



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR  
Ciências

# **GPER: Uma nova estratégia de proteção na lesão dopaminérgica?**

**Agustina Morais Bessa**

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

Orientador: Prof. Doutora Graça Maria Fernandes Baltazar

Covilhã, junho de 2013



*“Faut de la persévérance  
Celui qui croit aura sa chance  
Mets toi bien ça dans ta conscience  
Faut de la persévérance  
De ton travail acharné  
Tu atteindras le sommet”*

Lââm



# Agradecimentos

Esta dissertação de mestrado decorre de uma experiência única que passou pelo patamar da investigação, sem dúvida, mas pela componente humana também. Como tal, agradeço a disponibilidade de todos os colaboradores do Centro de Investigação em Ciências da Saúde, em especial,

À Professora Doutora Graça Baltazar por ter tornado esta dissertação uma realidade, por todo o apoio, partilha de saber e espírito crítico que tanto contribuíram para o meu crescimento. Agradeço, em especial, a paciência e disponibilidade na revisão desta dissertação.

À Professora Doutora Carla Fonseca por toda a amabilidade e ensinamentos práticos.

Aos meus colegas de laboratório, em especial à Ana Martinho por toda a disponibilidade e ajuda.

À Rita pela amizade, companheirismo e por estar presente nos bons mas em especial nos maus momentos. Obrigada por me ouvires.

À Marta por ter sido uma fonte de força e motivação. Obrigada por acreditares em mim.

Ao Tiago e à Julieta por terem partilhado e animado os meus dias no laboratório. Sem vocês este percurso não teria tido tantas gargalhadas.

À Ângela e ao Miguel por me ouvirem e darem força para continuar.

Aos meus avós pelo apoio constante.

Ao meu irmão que mesmo sendo de poucas palavras sei que sou um orgulho para ele.

Aos meus pais, pelo apoio incondicional, por me encorajarem sempre e por me terem ensinado a querer fazer sempre mais e melhor. De outra forma, não teria chegado até aqui. Espero que esta etapa, que agora termino, possa, de alguma forma, retribuir e compensar todo o carinho, amor e dedicação que, constantemente, me oferecem.

Por último, um especial obrigado ao João por todo o amor, dedicação, compreensão e pela presença incansável com que me apoiou ao longo da elaboração desta tese. Obrigada por tudo...

Esta dissertação é-vos dedicada.



## Resumo

Estudos epidemiológicos e estudos em modelos da Doença de Parkinson sustentam a hipótese do estrogénio possuir um papel neuroprotetor na via nigrostriatal. Resultados do nosso grupo (Campos *et al.* 2012) mostram que o estrogénio promove a regulação da expressão de GDNF a qual é requerida para a proteção dos neurónios dopaminérgicos pelo 17- $\beta$  estradiol. Adicionalmente, também mostramos num modelo da doença de Parkinson que a proteção induzida pelo 17- $\beta$  estradiol não requer a ativação de recetores intracelulares. Com o presente estudo pretendemos investigar o papel de um recetor de estrogénio associado à membrana, na neuroproteção contra a lesão dopaminérgica induzida pelo MPP<sup>+</sup> (*in vitro*) ou MPTP (*in vivo*).

Os nossos resultados mostraram que o G1, um agonista selectivo do recetor, previne a perda dos neurónios dopaminérgicos induzida pela exposição de culturas celulares do mesencéfalo ao MPP<sup>+</sup>, e que o G15 (o antagonista selectivo do recetor) inibe a neuroproteção induzida pelo estrogénio. Além disso, observamos que a incubação com G1 foi capaz de promover o aumento da expressão de GDNF em culturas primárias do mesencéfalo, e que a imunodepleção do GDNF impede a proteção induzida pela exposição com G1. Avaliamos também a capacidade do G1 em promover a proteção num modelo MPTP de murganho por análise do número de células positivas para tirosina hidroxilase. Usando testes de comportamento, campo aberto e “grip test”, também avaliámos a capacidade do G1 proteger as funções motoras.

Os resultados obtidos indicam que a ativação deste receptor efectivamente protege a via nigrostriatal face à lesão induzida pela toxina dopaminérgica através de um processo que envolve a regulação da expressão de GDNF. Estes resultados, conjuntamente com o facto do recetor ser um receptor de estrogénio que não medeia efeitos nos órgãos reprodutores, sugere que pode ser usado como uma estratégia alvo designada para proteger a lesão dopaminérgica.

## Palavras-chave

Estradiol, G1, GDNF, GPER, Neuroproteção

# Abstract

Data from both epidemiological studies and studies with experimental models of Parkinson's disease support the notion that oestrogens exert a neuroprotective role in the nigrostriatal pathway. Data from our group (Campos et al. 2012) reveal that oestrogen promotes an up-regulation of GDNF expression which is required for the 17- $\beta$  estradiol-mediated protection of dopaminergic neurons. Moreover, we also showed that in the Parkinson's disease models used in our studies the protection induced by 17- $\beta$  estradiol does not require the activation of intracellular receptors. With the present study we aimed to investigate the role of G-protein-coupled receptor, a membrane associated oestrogen receptor, in the neuroprotection against the dopaminergic lesion induced by MPP<sup>+</sup> (*in vitro*) or MPTP (*in vivo*).

Our results showed that G1, a selective agonist of the receptor, prevented the loss of dopaminergic neurons induced by exposure of midbrain cultures to MPP<sup>+</sup>, and that G15 (a selective antagonist of the receptor) hampered the neuroprotection induced by oestrogen. Furthermore, we observed that incubation with G1 was able to promote an increase of GDNF expression in midbrain primary cultures, and that immunodepletion of GDNF impeded the protection induced by G1 exposure. We evaluated the ability of G1 to promote protection in the MPTP mouse model by analysis the number of tyrosine hydroxylase positive cells. By using the open field test and the grip test we also study the ability of G1 to protect the motor functions.

The results obtained so far indicated that activation of the receptor effectively protects the nigrostriatal pathway from the lesion induced by dopaminergic toxins through a process involving the up-regulation of GDNF expression. This, together with the fact that this receptor is an oestrogen receptor that does not mediate estrogenic responses in reproductive organs, suggests that it can be used as a target in strategies designed to protect against dopaminergic lesion.

# Keywords

Estradiol, G1, GDNF, GPER, Neuroprotection



# Índice

Lista de Figuras-----	xii
Lista de Tabelas-----	xiii
Lista de Abreviaturas-----	xiv
Capítulo 1 -----	1
1. Introdução -----	2
1.1. Doença de Parkinson -----	2
1.1.1. Neuropatologia da Doença de Parkinson -----	2
1.1.2. Etiologia da doença de Parkinson-----	2
1.1.3. Modelos Experimentais da doença de Parkinson -----	4
1.1.4. Diferenças de género na doença de Parkinson -----	6
1.2. Estrogénio e neuroproteção -----	6
1.2.1. E2 e factores neurotróficos -----	7
1.2.2. GDNF-----	8
1.2.3. Estradiol, receptores e vias de sinalização -----	8
1.2.3.1. Receptores de estradiol intracelulares -----	9
1.2.3.2. Receptores membranares de estradiol -----	10
Capítulo 2 -----	13
2. Objetivo -----	14
Capítulo 3 -----	15
3. Material e Métodos-----	15
3.1. Ensaios <i>in vitro</i> -----	16
3.1.1. Cultura primária de neurónios embrionários da <i>substantia nigra</i> -----	16
3.1.2. Estimulação celular -----	17
3.1.2.1. Estudos de viabilidade celular -----	17
3.1.2.2. Ação do GPER na regulação da expressão de GDNF-----	19
3.1.3. Imunocitoquímica -----	19
3.1.3.1. Contagem celular e análise quantitativa -----	20
3.1.4. Western Blot-----	21
3.2. Ensaios <i>in vivo</i> -----	22
3.2.1. Administração de G1 e injeção de MPTP -----	22
3.2.1.1. Campo Aberto -----	22
3.2.1.2. “Grip test” -----	23
3.2.2. Preparação do tecido -----	23
3.2.2.1. Imunohistoquímica-----	24
3.2.2.2. Análise quantitativa e contagem celular -----	24
Capítulo 4 -----	25
4. Resultados-----	26
4.1. Localização do GPER nas células do mesencéfalo ventral-----	26

4.1.1. Localização membranar do GPER -----	27
4.2. A ativação do GPER previne a perda dos neurónios dopaminérgicos mesencefálicos	27
4.3. Vias de sinalização envolvidas na proteção dopaminérgica mediada pelo GPER -----	29
4.4. Regulação da expressão de GDNF por ativação do GPER -----	31
4.5. Papel do GDNF na proteção dopaminérgica induzida pelo G1 -----	32
4.6. Efeito da ativação do GPER na proteção da função motora -----	33
4.7. Lesão dopaminérgica induzida pelo MPTP-----	37
Capítulo 5 -----	40
5. Discussão -----	41
Capítulo 6 -----	44
6. Conclusão e Perspectivas Futuras-----	45
Capítulo 7 -----	46
7. Referências Bibliográficas-----	47

