se esta promove a expressão de proteínas antiapoptóticas ou antioxidantes, e se realmente consegue modular a reatividade microglial por avaliação de outros parâmetros de reatividade microglial.

Por último, sugerimos posteriormente a avaliação do efeito da KL num modelo *in vivo* da DP, quer ao nível da neuroproteção, quer ao nível do controlo da inflamação.



Referências
Bibliográficas

CAPÍTULO 7: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams, J. D., Klaidman, L. K., Leung, A. C. (1993). "MPP+ and MPDP+ induced oxygen radical formation with mitochondrial enzymes." *Free Radic Biol Med* 15: 181-186.

Amor, S., Puentes, F., Baker, D. and Valk, P. (2010). "Inflammation in neurodegenerative diseases." *Immunology* 129(2): 154-169.

Aoki E., Yano R, Yokoyama H. et al. (2009) "Role of nuclear transcription factor kappa B (NF-kappaB) for MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine)-induced apoptosis in nigral neurons of mice." *Exp Mol Pathol* 86: 57-64.

Arking, D. E., et al. (2002). "Association of human aging with a functional variant of klotho." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(2): 856-861.

Armando, V., Antonio, G., Giovanni, F., Maurizio, I., Ida, R. M., Andrea, G., Michela, C., Chiara, R., Mario C. A. and Marco V. (2016). "Parkinson's disease: Autoimmunity and neuroinflammation." *Autoimmun Rev*.

Bloch, L., et al. (2009). "Klotho is a substrate for alpha-, beta- and gamma-secretase." *FEBS Lett* 583(19): 3221-3224.

Block, M. L., Zecca L. and Hong J. (2007). "Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms." *Nat Rev Neurosci* 8(1): 57-69.

Bove J., Prou, D. Perier C. and Przedborski S. (2005). "Toxin-induced models of Parkinson's disease." *NeuroRx* 2: 484-94.

Brobey, R. K., et al. (2015). "Klotho Protects Dopaminergic Neuron Oxidant-Induced Degeneration by Modulating ASK1 and p38 MAPK Signaling Pathways." *PLoS One* 10(10): e0139914.

Bronstein D.M., Perez-Otano I., Sun V., Mullis Sawin S.B., Chan J., Wu G.C., Hudson P.M., Kong L.Y., Hong J.S., McMillian M.K. (1995). "Glia-dependent neurotoxicity and neuroprotection in mesencephalic cultures." *Brain Research* 704: 112-116.

Chang Q., et al. (2005). "The b-Glucuronidase Klotho Hydrolyzes and Activates the TRPV5 Channel." *SCIENCE* 310: 490-493.

Klotho: um novo alvo terapêutico no tratamento da doença de Parkinson?
| Daniela Alexandre

Chen, C. D., et al. (2013). "The antiaging protein Klotho enhances oligodendrocyte maturation and myelination of the CNS." *J Neurosci* 33(5): 1927-1939.

Chen, Shin-Yuan and Tsai, Sheng-Tzung. (2010). "The Epidemiology of Parkinson's Disease". *TZU CHI MED J* 22: 73-81.

Chong C. M., et al. (2015). "Discovery of a novel neuroprotectant, BHDPC, that protects against MPP+/MPTP-induced neuronal death in multiple experimental models." *Free Radic Biol Med* 89: 1057-1066.

Ciechanover, A. and Kwon, Y. T. (2015). "Degradation of misfolded proteins in neurodegenerative diseases: therapeutic targets and strategies." *Exp Mol Med* 47: e147.

Clarkson, E. D., et al. (1998). "Stands of embryonic mesencephalic tissue show greater dopamine neuron survival and better behavioral improvement than cell suspensions after transplantation in parkinsonian rats." *Brain Res.* 806(1): 60-68.

Clinton, S. M., et al. (2013). "Expression of klotho mRNA and protein in rat brain parenchyma from early postnatal development into adulthood." *Brain Res* 1527: 1-14.

Damier P., Hirsch EC and Zhang P. (1993) "Glutathione peroxidase, glial cells and Parkinson's disease." *Neuroscience* 52:1-6.

Dauer, W. and Przedborski, S. (2003). "Parkinson's Disease: Mechanisms and Models". *Neuron.* 39: 889-909.

De Lella Ezcurra A.L., Chertoff M., Ferrari C., Graciarena M., Pitossi F. (2010). "Chronic expression of low levels of tumor necrosis factor-alpha in the substantia nigra elicits progressive neurodegeneration, delayed motor symptoms and microglia/macrophage activation." *Neurobiol Dis* 37:630-640.