## Lista de Figuras

Figura 1 - Neuropatologia da doença de Parkinson. ....	3
Figure 2 - Representação esquemática de um neurónio dopaminérgico da SN e dos alvos moleculares dos diferentes agentes neurodegenerativos utilizados nos modelos da DP. ....	6
Figura 3 - Representação do domínio estrutural de recetores nucleares. ....	9
Figura 4 - Mecanismo de sinalização mediado pelo estrogénio através do GPER. ....	11
Figura 5 - Representação esquemática do procedimento usado para dissecar a SN de ratos embrionários. ....	17
Figura 6 - Representação esquemática do procedimento experimental usado para o estudo da neuroproteção dopaminérgica mediada pelo GPER. ....	18
Figura 7 - Representação esquemática do procedimento experimental usado no estudo das vias de sinalização envolvidas na neuroproteção promovida pela ativação do GPER. ....	18
Figura 8 - Representação esquemática do procedimento experimental usada no estudo do papel do GDNF na neuroproteção induzida pela ativação do GPER. ....	18
Figura 9 - Representação do sistema de campo aberto. ....	22
Figura 10 - Representação do “grip test”. ....	23
Figura 11 - Imagem representativa de uma imunocitoquímica em células do mesencéfalo ventral marcada para GPER e para o GFAP. ....	26
Figura 12 - Imagem representativa de uma imunocitoquímica em células do mesencéfalo ventral marcada para GPER e para MAP-2. ....	26
Figura 13 - Imagem representativa de uma imunocitoquímica realizada em células do mesencéfalo ventral na ausência de permeabilização celular. ....	27
Figura 14 - A ativação dos recetores GPER protege as células dopaminérgicas da lesão induzida por exposição a MPP <sup>+</sup> ....	28
Figura 15 - Vias de sinalização envolvidas na proteção dopaminérgica mediada pelo GPER. --	30
Figura 16 - Influência dos inibidores das diferentes vias de sinalização na viabilidade dopaminérgica. ....	30
Figura 17 - Regulação da expressão de GDNF por ativação do recetor GPER. ....	31
Figura 18 - Papel do GDNF na neuroproteção dopaminérgica induzida pelo G1. ....	32
Figura 19 - Efeito da ativação do GPER na capacidade de preensão. ....	34
Figura 20 - Distância total percorrida pelos animais. ....	35
Figura 21 - Quantificação do número de elevações em murganhos. ....	36
Figura 22 - Quantificação da velocidade dos murganhos. ....	36
Figura 23 - Imunohistoquímica para a TH <sup>+</sup> na SN em murganhos. ....	37
Figura 24 - Neurónios TH <sup>+</sup> da SN. ....	38

## Lista de Tabelas

Tabela 1 - Inibidores de proteínas usados nos ensaios. ....	19
Tabela 2 - Anticorpos primários e secundários usados na imunocitoquímica. ....	20

# Lista de Abreviaturas

<b>BDNF</b>	Factor neurotrófico derivado do cérebro
<b>cAMP</b>	Monofosfato cíclico de adenosina
<b>COMT</b>	Catecol-O-metiltransferase
<b>DA</b>	Doença de Alzheimer
<b>DAT</b>	Transportador de dopamina
<b>DP</b>	Doença de Parkinson
<b>ER</b>	Receptor de estrogénio
<b>ERK</b>	Cinase reguladora de sinal extracelular
<b>E2</b>	17- $\beta$ Estradiol
<b>GPGR</b>	Receptor de estrogénio acoplado a proteína G
<b>L-DOPA</b>	L-3, 4-di-hidroxifenilalanina
<b>MAO B</b>	Monoamina oxidase B
<b>MAP K</b>	Proteína cinase ativada por mitogénio
<b>MNB</b>	Meio Neurobasal
<b>MPP<sup>+</sup></b>	1-metil-4- <i>fenilpiridina</i>
<b>MPTP</b>	1-metil-4- <i>fenil</i> 1,2,3,6-tetrahidropiridina
<b>TH</b>	Tirosina hidroxilase
<b>PBS</b>	Tampão fosfato salino
<b>PFA</b>	Paraformaldeído
<b>PI</b>	Fosfato de inositol
<b>PI3K</b>	Fosfoinosítido-3 cinase
<b>PKA</b>	Proteína cinase ativada por AMPc
<b>PLC</b>	Fosfolipase C
<b>PQ</b>	Paraquato
<b>SN</b>	<i>Substantia nigra</i>
<b>SNpc</b>	<i>Substantia nigra pars compacta</i>
<b>Temed</b>	Tetrametiletilenediamina
<b>6-OHDA</b>	6-hidroxi-dopamina



# **Capítulo 1**

## **Introdução**

# 1. Introdução

## 1.1. Doença de Parkinson

A doença de Parkinson (DP) é uma patologia neurodegenerativa que se tem tornado mais prevalente nos últimos anos como resultado de um envelhecimento populacional. Trata-se da doença neurodegenerativa mais frequente depois da doença de Alzheimer e afeta mais do que 1% da população com idade acima dos 65 anos (de Rijk *et al.* 1995).

A DP é uma doença neurológica progressiva caracterizada por várias alterações motoras e não motoras. As principais características motoras incluem perda da expressão facial, acinesia, rigidez, tremor de repouso, e alterações posturais e da marcha. Embora a DP seja considerada uma desordem do movimento e os sintomas motores dominem o quadro clínico, os pacientes com a doença apresentam uma variedade de disfunções não motoras. Estes sintomas estão relacionados com os processos patológicos da doença, e alguns podem surgir antes dos sintomas motores. Alguns dos sintomas mais importantes na patologia são a depressão, ansiedade, perturbações do sono, fadiga anormal, deterioração cognitiva, disfunção sexual e perturbações do controlo dos impulsos (Fahn 2003; Jankovic 2008; Massano 2011).

Não existe cura para a DP, nem nenhuma terapêutica demonstrou capacidade para atrasar a progressão da doença, pelo que o tratamento atual é sintomático. Podem ser implementadas terapêuticas não farmacológicas (por exemplo, a fisioterapia) ou fármacos. Os fármacos utilizados atualmente são a levodopa (L-DOPA), associada a inibidores da dopa-descarboxilase, agonistas dopaminérgicos, como a apomorfina, inibidores da monoamina oxidase B (MAO-B), inibidores da catecol-orto-metil-transferase (COMT), como o tolcapone e entacapone, anticolinérgicos e moduladores do glutamato. Entre estas alternativas farmacológicas a mais usada é a L-DOPA. Além de ser metabolizada pela descarboxilase dos aminoácidos aromáticos, a L-DOPA é também metabolizado pela catecol-O-metiltransferase (COMT) para formar 3-O-metildopa. O uso de um inibidor da COMT em conjunto com a L-DOPA pode prolongar o tempo de semivida desta sem aumentar o pico de concentração no plasma, e assim prolongar a ação de cada dose de L-DOPA (Fahn 2003; Lim 2005; Müller 2012).

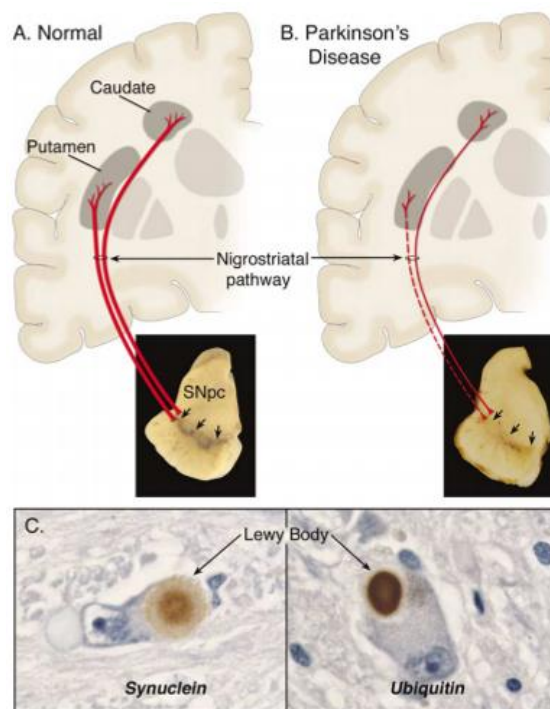
### 1.1.1. Neuropatologia da Doença de Parkinson

Neuropatologicamente a DP caracteriza-se pela perda progressiva e em massa dos neurónios dopaminérgicos da *substantia nigra pars compacta* (SNpc) e pela presença de inclusões

citoplasmáticas constituídas por agregados de  $\alpha$ -sinucleína denominadas corpos de Lewy nos neurónios dopaminérgicos restantes (Dickson 2012).

O corpo celular dos neurónios envolvidos nesta patologia encontra-se na *substantia nigra (SN)* e têm axónios que se projetam para o caudato-putamen onde se dá uma depleção de dopamina em consequência da degeneração dos terminais dopaminérgicos (Dauer e Przedborski 2003; Ferrer 2011; Dickson 2012). Uma vez que a via nigroestriatal contém grandes quantidades de neuromelanina (Double e Halliday 2006; Wakabayashi *et al.* 2006), a perda destes neurónios induz a despigmentação da *SNpc* característica desta patologia (Figura 1).

Embora os corpos de Lewy constituam uma característica patológica da DP, não são específicos desta doença surgindo também noutras patologias como a doença de Alzheimer (Arai *et al.* 1992; Serrano-Pozo *et al.* 2011). Na DP são observados corpos de Lewy na *SNpc* e também em outras regiões do cérebro tal como o córtex cerebral, núcleo amigdalóide, no tálamo e no núcleo olfativo (Braak *et al.* 2003; Michotte 2003; Wakabayashi *et al.* 2006).



**Figura 1** - Neuropatologia da doença de Parkinson. Representação esquemática da via nigroestriatal normal (A) e característica da doença de Parkinson (B). Imunohistoquímica dos corpos de Lewy na *SNpc* (C). Adaptado de (Dauer e Przedborski 2003).

### 1.1.2. Etiologia da doença de Parkinson

A etiologia da DP permanece desconhecida. Porém, existem evidências que apontam para a importância de fatores genéticos e ambientais para o desenvolvimento desta patologia (Olanow e Tatton 1999). Foram já identificados vários genes associados à doença assim como diversas causas extrínsecas, ambos relacionados com a alteração de proteínas, stress oxidativo e stress mitocondrial, processos que estão interrelacionados (Schapira 2009).

Os genes que codificam as proteínas  $\alpha$ -sinucleína, parkina, ubiquitina C-terminal hidroxilase L1, DJ-1, PINK-1, LRRK2 foram associados ao desenvolvimento de formas genética da DP (Savitt 2006).

Mutações no gene que codifica a  $\alpha$ -sinucleína estão associadas a uma forma autossômica dominante da DP enquanto que as mutações no gene que codifica a parkina estão associadas a uma forma autossômica recessiva da patologia (Houlden e Singleton 2012).

Os fatores ambientais que têm vindo a ser mais associados com esta doença são os pesticidas. Algumas toxinas também têm sido associadas ao aparecimento desta patologia. O 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) é um sub-produto da síntese química de um análogo de meperidina que induz síndrome de Parkinson em humanos (Langston *et al.* 1983; Przedborski *et al.* 2001). Uma vez metabolizado a 1-metil-4-fenilpiridina (MPP<sup>+</sup>), o composto ativo, inibe o complexo I da cadeia respiratória mitocondrial (Singer e Ramsay 1990; Przedborski *et al.* 2001) tal como o rotenona (Greenamyre *et al.* 2003).

### 1.1.3. Modelos Experimentais da doença de Parkinson

Os modelos animais para a DP são fundamentais pois permitem o estudo dos mecanismos patogénicos da doença assim como de diferentes abordagens terapêuticas. Estes modelos permitem simular as características da patologia, simulando as mudanças patológicas, histológicas, bioquímicas e distúrbios funcionais. No entanto, a DP não se manifesta espontaneamente nos animais tornando-se necessário a indução da doença através da administração de agentes neurotóxicos. As neurotoxinas dopaminérgicas mais estudadas são toxinas irreversíveis como o MPTP, a 6 - hidroxidopamina (6-OHDA), a Rotenona e o Paraquato (PQ) (Blesa *et al.* 2012). A Figura 2 representa o mecanismo de ação destas toxinas.

- MPTP - O MPTP é uma neurotoxina capaz de produzir mudanças neuropatológicas semelhantes às que ocorrem na DP como stress oxidativo, formação de espécies reativas de oxigénio e inflamação, embora raramente provoque a formação de corpos de Lewy (Blesa *et al.* 2012). Esta toxina é altamente lipofílica e após administração atravessa rapidamente a barreira hemato-encefálica. Uma vez no cérebro é transformada no seu metabolito ativo MPP<sup>+</sup>

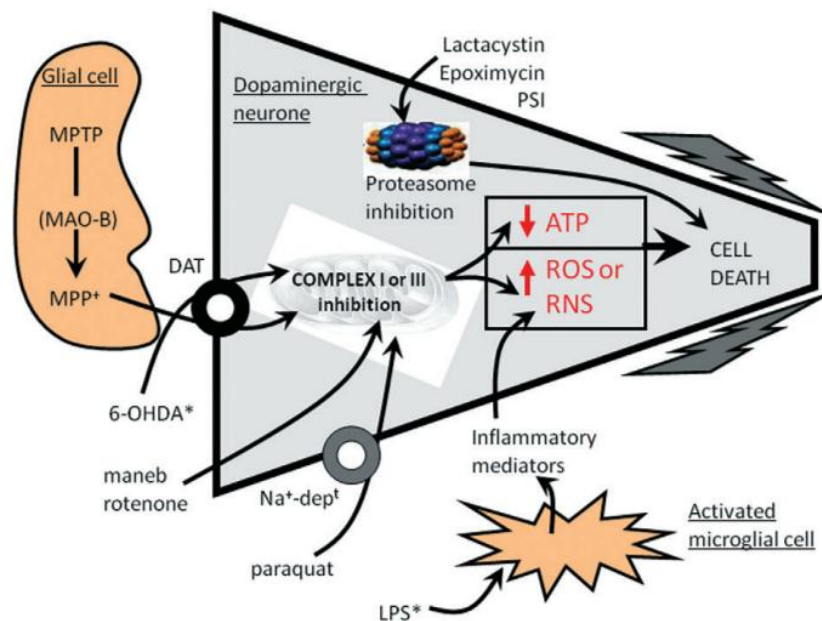
sendo depois transportado para os neurónios dopaminérgicos através do transportador membranar da dopamina. Nestes neurónios bloqueia a atividade do complexo I mitocondrial, levando à produção de espécies reativas de oxigénio (Blandini e Armentero 2012) com consequente morte apoptótica das células (Kitamura *et al.* 2000).

- 6-OHDA - A 6-OHDA é uma neurotoxina frequentemente usada para provocar lesão unilateral. Este composto não passa a barreira hemato-encefálica o que exige uma injeção directamente na via nigroestriatal. Apesar deste inconveniente, trata-se de um modelo muito apelativo porque no modelo unilateral cada animal pode servir de seu próprio controlo uma vez que existe um lado lesionado e um lado não lesionado (Deumens *et al.* 2002; Blesa *et al.* 2012). Embora tenha uma estrutura similar à dopamina possui um grupo hidroxilo adicional que faz com que seja tóxico para os neurónios dopaminérgicos (Przedborski *et al.* 2001; Blesa *et al.* 2012). A 6-OHDA destrói os neurónios catecolaminérgicos pela produção de espécies reativas de oxigénio como peróxido de hidrogénio, radical superóxido e radical hidroxilo (Bové e Perier 2012). Esta toxina tal como o MPTP não produz inclusões citoplasmáticas.

- Paraquato - O PQ é um herbicida amplamente usado na agricultura que possui uma estrutura semelhante ao MPP<sup>+</sup> mas que tem a capacidade de atravessar a barreira hemato-encefálica (Shimizu *et al.* 2001). O PQ exerce o seu efeito neurodegenerativo através do ciclo oxidativo pela produção de espécies reativas de oxigénio danificando lípidos, proteínas, ácido desoxirribonucleico (ADN) e ácido ribonucleico (ARN). Este herbicida é capaz de induzir aumentos da proteína  $\alpha$ -sinucleína especificamente na *SNpc* (Manning-Bog 2001; Blesa *et al.* 2012) assim como morte das células dopaminérgicas quando injetado sistemicamente em ratos o que favorece o uso do PQ para estudar o papel da  $\alpha$ -sinucleína na doença (Brooks *et al.* 1999).

- Rotenona - A rotenona é um pesticida altamente lipofílico que atravessa rapidamente a barreira hemato-encefálica. A exposição crónica a baixas doses resulta na degeneração seletiva da via nigroestriatal por inibição da cadeia de transporte de eletrões mitocondrial (Cannon e Greenamyre 2010).

- Modelos genéticos - A maioria dos casos da doença de Parkinson acontecem de forma idiopática e poucos são os casos de origem genética. No entanto, existem mutações em diferentes genes associadas à DP, tal como a LRRK2 ou a  $\alpha$ -sinucleína (Dawson *et al.* 2010). Estes modelos recorrem ao uso de murganhos transgénicos ou de *Drosophila*, que sobre-expressam a forma nativa ou expressam a forma mutada das proteínas (Betarbet *et al.* 2002; Dawson *et al.* 2010).



**Figure 2** - Representação esquemática de um neurônio dopaminérgico da SN e dos alvos moleculares dos diferentes agentes neurodegenerativos utilizados nos modelos da DP. Adaptado de (Duty e Jenner 2011).

#### 1.1.4. Diferenças de género na doença de Parkinson

A incidência da DP é maior em homens do que em mulheres (Olanow e Tatton 1999; Van Den Eeden 2003; Wooten 2004; Haaxma *et al.* 2007; Miller e Cronin-Golomb 2010). Existe uma diferença significativa na progressão dos sintomas entre géneros sendo os sintomas mais severos nos homens (Scott *et al.* 2000). A correlação entre o estrogénio, o número de filhos, o período fértil, a idade da menopausa e a DP atribui ao estrogénio um papel protetor face à doença (Miller e Cronin-Golomb 2010). Alguns estudos têm mostrado diferenças de desenvolvimento e funcionais do sistema nigrostriatal com hormonas sexuais em homens e mulheres. Estudos realizados em ratos apontam para diferenças de género na função dopaminérgica quer a nível da libertação de dopamina nos terminais dopaminérgicos, quer em relação à densidade dos terminais (Becker 1999; Walker *et al.* 1999). Adicionalmente, outros estudos sugerem que o estrogénio influencia a patogenicidade da doença e ajuda a explicar a reduzida incidência da DP na mulher (Miller *et al.* 1998; Green e Simpkins 2000).

## 1.2. Estrogénio e neuroproteção

A estrutura básica das moléculas de esteróides, entre os quais o estradiol, a estrona e o estriol, é composta por 3 anéis de 6 carbonos junto de um anel de 5 carbonos. O 17 $\beta$ -estradiol (E2) é formado a partir da testosterona por aromatização do anel do carbono por ação de uma

aromatase encontrada nas células granulosas do ovário, células de Sertoli e células de Leydig (Laurence L. *et al.* 2008).

A estrona, o estriol, e o 17 $\alpha$ -estradiol apresentam menor afinidade para os recetores de estrogénio do que o E2. Vários estudos mostram a ação neuroprotetora dos estrogénios. Sabe-se que a estrona tem efeitos benéficos contra as lesões induzidas pelo FeCl<sub>2</sub>, o péptido  $\beta$ -amilóide, o n-metil-D-aspartato, a privação de glucose, entre outros (Goodman *et al.* 1996; Bae *et al.* 2000; Kajta e Lasoñ 2000). O estriol tem-se revelado benéfico contra a privação de glucose, o péptido  $\beta$ -amilóide, n-metil-D-aspartato e toxicidade do glutamato (Goodman *et al.* 1996; M. kajta 2001). O 17 $\alpha$ -estradiol possui um papel neuroprotetor significativo que parece advir da capacidade de inibir a apoptose (Simpkins *et al.* 2005; Rong *et al.* 2012), da redução do stress oxidativo (Simpkins *et al.* 2005; Liu *et al.* 2011), da modulação da atividade das células da glia (Arevalo *et al.* 2010) e da indução da expressão dos fatores neurotróficos (Numakawa *et al.* 2011; Campos *et al.* 2012). O estradiol tem revelado efeito neuroprotetor, tanto *in vitro* como *in vivo*, face a insultos tóxicos e mostrou ser vantajoso para várias desordens neuronais, tais como a DA, DP, acidente vascular cerebral e isquemia cerebral (Garcia-Segura *et al.* 2001)

### 1.2.1. E2 e factores neurotróficos

O E2 atua no cérebro por uma variedade de mecanismos: regula a transcrição em neurónios por ativação de recetores nucleares e regula mecanismos que desencadeiam a ativação de recetores membranares ligados à regulação de cinases ou de segundos mensageiros, tais como AMPc ou o Ca<sup>2+</sup> (Aronica *et al.* 1994; Carrer *et al.* 2003). Esta variedade de mecanismos de ação do estradiol no cérebro é acompanhada por uma grande diversidade de efeitos na sobrevivência neuronal, proliferação glial, plasticidade neuronal, função cognitiva, memória e comportamento. Tal como em outros tecidos, alguns dos efeitos do E2 no cérebro podem não ser directos e resultar da ação de factores neurotróficos (Ivanova *et al.* 2002; Quesada *et al.* 2008; Luine e Frankfurt 2012). Sabe-se que o E2 regula os níveis do factor neurotrófico derivado do cérebro (BDNF, do inglês brain-derived neurotrophic factor) no córtex, na amígdala e no hipocampo (Sohrabji e Lewis 2006) e ainda que regula os níveis do factor de crescimento nervoso (NGF, do inglês nerve growth factor) no córtex (Sohrabji *et al.* 1994). Adicionalmente, o E2 também promove o aumento dos níveis de mRNA e do factor neurotrófico derivado das células da glia (GDNF, do inglês glial cell line-derived neurotrophic factor) *in vitro* (Ivanova *et al.* 2002) e *in vivo* (Campos *et al.* 2012).