Del Zompo M., Piccardi M. P., Ruiu S., Quartu M., Gessa G. L., Vaccari A. (1993). "Selective MPP+ uptake into synaptic dopamine vesicles: possible involvement in MPTP neurotoxicity." *Br J Pharmacol* 109: 411-414.

Dexter, D. T. and Jenner, P. (2013). "Parkinson disease: from pathology to molecular disease mechanisms". *Free Radic Biol Med.*

Di Bona, D., et al. (2014). "Association of Klotho polymorphisms with healthy aging: a systematic review and meta-analysis." *Rejuvenation Res* 17(2): 212-216.

Dickson D. W., Braak H., Duda J. E., Duyckaerts C., Gasser T., Halliday G. M., Hard J., Leverenz J. B., Tredici K. D., Wszolek Z. K. and Litvan I. (2009). "Neuropathological assessment of Parkinson's disease: refining the diagnostic criteria". *Lancet Neurol.* 8: 1150-57.

Klotho: um novo alvo terapêutico no tratamento da doença de Parkinson?
| Daniela Alexandre

Duce, J. A., et al. (2006). "Activation of early components of complement targets myelin and oligodendrocytes in the aged rhesus monkey brain." *Neurobiol Aging* 27(4): 633-644.

Dunnett S. B. and Björklund A. (1999). "Neural Transplantation Methods: Humana Press."

Fahn S. (2003). "Description of Parkinson's Disease as a Clinical Syndrome". *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 991: 1-14.

German, D. C., et al. (2012). "Nuclear localization of Klotho in brain: an anti-aging protein." *Neurobiol Aging* 33(7): 1483 e1425-1430.

Gotow, T. (2008). "Neurons in the Klotho Mutant Mouse Show Biochemical and Morphological Characteristics Resembling Age-Related Disorders." *Tzu Chi Medical Journal* 20(3): 155-160.

Griess, P. (1879) Bemerkungen zu der abhandlung der H.H. Weselsky und Benedikt "Ueber einige azoverbindungen." *Chem. Ber.* 12, 426-8.

Haupt C., Witte O.W. and Frahm C. (2007). "Up-regulation of Connexin43 in the glial scar following photothrombotic ischemic injury." *Mol Cell Neurosci* 35:89-99.

Hirsch, E. C. and Hunot S. (2009). "Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection?." *Lancet Neurol.* 8: 382-97.

Hirsch, E. C., Jenner, P. and Przedborski, S. (2013). "Pathogenesis of Parkinson's disease." *Mov Disord* 28(1): 24-30.

Hurley, L. L. and Tizabi Y. (2013). "Neuroinflammation, neurodegeneration, and depression." *Neurotox Res* 23(2): 131-144.

Imamura K., Hishikawa N., Sawada M., Nagatsu T., Yoshida M. and Hashizume Y. (2003). "Distribution of major histocompatibility complex class II-positive microglia and cytokine profile of Parkinson's disease brains." *Acta Neuropathol (Berl)* 106: 518-526.

Imura, A., et al. (2007). "alpha-Klotho as a regulator of calcium homeostasis." *Science* 316(5831): 1615-1618.

Jackson-Lewis, V. and Przedborski, S. (2007). "Protocol for the MPTP mouse model of Parkinson's disease." *Nat Protoc* 2(1): 141-151.

Jagmag, S. A., Tripathi, N., Shukla, S. D., Maiti, S. and Khurana, S. (2015). "Evaluation of Models of Parkinson's Disease." *Front Neurosci* 9: 503.

Jellinger, K. A. (2009). "Recent advances in our understanding of neurodegeneration." *J Neural Transm (Vienna)* 116(9): 1111-1162.

Klotho: um novo alvo terapêutico no tratamento da doença de Parkinson?
| Daniela Alexandre