A co-localização de recetores de estrogénio e de factores neurotróficos sugere que estas moléculas podem agir em conjunto na regulação da expressão de genes específicos que promovem a sobrevivência neuronal (Toran-Allerand *et al.* 1992; Sohrabji e Lewis 2006).

### 1.2.2. GDNF

O GDNF foi originalmente identificado e purificado a partir do meio condicionado da linha celular B49. Trata-se de um homodímero glicosilado e ligado por uma ponte dissulfureto, com um peso molecular de 33 a 45 kDa após desglicosilação enquanto o monómero tem um peso de 16 kDa após desglicosilação (Saavedra *et al.* 2008). O GDNF é o membro fundador da família de factores neurotróficos do GDNF que inclui três membros estruturalmente relacionados: neurturina (Kotzbauer *et al.* 1996), persefina (Milbrandt *et al.* 1998) e artemina (Baloh R.H. 1998). A ação do GDNF é mediada através da ativação da família dos recetores de GDNF (GFR) $\alpha$ , um complexo composto por um recetor transmembranar com atividade de cinase de resíduos de tirosina, o Ret, e um membro da proteína glicosilfosfatidilinositol (GPI) ancorada a proteínas de superfície, o GFR $\alpha$ . Existem 4 membros deste grupo GFR $\alpha$  já identificados (GFR $\alpha$ 1-4). A ligação do GDNF ocorre preferencialmente ao GFR $\alpha$ 1. A ligação do GDNF ao recetor depende do GFR $\alpha$  enquanto que a sinalização intracelular é mediada pelo Ret (Sariola e Saarma 2003). O Ret ativa várias cascatas de sinalização intracelular: a via das proteínas cinases ativadas por mitogénios (MAPK), a via da fosfotidilinositol-3 cinase (PI3K) e via da fosfolipase C $\gamma$  (PLC) (Sariola e Saarma 2003). Em células que não expressam Ret, existem vias de sinalização independentes do ret, nas quais o GDNF desencadeia a ativação da família Src cinase, fosforilação da ERK/MA K, fosfolipase C $\gamma$ , factor de transcrição CREB e indução da Fos. Por outro lado, a sinalização do GDNF também pode ocorrer através de moléculas neuronais de adesão celular (Sariola e Saarma 2003).

O GDNF está expresso em diferentes regiões do cérebro, bem como em tecidos periféricos sugerindo que pode apresentar ações múltiplas. No sistema nervoso de rato, encontra-se na SN, no tálamo, cerebelo, córtex e estriado (Trupp M. 1997).

Este factor neurotrófico parece ter um papel importante durante o desenvolvimento do sistema nigroestriatal dopaminérgico e perturbações que provoquem um ligeiro défice de GDNF pode comprometer a sobrevivência dopaminérgica na idade adulta (Saavedra *et al.* 2008).

Os efeitos do GDNF e o seu valor terapêutico têm sido extensivamente estudados em modelos animais da DP e de forma consistente tem-se observado proteção dos neurónios dopaminérgicos por este péptido (Arenas *et al.* 1995; Tseng *et al.* 1997; Campos *et al.* 2012).

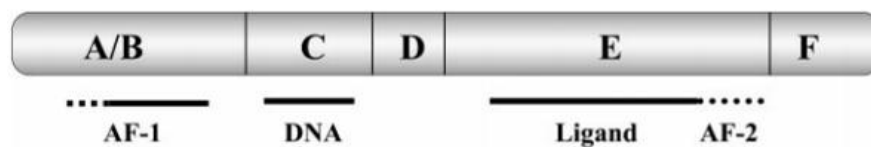
### 1.2.3. Estradiol, receptores e vias de sinalização

Classicamente, a atividade transcricional do estrogénio é mediada pela ativação de dois receptores nucleares diferentes: recetores de estradiol  $\alpha$  e recetores de estradiol  $\beta$  que

ativam ou reprimem a transcrição de genes alvo (Morissette *et al.* 2008). Adicionalmente, o estradiol pode mediar uma sinalização mais rápida que não envolve a interação com o ADN mas a ativação de recetores membranares tal como, recetores acoplados a proteína G (GPCR, do inglês G protein coupled receptors) (McEwen 2002).

### 1.2.3.1. Receptores de estradiol intracelulares

Os recetores de estradiol intracelulares são expressos no cérebro apresentando distribuição diferencial. Os recetores de estradiol  $\alpha$  encontram-se predominantemente localizados no núcleo hipotálamo ventromedial e na amígdala (Laflamme *et al.* 1998; Shughrue 1998; Gillies e McArthur 2010). Por outro lado, os recetores de estradiol  $\beta$  estão maioritariamente presentes no córtex cerebral, no núcleo dorsal de rafe, no hipocampo, no cerebelo e na SN (Laflamme *et al.* 1998; Handa *et al.* 2012).



**Figure 3** - Representação do domínio estrutural de recetores nucleares. O domínio A/B ou NH<sub>2</sub> terminal contém o local AF-1 onde interagem os factores de transcrição; o domínio C/D contém o domínio em dedos de zinco, estrutura que liga ao ADN; o domínio C/F contém o local de ligação ao ligando bem como o domínio AF-2 que interage diretamente com os péptidos co-ativadores. Adaptado de (Nilsson *et al.* 2001).

Estes recetores são constituídos por 3 domínios funcionais independentes mas que interagem entre si: o terminal NH<sub>2</sub> ou domínio A/B, o domínio C ou domínio de ligação ao ADN e o domínio D,E,F ou domínio de interação com o ligando (Figura 4) (Nilsson *et al.* 2001). Na ausência de ligando, o recetor de estradiol intranuclear existe como um monómero (estado inativo) e forma um complexo multiproteico com chaperonas (proteínas de choque térmico como a HSP-90). A ativação do recetor pelo E2 induz a fosforilação de vários resíduos distintos de serina/treonina induzindo a dissociação da HSP-90. O recetor assim ativado pode interagir com sequências específicas de ADN nas regiões promotoras dos genes alvo regulando a transcrição genética (Nilsson *et al.* 2001; Marino *et al.* 2006; Morissette *et al.* 2008).

O E2 ativa os recetores de estradiol que medeiam a sinalização intracelular através de duas vias: a via da proteína cinase ativada por mitogénio (MAP K) e a via da fosfatidilinositol-3 cinase (PI3K/Akt). O recetor pode interagir diretamente com a via MAP K através da ativação sequencial da proteína Ras, Raf, MAP K/ERK ou MAP K (ERK1/2) resultando na ativação de uma grande variedade de fatores de transcrição envolvidos na sobrevivência neuronal (Dhandapani e Brann 2002). Por outro lado, também pode interagir com a via de sinalização

PI3K levando à ativação da proteína efetora Akt, também conhecida por proteína cinase B. A ativação da proteína Akt pode modular a expressão de proteínas que influenciam a morte celular, tais como inibidores de apoptose como a Bcl-2 ou indutores de apoptose como a Bad ou a Bax. A fosforilação da cinase I $\kappa$ B pela Akt leva à ativação de fatores de transcrição como o NF $\kappa$ B que inibem a apoptose (Chong *et al.* 2005). Similarmente, a fosforilação da caspase 9 pela Akt bloqueia a apoptose induzida por esta caspase (Brunet *et al.* 1999). Assim, estes recetores encontram-se intimamente ligados à modulação da sobrevivência neuronal

### 1.2.3.2. Receptores membranares de estradiol

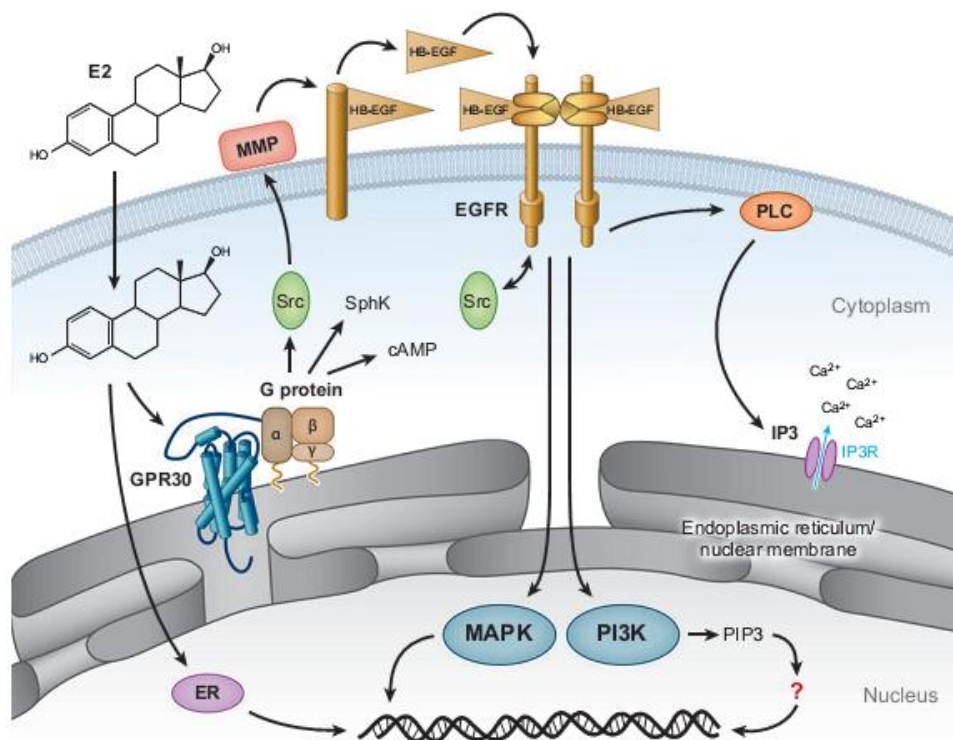
Outra forma de sinalização pelo estradiol envolve a ativação de vias de sinalização intracelulares que são tradicionalmente ligadas a recetores de fatores de crescimento e a recetores de estrogénio acoplados a proteína G, GPER, um recetor envolvido na ativação celular mediada pelo estradiol na ausência de recetores nucleares (Filardo *et al.* 2000).

A expressão de mRNA de GPER foi encontrada no útero e no epitélio da glândula da mama (Prossnitz *et al.* 2008) mas Otto, *et al.* mostraram que o desenvolvimento dos órgãos reprodutores em ratos com depleção de GPER ocorre normalmente; que a ausência do GPER não influencia a fertilidade em machos ou fêmeas e por último que a resposta ao estrogénio no útero e na glândula mamária é mantida na ausência do recetor (Otto *et al.* 2008); o que sugere que o GPER não influencia a sinalização mediada pelo estrogénio nos órgãos reprodutores. Como recetor de estrogénio não feminizante e com capacidades neuroprotectoras, o GPER é uma promissora estratégia para promover os efeitos protetores do E2.

O GPER possui 7 hélices transmembranares e está associado a uma ação rápida mediada pelo estradiol. Mas até à data, a localização subcelular deste recetor permanece controversa. Vários estudos demonstraram a localização membranar do recetor (Thomas 2004; Funakoshi *et al.* 2006; Filardo *et al.* 2007). Por outro lado, outros mostraram a presença deste no retículo endoplasmático (Revankar *et al.* 2005; Moriarty *et al.* 2006; Otto *et al.* 2008) e outros ainda referem a existência deste recetor no complexo de Golgi (Sakamoto *et al.* 2007).

O estradiol para além de promover a capacidade de transcrição de genes de uma forma dependente dos recetores clássicos, desencadeia também uma variedade de sinalização que inclui a mobilização do cálcio intracelular (Improta-Brears *et al.* 1999), produção de cAMP (Aronica *et al.* 1994), produção de fosfato inositol (PI) (Lieberherr *et al.* 1993), ativação de proteínas mitogénias ativadas por MAP K, ERK1 e ERK2 (Endoh *et al.* 1997). Face à rapidez com que estes mediadores são ativados presume-se que esta sinalização seja iniciada na membrana plasmática e que não envolva a ativação de recetores intracelulares clássicos. A ativação do GPER através da ligação do E2 é capaz de ativar diversas vias de sinalização. A ativação da via das MAP K Erk1/2 através do GPER tem sido verificada em diversos estudos (He *et al.* 2009; Chimento *et al.* 2010; Ruan *et al.* 2012; Viñas e Watson 2013). Filardo, Quinn

et al. também mostraram a ativação da via da adenil ciclase pelo GPER (Filardo *et al.* 2002). A via PI3K é tradicionalmente ativada na membrana plasmática em resposta a recetores de fatores de crescimento ou estímulos de recetores acoplados a proteína G, como o GPER resultando na acumulação de PIP3 na membrana plasmática e na consequente ativação da cinase Akt. Por último, este recetor é capaz, embora de forma indireta, de ativar recetores de fatores de crescimento epidérmicos que levam à ativação de múltiplos alvos como a MAP K ou a PI3K, mas também da PLC. A ativação da PLC induz a mobilização do cálcio intracelular através do inositol trifosfato (IP3). Na Figura 5 estão representados de forma esquemática os mecanismos de sinalização mediados pelo estrogénio através do GPER (Prossnitz *et al.* 2008).



**Figura 4** - Mecanismo de sinalização mediado pelo estrogénio através do GPER. O estrogénio entra livremente na célula acedendo aos receptores de estrogénio intracelular (ER e GPER). Nas células que expressam o GPER à superfície celular, o estrogénio não precisa de atravessar a membrana plasmática. A ligação de agonistas selectivos do GPER ativam este receptor que por sua vez pode ativar vários efectores, incluindo a Adenil ciclase (resultando na produção de cAMP, Src e SphK). As duas últimas vias parecem estar envolvidas na ativação de metaloproteinasas da matriz (MMP) que cliva o pró-HB-EGF, libertando HB-EGF que pode ativar o receptor de factor de crescimento epidérmico (EGFR). A ativação do EGFR conduz a vários eventos a jusante, incluindo a ativação da fosfolipase C, proteínas cinases ativadas por mitogénios (MAPKs) e fosfatidilinositol 3 cinase (Adapatado de (Prossnitz *et al.* 2008).

O papel neuroprotetor do E2 via ativação do recetor GPER tem vindo a ser observado em diversos estudos quer *in vitro* quer *in vivo*. Em cultura de neurónios corticais, o recetor tem a capacidade de atenuar a apoptose induzida pela exposição a um insulto oxidativo assim como regular os níveis de proteínas ligadas à apoptose, tais como, Bcl-2 e pro-caspase 3 (Liu *et al.*

2011). Adicionalmente, Bourque, *et al.*, mostraram que o tratamento com o agonista seletivo do recetor GPER (G1) é tão eficaz como o E2 em manter as concentrações de dopamina, assim como de dois transportadores específicos de dopamina em murganhos expostos a MPTP. Adicionalmente, o estudo mostra que o antagonista seletivo do recetor em análise (G15), antagoniza completamente o efeito neuroprotetor induzido pela estimulação com G1 no estriado e na SN, bem como a proteção do E2 no corpo estriado e parcialmente na SN (Bourque *et al.* 2013).

## **Capítulo 2**

### **Objetivo**

## 2. Objetivo

A ação neuroprotetora do estradiol, assim como a capacidade de regular a expressão de fatores neurotróficos tem vindo a ser descrita em diversos artigos. Resultados anteriores do nosso grupo mostraram que a utilização de estradiol conjugado a albumina sérica bovina, um complexo incapaz de atravessar a membrana plasmática, era capaz de proteger os neurónios dopaminérgicos da ação de toxinas como a 6-OHDA. Por outro lado, verificámos também que a proteção dos neurónios dopaminérgicos exercida pelo estradiol não depende de recetores intracelulares. Estes resultados sugerem que os recetores membranares do estradiol podem desempenhar um papel importante na proteção dopaminérgica.

O principal objectivo deste trabalho consiste em averiguar se o GPER está envolvido na neuroproteção dopaminérgica mediada pelo estradiol.

Com este trabalho pretendemos:

- Avaliar a proteção dopaminérgica induzida pela ativação do GPER em culturas embrionárias do mesencéfalo ventral.
- Avaliar a capacidade do GPER regular a expressão de GDNF.
- Em caso positivo para os dois últimos objectivos, perceber se a proteção dopaminérgica acontece através da regulação da expressão de GDNF.
- Finalmente, averiguar num modelo animal da Doença de Parkinson, se a ativação do GPER se traduz em proteção funcional.

# **Capítulo 3**

## **Material e Métodos**

## 3. Material e Métodos

### Animais

Todas as experiências realizadas com animais foram executadas em conformidade com a convenção europeia da proteção dos animais vertebrados usadas para experiências e outros propostos científicos (Diretiva 2010-63 UE).

Todos os animais foram mantidos à temperatura de 22°C, com 12h de luz/ 12h de escuridão e com comida e água *ad libitum*.

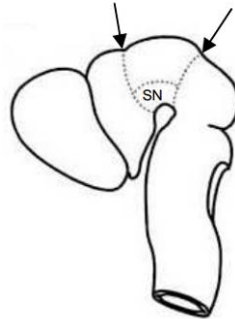
### 3.1. Ensaios *in vitro*

#### 3.1.1. Cultura primária de neurónios embrionários da *substantia nigra*

Os neurónios mesencéfalo ventral de ratos foram obtidos a partir de embriões de ratos Wistar com 15-16 dias de gestação. A fêmea grávida foi anestesiada com quetamina (87,5 mg/kg) e xilazina (12,5mg/kg). A cavidade abdominal foi aberta e os embriões retirados. Os embriões foram colocados numa caixa de petri com PBS (NaCl 140 mM, KCl 2,7 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5 mM e Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8,1 mM, pH 7,4) estéril e frio. De modo a assegurar a morte da fêmea foi feito um corte no coração.

Em cada embrião procedeu-se à dissecação do mesencéfalo ventral de acordo com o ilustrado na Figura 5. O tecido dissecado foi transferido para uma solução de digestão (tripsina 4,5mg/mL e DNase 2,5mg/mL diluídos em PBS) e incubado a 37°C durante 5 minutos. Para parar a digestão enzimática, a suspensão foi centrifugada (3K18C Bioblock Scientific; Sigma Laboratory Centrifuges) durante 1 minuto a 700 rpm e após remoção do sobrenadante, o sedimento foi ressuspenso numa solução de PBS com 10% de soro. O sedimento foi mecanicamente dissociado em PBS e centrifugado (1500 rpm/3 minutos). As células foram ressuspenso em Meio Neurobasal (MNB) (Gibco) suplementado com 2% B27 (Gibco), 0,05 µg/mL de glutamina (sigma), 50 µg/mL de gentamicina (Sigma) e 25 µM glutamato (Sigma) e em 10% de soro. Para a contagem celular as células foram diluídas (1:1) com azul de tripano (0,4% em NaCl 0,9%) e as células viáveis foram contadas usando uma câmara de Neubauer.