- Kalia, L. V. and Lang A. E. (2015). "Parkinson's disease." *The Lancet* 386(9996): 896-912.
- Kim, J. H., et al. (2015). "Biological Role of Anti-aging Protein Klotho." *J Lifestyle Med* 5(1): 1-6.
- King, G. D., et al. (2012). "Promoter methylation and age-related downregulation of Klotho in rhesus monkey." *Age (Dordr)* 34(6): 1405-1419.
- Klegeris, A. Walker, D. G., McGeer, P.L. (1997). "Regulation of glutamate in cultures of human monocytic THP-1 and astrocytoma U-373 MG cells." *J. Neuroimmunol.* 78: 152-161.
- Kosakai, A., et al. (2011). "Degeneration of mesencephalic dopaminergic neurons in klotho mouse related to vitamin D exposure." *Brain Res* 1382: 109-117.
- Koyama, D., Sato Y., Aizawa M., Maki T., Kurosawa M., Kuro-o M. and Furukawa Y. (2015). "Soluble alphaKlotho as a candidate for the biomarker of aging." *Biochem Biophys Res Commun* 467(4): 1019-1025.
- Kurkowska-Jastrzebska I., Balkowiec-Iskra E., Ciesielska A., Joniec I., Cudna A., Zaremba M.M., Czlonkowski A., Czlonkowska A. (2009). "Decreased inflammation and augmented expression of trophic factors correlate with MOG-induced neuroprotection of the injured nigrostriatal system in the murine MPTP model of Parkinson's disease." *Int Immunopharmacol* 9:781-791.
- Kuro-o, M. (2009). "Klotho and aging." *Biochim Biophys Acta* 1790(10): 1049-1058.
- Kuro-o, M., Matsumura Y., Aizawa H., Kawaguchi H., Suga T., Utsugi T., Ohyama Y., et al. (1997). "Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling" ageing. *NATURE* 390: 45-51.
- Kurosu, H., Yamamoto M., Clark J. D., et al. (2005). "Suppression of aging in mice by the hormone Klotho." *Science* 309(5742): 1829-1833.
- Li, S., Dong, J., Cheng, C. and Le, W. (2016). "Therapies for Parkinson's diseases: alternatives to current pharmacological interventions." *J Neural Transm (Vienna)*.
- Lin, M. T. and M. F. Beal (2006). "Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases." *Nature* 443(7113): 787-795.
- Liu, M. and Bing G. (2011). "Lipopolysaccharide animal models for Parkinson's disease." *Parkinsons Dis* 2011: 327089.
- Lull, M. E. and M. L. Block (2010). "Microglial activation and chronic neurodegeneration." *Neurotherapeutics* 7(4): 354-365.

Klotho: um novo alvo terapêutico no tratamento da doença de Parkinson?

| Daniela Alexandre

Machado, V., Zöller, T., Attaai, A. and Spittau, B. (2016). "Microglia-Mediated Neuroinflammation and Neurotrophic Factor-Induced Protection in the MPTP Mouse Model of Parkinson's Disease-Lessons from Transgenic Mice." *Int J Mol Sci* 17(2).

Massó, A., et al. (2015). "Secreted and Transmembrane alphaKlotho Isoforms Have Different Spatio-Temporal Profiles in the Brain during Aging and Alzheimer's Disease Progression." *PLoS One* 10(11): e0143623

Masuda, H., Chikuda H., Suga T., Kawaguchi H. and Kuro-o M. (2005). "Regulation of multiple ageing-like phenotypes by inducible klotho gene expression in klotho mutant mice." *Mech Ageing Dev* 126(12): 1274-1283.

Matsumura Y., Aizawa, H., Shiraki-Iida T., Nagai, R., Kuro-o, M. and Nabeshima, Y. (1998). "Identification of the Human Klotho Gene and Its Two Transcripts Encoding Membrane and Secreted Klotho Protein." *BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS* 242: 626-630.

McGeer P.L., Itagaki S., Boyes B.E., McGeer E.G. (1988b). "Reactive microglia are positive for HLA-DA in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brain." *Neurol* 38:1285-1291.

McGeer, P. L., Schwab, C., Parent, A. and Doudet, D. (2003). "Presence of reactive microglia in monkey substantia nigra years after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine administration." *Ann Neurol* 54, 599-604.

Meredith, G. E. and Rademacher, D. J. (2011). "MPTP mouse models of Parkinson's disease: an update." *J Parkinsons Dis* 1(1): 19-33.

Michel, P. P., Hirsch, E. C. and Hunot, S. (2016). "Understanding Dopaminergic Cell Death Pathways in Parkinson Disease." *Neuron* 90(4): 675-691.

Miller, I. N. and A. Cronin-Golomb (2010). "Gender differences in Parkinson's disease: clinical characteristics and cognition." *Mov Disord* 25(16): 2695-2703.

Mirza B., Hadberg H., Thomsen P. and Moos T. (2000). "The absence of reactive astrocytosis is indicative of a unique inflammatory process in Parkinson's disease." *Neuroscience*; 95: 425-32.

Mythri R.B., Harish G., Dubey S.K., Misra K., Bharath M.M. (2011). "Glutamoyl diester of the dietary polyphenol curcumin offers improved protection against peroxynitrite-mediated nitrosative stress and damage of brain mitochondria in vitro: Implications for Parkinson's disease." *Mol Cell Biochem.* 347: 135-43.