Por fim, as células foram cultivadas em placas de cultura previamente revestidas com poli-D-lisina (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) a uma densidade de  $0,8 \times 10^6$  células/ $3,85 \text{ cm}^2$  ou  $0,4 \times 10^6$  células/ $1,93 \text{ cm}^2$ . A cultura foi mantida a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  numa atmosfera com 5% de  $\text{CO}_2$  e 95% de ar atmosférico durante 6 dias.

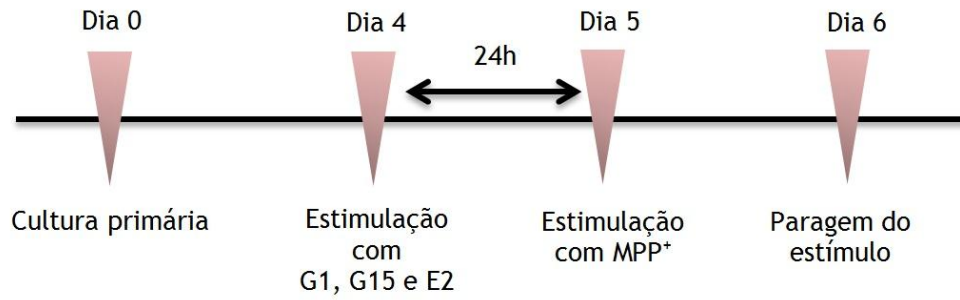


**Figura 5** - Representação esquemática do procedimento usado para dissecar a SN de ratos embrionários. Adaptado de (Dunnett *et al.* 1999).

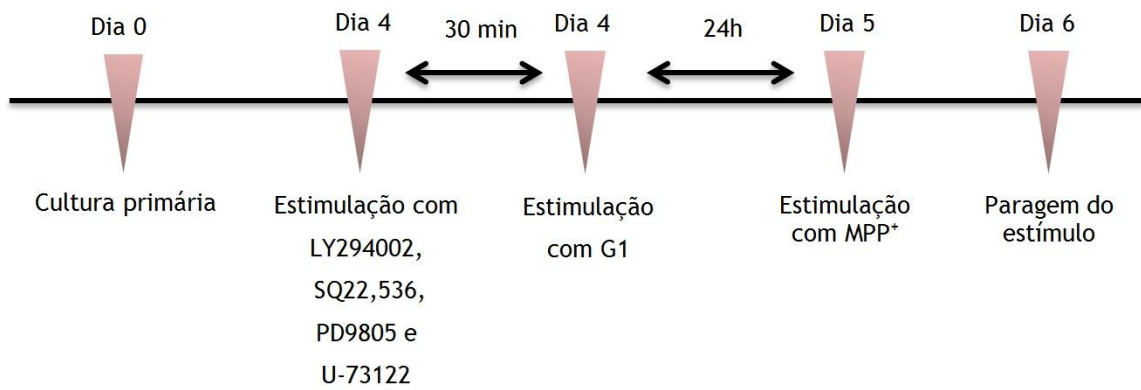
### 3.1.2. Estimulação celular

#### 3.1.2.1. Estudos de viabilidade celular

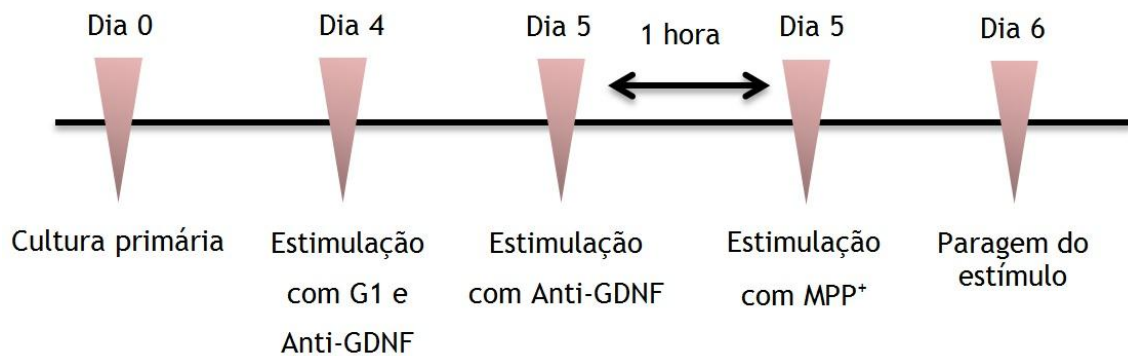
Doze horas antes da estimulação celular o meio foi substituído por MNB sem soro. A cultura foi incubada com 17-B estradiol (100nM), G1 (100nM, Calbiochem) e G15 (100nM, Calbiochem) por um período total de 48 horas, no qual as células foram estimuladas com  $\text{MPP}^+$  (10  $\mu\text{M}$ ) nas últimas 24 horas. Quando utilizados, os inibidores das vias de sinalização LY 294002, SQ 22,536, PD98059 e U-73122 foram adicionados 30 minutos antes do estímulo com G1. Para a neutralização do GDNF a cultura foi incubada com anti-GDNF (0,4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; Santa Cruz Biotechnology) 30 minutos antes incubação com o agonista e 1 hora antes da lesão com  $\text{MPP}^+$ . O estímulo terminou com a remoção do meio e com uma lavagem com PBS. Os passos experimentais estão representados na Figura 6, 7 e 8. Na tabela 1 estão indicadas as concentrações usadas de cada inibidor.



**Figura 6** - Representação esquemática do procedimento experimental usado para o estudo da neuroproteção dopaminérgica mediada pelo GPER.



**Figura 7** - Representação esquemática do procedimento experimental usado no estudo das vias de sinalização envolvidas na neuroproteção promovida pela ativação do GPER.



**Figura 8** - Representação esquemática do procedimento experimental usada no estudo do papel do GDNF na neuroproteção induzida pela ativação do GPER.

**Tabela 1** - Inibidores de proteínas usados nos ensaios.

Proteína alvo	Inibidor	Concentração	Empresa
Adenil Ciclase	SQ 22,536	0,1mM	Sigma Aldrich
PI3K	LY 294002	25µM	Calbiochem
MAP cinase	PD98059	50µM	Calbiochem
PLC	U-73122	10nM	Sigma

### 3.1.2.2. Ação do GPER na regulação da expressão de GDNF

Doze horas antes do início do estímulo o meio celular foi substituído por MNB sem soro. Para determinar o aumento da proteína GDNF as células foram estimuladas com (E2), G1 e G15 durante 48 horas. Finalizado o tempo de incubação o meio de estimulação foi removido e foi adicionado tampão de lise (Triton X-100 1%, Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, EGTA 10 mM, NaCl 150 mM) com inibidores de proteases (fluoreto de fenilmetilsulfonilo 2 mM, aprotinina 10 µg/µl, e leupeptina 1µg/µl), inibidor de fosfatases (Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 2 mM) e ortovanadato de sódio). As amostras foram usadas para posterior análise da expressão proteica por Western Blot.

### 3.1.3. Imunocitoquímica

A imunocitoquímica iniciou-se por uma lavagem com PBS e fixação das células com paraformaldeído (PFA) 4% durante 10 minutos. Seguiu-se a permeabilização das células com Triton X-100 1% em PBS durante 5 minutos. Para o estudo da localização celular do recetor este passo não foi efetuado. As ligações não específicas foram bloqueadas por incubação das células com 20% de soro 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 1% soro, de acordo com a tabela 1, durante 1 hora à temperatura ambiente. Após este passo as lamelas foram lavadas seis vezes com PBS-T durante 15 minutos. O anticorpo secundário correspondente foi também diluído em PBS-T com 1% FCS e as lamelas incubadas 1 hora à temperatura ambiente. Depois da incubação com o anticorpo secundário as células foram lavadas uma vez com PBS-T e incubadas 10 minutos com Hoescht 2mM (Invitrogen, CA, USA). Por fim, as lamelas foram lavadas seis vezes com

PBS-T. Seguiu-se a montagem em meio de montagem para fluorescência (DAKO, Glostrup, Denmark). As imagens foram adquiridas num microscópio de epifluorescência Zeiss Axio (Axiobserver Z1, Zeiss) com uma objectiva 63x.

**Tabela 2** - Anticorpos primários e secundários usados na imunocitoquímica.

Proteína	Anticorpo Primário	Diluição	Empresa	Anticorpo Secundário	Diluição	Empresa
TH	Policlonal Anti - TH	1:1000	ab112, abcam, Cambridge, USA	Anti - Rato Conjugado com alexa® 488	1:1000	Invitrogen, molecular probes, UK
MAP-2	Anti MAP-2	1:500	20172, Santa Cruz Biotechnology	Anti-Rato Conjugado com alexa® 488	1:1000	Invitrogene, molecular probes
GFAP	Policlonal Anti-GFAP	1:200	Z0334, DAKO, Glostrup, Denmark	Anti-Rato Conjugado com Alexa® 488	1:1000	Invitrogene, molecular probes
GPER	Anti-GPER	1:200	48525 Santa Cruz Biotechnology	Anti-Coelho conjugado com Alexa® 546	1:1000	Invitrogene, molecular probes

### 3.1.3.1. Contagem celular e análise quantitativa

A análise da imunocitoquímica foi realizada em três ou mais preparações diferentes usando 3 lamelas distintas para cada condição. De cada lamela foram fotografados 20 campos (ampliação x63). Os resultados são apresentados como o número médio das células tirosina hidroxilase (TH) positivas em relação ao número total de células estimadas pela marcação com Hoescht.

### 3.1.4. Western Blot

Depois de quantificados os níveis de proteína total presente nos extratos celulares, as proteínas foram desnaturadas por adição de uma solução com 0,5M Tris-HCl, pH 6,8, 10% (w/v) dodecil sulfato de sódio (SDS), 10% glicerol, 140 mM 2-mercaptoetanol, e 0,1% (w/v) azul de bromofenol. As amostras foram ainda aquecidas a 100°C durante 5 minutos.

O volume de extrato proteico que correspondeu a 40µg foi colocado num gel de concentração contendo 4% acrilamida, 0,5 mM Tris-HCl (pH 6,8), 10% SDS, 0,05% persulfato de amoníaco (PSA) e 0,05 de tetrametiletilenediamina (TEMED). As proteínas foram separadas num gel de resolução contendo 12% de acrilamida, 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8), 10% SDS, 0,05% (PSA) e 0,05% TEMED.

As amostras e o marcador de pesos moleculares foram sujeitas a uma voltagem de 160V durante aproximadamente 1 hora, à temperatura ambiente. Na eletroforese foi usado um tampão contendo 960 mM de glicina, 125 mM de Tris e 0,05% de SDS.

Após a eletroforese, o gel de concentração foi removido e o gel de separação foi colocado em tampão CAPS (10% ácido ciclohexilamina propanosulfónico, 10% metanol, pH 11). As proteínas no gel foram transferidas para uma membrana de difluoreto de polivinilideno (PVDF - GE Healthcare, Amersham, UK). Antes da transferência, as membranas de PVDF foram ativadas por imersão em metanol 100% durante 5 segundos, seguidos de 5 minutos em água e 10 minutos em tampão CAPS. A eletrotransferência foi realizada a 750 mA durante aproximadamente 1 hora e 30 minutos e a 4°C.

Terminada a eletrotransferência procedeu-se ao bloqueio das ligações não específicas por incubação numa solução de Tris com 5% de leite (Regilait, France) e 0,1% de Tween 20, durante 1 hora à temperatura ambiente. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas com o anticorpo primário anti-GDNF de coelho (1:500, Santa Cruz Biotechnology) diluído em TBS-T durante a noite a 4°C.

As membranas foram lavadas 3 vezes em TBS-,T durante 15 minutos cada lavagem, e incubadas 1 hora à temperatura ambiente com o anticorpo secundário anti-coelho (1:20000) diluído em TBS-T. Depois de lavadas, as membranas foram expostas ao substrato Luminata TM Crescendo Western HRP e o sinal quimioluminescente foi detetado com filmes hyperfilm-ECL (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg Germany). Os filmes foram digitalizados e a densitometria foi calculada usando o programa QuantityOne.

## 3.2. Ensaaios *in vivo*

### 3.2.1. Administração de G1 e injeção de MPTP

Para o estudo *in vivo* foram usados 22 murganhos adultos C57BL/6 com 10-12 semanas de idade. Durante um período de 5 dias os animais foram adaptados ao manuseamento para evitar situações de stress durante o estudo de comportamento. Os murganhos foram injetados com solução salina ou G1 (5µg/100µL) duas vezes ao dia durante 10 dias consecutivos. No 5º dia, os animais receberam 4 injeções de MPTP (50mg/kg intraperitoneal) com 2 horas de intervalo. Esta dose foi seleccionada de modo a provocar cerca de 60% de perda dos neurónios dopaminérgicos. Foram realizados os testes comportamentais, campo aberto e “grip test” para avaliar a atividade locomotora e os movimentos motores mais finos dos murganhos durante 7 dias.

#### 3.2.1.1. Campo Aberto

Após terminadas as injeções os murganhos foram sujeitos ao teste campo aberto num sistema apropriado (sistema ActiMot, TSE, Bad Homburg, Alemanha). Todos os testes foram realizados entre as 9 horas e as 15 horas de dois em dois dias. Sendo realizadas 4 repetições. Cada murganho é colocado numa caixa apropriada e após um breve período de adaptação (5 minutos) o teste é realizado durante 2 horas com medições da distância percorrida, elevações e velocidade em cada minuto através do número de contagens (interrupções dos feixes de luz infravermelha do equipamento usado).

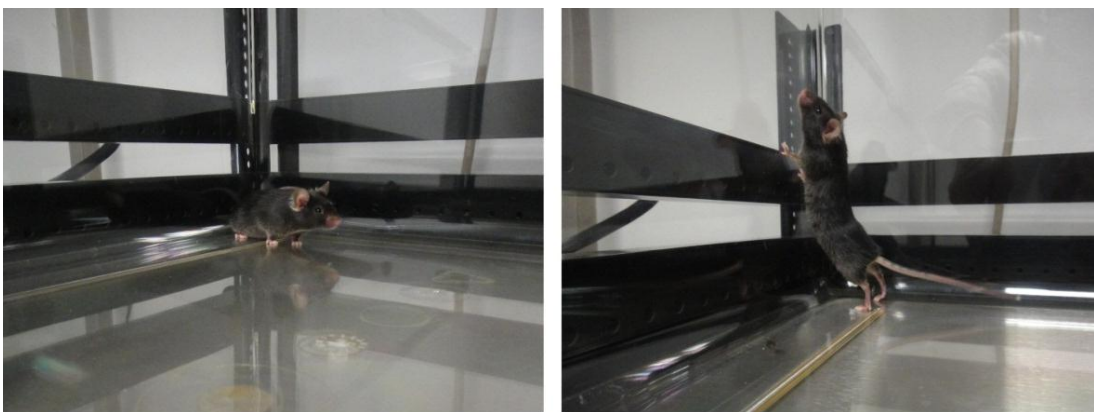


Figura 9 - Representação do sistema de campo aberto.

### 3.2.1.2. “Grip test”

Os murganhos são colocados sob uma grade metálica horizontal de modo a agarrarem a grade. A grade é invertida de modo a que os murganhos fiquem de cabeça para baixo. É contabilizado o tempo total que os animais resistem à queda.

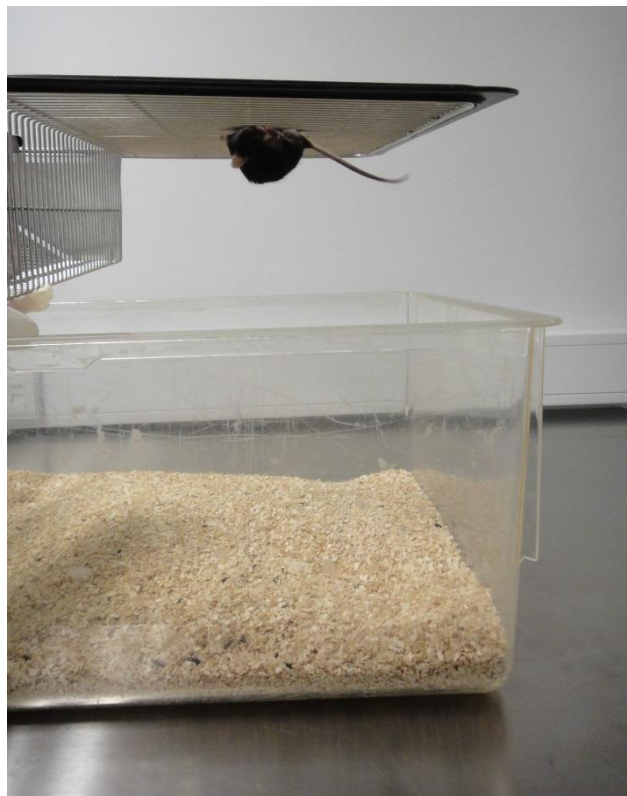


Figura 10 - Representação do “grip test”.

### 3.2.2. Preparação do tecido

Dois dias após ter terminado o estudo de comportamento, os animais foram anestesiados e perfundidos com 20mL de PBS 0,1M para remover o sangue, seguido de perfusão com 20 mL de PFA a 4%. Os cérebros foram removidos e pós-fixados em PFA 4% durante a noite. Após a fixação foram crioprotetidos em sacarose 30% até imersão total. Antes de serem seccionados os cérebros foram embebidos na Solução Ótima de Corte (O.C.T), e foram cortados num crióstato (Leica CM3050S, Leica Microsystems, Nussloch, Alemanha) em secções de 35  $\mu$ m. As fatias correspondentes à SN e ao estriado de cada animal foram colocadas numa placa de 24 poços (BD Biosciences, San Jose, California, USA) com PBS 0,1 M suplementado com 0,12 $\mu$ mol/L de azida de sódio e foram guardadas a 4°C até à realização da imunohistoquímica.

### 3.2.2.1. Imunohistoquímica

A imunohistoquímica iniciou-se com incubação das secções cerebrais em 10mM de citrato de sódio (pH 6) a 80°C. As fatias foram deixadas à temperatura ambiente e colocadas em água durante 5 minutos, após a qual foram lavadas com PBS-T durante 10 minutos. Uma vez lavadas, procedeu-se ao bloqueio das ligações não específicas por incubação numa solução de PBS com 20% soro e Triton-X-100 (0,1%) durante 1 hora e à temperatura ambiente. Terminado o bloqueio foram lavadas duas vezes durante 10 minutos. Para inibir a atividade das peroxidases endógenas, as fatias foram incubadas com 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 10 minutos, tendo o cuidado de proteger as fatias da luz. Por fim foram lavadas em PBS-T mais 2 vezes durante 10 minutos.

A incubação com o anticorpo primário monoclonal contra TH (1:1000; T20720, Transduction Lab BD, San Jose, California, USA) diluído em PBS com 5% de soro foi realizada durante a noite a 4°C. Depois de 3 lavagens de 10 minutos em PBS-T para remover o anticorpo primário que não ligou, as fatias foram incubadas 1 hora à temperatura ambiente com anticorpo anti-rato biotilado (1-200; Vector Laboratories, Burlingame, CA) diluído em PBS com 1% de soro. As fatias foram novamente lavadas 3 vezes com PBS-T durante 10 minutos e incubadas com o complexo avidina-biotina peroxidase (ABC kit from Vector Laboratories, Burlingame, CA) durante 1 hora. As fatias foram então incubadas com 3,3'-Diamina Benzidina (DAB, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) durante 1 hora. A reação terminou pela adição de solução salina de TBS (Tris 20 mM e NaCl 137 mM). As fatias foram montadas em lâminas previamente limpas e revestidas com poli-D-lisina e visualizadas num microscópio Zeiss Axiovert 200 imaging Microscope (Axiobserver Z1, Zeiss).