Klotho: um novo alvo terapêutico no tratamento da doença de Parkinson?

| Daniela Alexandre

Müller T. (2012). "Drug therapy in patients with Parkinson's disease". *Translational Neurodegeneration* 1:10.

Nagai R., et al. (2000). *Cell Mol Life Sci* 57:738-746, pmid:10892340.

Nagai, T., et al. (2003). "Cognition impairment in the genetic model of aging klotho gene mutant mice: a role of oxidative stress." *FASEB J* 17(1): 50-52.

Nagatsu, T. and Sawada, M. (2007). "Biochemistry of postmortem brains in Parkinson's disease: historical overview and future prospects." *J Neural Transm Suppl*, 113-20.

Noyce, A. J., Bestwick,, J. P., Moriyama, L. S., Hawkes, C. H., Giovannoni, G., Lees, A. J. and Schrag, A. (2012). "Meta-analysis of early nonmotor features and risk factors for Parkinson disease." *Ann Neurol* 72(6): 893-901.

Ouchi, Y., Yoshikawa, E., Sekine, Y., Futatsubashi, M., Kanno, T., Ogusu, T. and Torizuka, T. (2005). "Microglial activation and dopamine terminal loss in early Parkinson's disease." *Ann Neurol* 57, 168-75.

Pavlatou, M. G., et al. (2016). "Klotho: a humeral mediator in CSF and plasma that influences longevity and susceptibility to multiple complex disorders, including depression." *Transl Psychiatry* 6(8): e876.

Pedersen, L., Pedersen S. M., Brasen C. L. and Rasmussen L. M. (2013). "Soluble serum Klotho levels in healthy subjects. Comparison of two different immunoassays." *Clin Biochem* 46(12): 1079-1083.

Pisanu, A., Lecca D., Mulas G., Wardas J., Simbula G., Spiga S., and Carta A.R. (2014). "Dynamic changes in pro- and anti-inflammatory cytokines in microglia after PPAR- γ agonist neuroprotective treatment in the MPTP mouse model of progressive Parkinson's disease." *Neurobiol Dis.* 71, 280-91

Postuma, R. B., Barone, P., Burn, D. J., Hawkes, C. H., Oertel, W. and Ziemssen, T. (2012). "Identifying prodromal Parkinson's disease: pre-motor disorders in Parkinson's disease." *Mov Disord* 27(5): 617-626.

Qin, L., Wu, X., Block, M. L., Liu, Y., Breese, G. R., Hong, J. S., Knapp, D. J. and Crews, F. T. (2007). "Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration." *Glia* 55(5): 453-462.

Ramsay, R. R., and Singer, T. P. (1986). "Energy-dependent uptake of N-methyl-4-phenylpyridinium, the neurotoxic metabolite of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, by mitochondria." *J. Biol. Chem.* 261: 7585-7587.

Klotho: um novo alvo terapêutico no tratamento da doença de Parkinson?

| Daniela Alexandre

Ransohoff, R. M. (2016). "How neuroinflammation contributes to neurodegeneration." *Science* 353: 777-783.

Ritter, C. S., et al. (2015). "Differential expression and regulation of Klotho by paricalcitol in the kidney, parathyroid, and aorta of uremic rats." *Kidney Int* 87(6): 1141-1152.

Rocha, S. M., Cristovao, A. C., Campos, F. L., Fonseca, C. P. and Baltazar, G. (2012). "Astrocyte-derived GDNF is a potent inhibitor of microglial activation." *Neurobiol Dis* 47, 407-15.

Rosner, S., Giladi, N. and Orr-Urtreger, A. (2008). "Advances in the genetics of Parkinson's disease." *Acta Pharmacol Sin* 29(1): 21-34.

Saijo K., Winner B., Carson C.T., Collier J.G., Boyer L., Rosenfeld M.G. et al. (2009). "A Nurr1/CoREST pathway in microglia and astrocytes protects dopaminergic neurons from inflammation induced death." *Cell*.;137:47-59.

Salat, D. and Tolosa E. (2013). "Levodopa in the treatment of Parkinson's disease: current status and new developments." *J Parkinsons Dis* 3(3): 255-269.

Sarkar, S., Raymick, J. and Imam, S. (2016). "Neuroprotective and Therapeutic Strategies against Parkinson's Disease: Recent Perspectives." *International Journal of Molecular Sciences* 17(6): 904.

Sastre, M., Katsouri L., Birch A., Renziehausen A., Dexter D.T, Crichton R.R. and Ward R.J. (2014). "Neuroinflammation in Alzheimer's, Parkinson's and Huntington Diseases in Neuroimmunology." Ed Amor S. & Woodrooffe N. Publ. Wiley and Son, Chichester, UK.

Schober, A. (2004). "Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP." *Cell Tissue Res* 318(1): 215-224.

Schrag, A., Ben-Shlomo, Y., Quinn, N. P. (2000). "Cross sectional prevalence survey of idiopathic Parkinson's disease and parkinsonism in London." *Br. Med.J* 321: 21-22.

Shiozaki, M., et al. (2008). "Morphological and biochemical signs of age-related neurodegenerative changes in klotho mutant mice." *Neuroscience* 152(4): 924-941.

Siahanidou, T., et al. (2012). "Plasma soluble alpha-klotho protein levels in premature and term neonates: correlations with growth and metabolic parameters." *Eur J Endocrinol* 167(3): 433-440.

Shun-Ai Li, et al. (2004). "Immunohistochemical Localization of Klotho Protein in Brain, Kidney, and Reproductive Organs of Mice." *CELL STRUCTURE AND FUNCTION* 29: 91-99.

Klotho: um novo alvo terapêutico no tratamento da doença de Parkinson?
| Daniela Alexandre

Smith, J. A., Das, A., Ray S. K. and Banik, N. L. (2012). "Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in neurodegenerative diseases." *Brain Res Bull* 87(1): 10-20.

Tanaka T., Kai S., Matsuyama T., Adachi T., Fukuda K., Hirota K. (2013). "General anesthetics inhibit LPS-induced IL-1beta expression in glial cells." *PLoS One.*;8:e82930.

Tatar M, et al. (2003) "The endocrine regulation of aging by insulin-like signals. *Science.*" 299:1346-1351.

Teocchi M. A., et al. (2013). "Hippocampal gene expression dysregulation of Klotho, nuclear factor kappa B and tumor necrosis factor in temporal lobe epilepsy patients." *al. Journal of Neuroinflammation.* 10:53.

Thurston, R. D., et al. (2010). "Tumor necrosis factor and interferon-gamma down-regulate Klotho in mice with colitis." *Gastroenterology* 138(4): 1384-1394, 1394 e1381-1382.

Tilleux S., and Hermans E. (2007). "Neuroinflammation and regulation of glial glutamate uptake in neurological disorders." *J Neurosci Res.* 85: 2059-2070.

Urakawa, I., et al. (2006). "Klotho converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF23." *Nature* 444(7120): 770-774.

Wakabayashi, K., Mori, F., Takahashi, H. (2006). "Progression patterns of neuronal loss and Lewy body pathology in the substantia nigra in Parkinson's disease." *Parkinsonism & Related Disorders* 12: 92-98.

Wang, Q., Liu, Y. and Zhou, J. (2015). "Neuroinflammation in Parkinson's disease and its potential as therapeutic target." *Transl Neurodegener* 4: 19.

Wang, Y. and Sun Z. (2009). "Current understanding of klotho." *Ageing Res Rev* 8(1): 43-51.

Wilhelmsson U., Bushong E.A., and Price D.L. (2006). Redefining the concept of reactive astrocytes as cells that remain within their unique domains upon reaction to injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006 103: 17513-18.

Xu, Y. and Sun Z. (2015). "Molecular basis of Klotho: from gene to function in aging." *Endocr Rev* 36(2): 174-193.

Yacoubian, T.A. and Standaert, D.G. (2009). "Targets for Neuroprotection in Parkinson's Disease." *Biochim. Biophys. Acta.* 1792, 676-687.

Yamamoto, M., et al. (2005). "Regulation of oxidative stress by the anti-aging hormone klotho." *J Biol Chem* 280(45): 38029-38034.

Klotho: um novo alvo terapêutico no tratamento da doença de Parkinson?
| Daniela Alexandre

Yamazaki, Y., Imura A., et al. (2010). "Establishment of sandwich ELISA for soluble alpha-Klotho measurement: Age-dependent change of soluble alpha-Klotho levels in healthy subjects." *Biochem Biophys Res Commun* 398(3): 513-518.

Yokoyama, H., Uchida, H., Kuroiwa, H., Kasahara, J. and Araki, T. (2011). "Role of glial cells in neurotoxin-induced animal models of Parkinson's disease." *Neurol Sci* 32, 1-7.

Zeldich, E., et al. (2014). "The neuroprotective effect of Klotho is mediated via regulation of members of the redox system." *J Biol Chem* 289(35): 24700-24715.

Zuo, L. and Motherwell M. S. (2013). "The impact of reactive oxygen species and genetic mitochondrial mutations in Parkinson's disease." *Gene* 532(1): 18-23.