### 3.2.2.2. Análise quantitativa e contagem celular

Após definição dos limites entre a SN e a área tegmental ventral procedeu-se à contagem dos neurónios TH<sup>+</sup>. O número total de neurónios TH<sup>+</sup> foi contado em cada secção mesencefálica utilizando uma ampliação x10. Todas as análises da imunohistoquímica foram realizadas em 3 ou 4 animais de cada grupo.

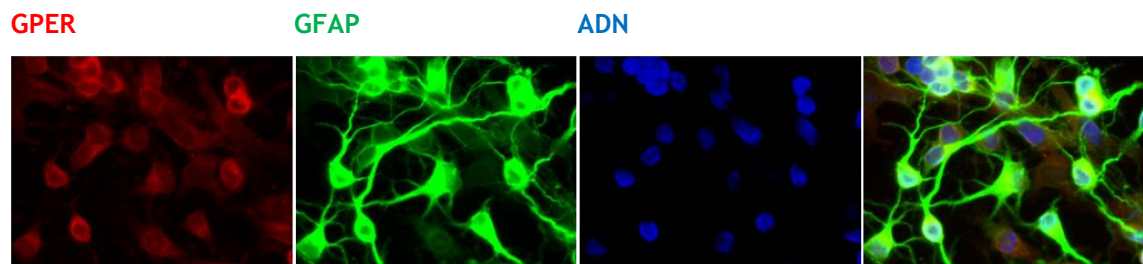
# **Capítulo 4**

## **Resultados**

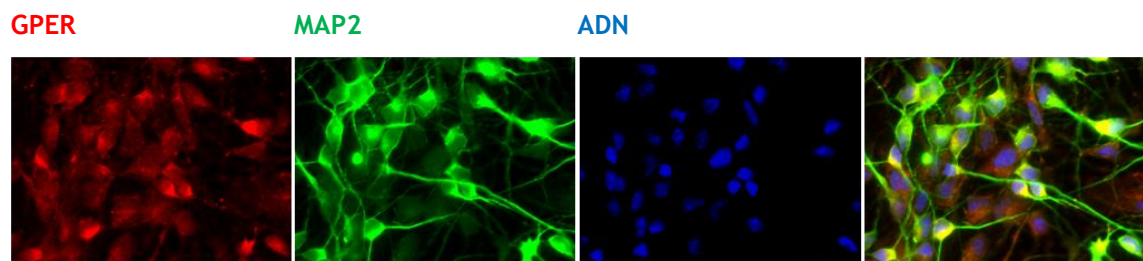
## 4. Resultados

### 4.1. Localização do GPER nas células do mesencéfalo ventral

A proteção dopaminérgica exercida pelo estradiol envolve a interação entre neurónios e astrócitos. A fim de averiguar se esta proteção poderá envolver a ação do GPER, começámos por analisar a presença deste recetor em culturas mistas (neurónios e astrócitos) do mesencéfalo ventral por imunocitoquímica. Observámos marcação para GPER em células positivas para a proteína utilizada como marcador neuronal, a proteína associada aos microtúbulos do tipo 2 (MAP-2), e também em células positivas para o marcador astrocitário, proteína glial fibrilar acídica (GFAP), indicando que nestas culturas o este recetor é expresso quer por neurónios quer por astrócitos (Figuras 11 e 12).



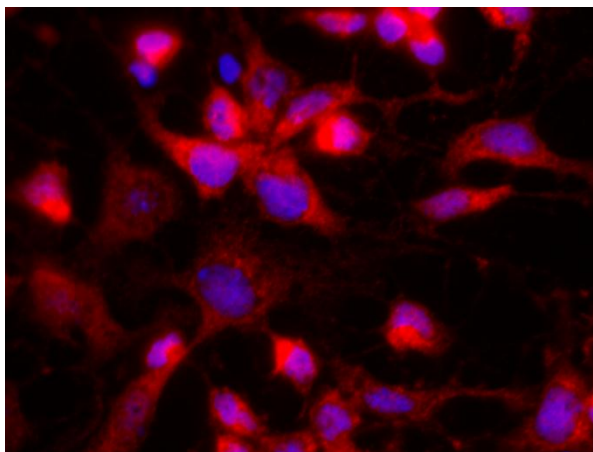
**Figura 11** - Imagem representativa de uma imunocitoquímica em células do mesencéfalo ventral marcada para GPER (vermelho), e para o marcador astrocitário GFAP (verde). Os núcleos foram identificados por marcação com o corante Hoescht (azul).



**Figura 12** - Imagem representativa de uma imunocitoquímica em células do mesencéfalo ventral marcada para GPER (vermelho), e para o marcador neuronal MAP-2 (verde). Os núcleos foram identificados por marcação com Hoescht (azul).

### 4.1.1. Localização membranar do GPER

Uma vez que a informação existente atualmente sobre a localização do GPER é contraditória tentamos avaliar nas células do mesencéfalo ventral se este recetor se localiza na membrana plasmática através da realização de uma imunocitoquímica sem permeabilização celular. Mesmo na ausência de permeabilização foi possível observar uma marcação intensa para o recetor que sugere a presença na membrana plasmática do GPER (Figura 13).

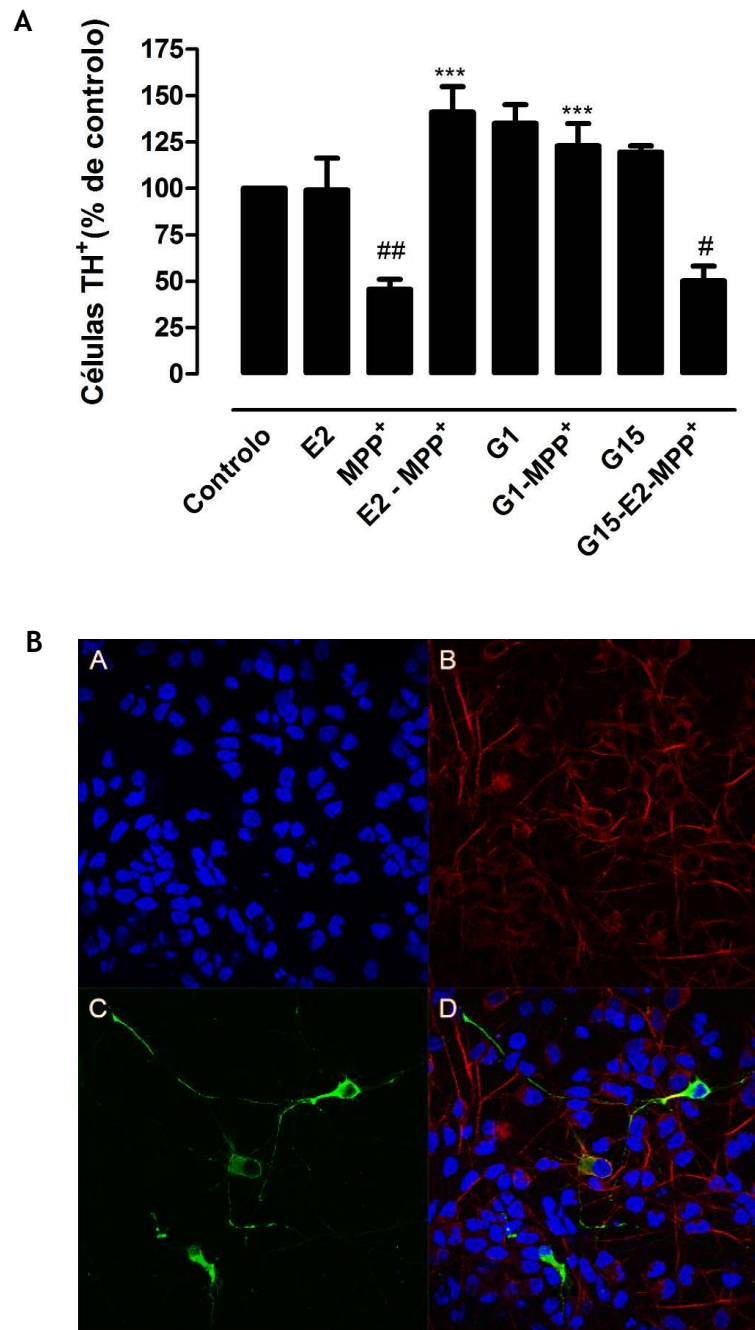


**Figura 13** - Imagem representativa de uma imunocitoquímica realizada em células do mesencéfalo ventral na ausência de permeabilização celular. O GPER encontra-se marcado a vermelho e os núcleos a azul. A observação foi feita no microscópio Zeiss Axio (Axiobserver Z1, Zeiss) com a objectiva 63x.

## 4.2. A ativação do GPER previne a perda dos neurónios dopaminérgicos mesencefálicos

Existem evidências consistentes que apontam para o envolvimento de um receptor membranar na neuroproteção dopaminérgica exercida pelo estradiol (Filardo *et al.* 2000; Campos *et al.* 2012). Utilizando culturas embrionárias do mesencéfalo ventral fomos avaliar se esta proteção envolve a ativação do GPER. A exposição da cultura ao MPP<sup>+</sup> provocou uma redução de 54,5% no número de células TH<sup>+</sup>. A pré-incubação com E2 não só impediu a perda de neurónios dopaminérgicos como ainda promoveu um aumento de 41% do número destas células relativamente ao controlo, o que parece indicar que o G1 promove a sobrevivência destas células em cultura, mesmo em situações controlo. A fim de investigar a capacidade do GPER em exercer proteção nos neurónios dopaminérgicos, as células foram incubadas com G1 24 horas antes da exposição ao MPP<sup>+</sup>. A presença do agonista seletivo do GPER induziu um aumento significativo no número de neurónios dopaminérgicos face às células estimuladas apenas com MPP<sup>+</sup>, ultrapassando mesmo os níveis de controlo (122,8% do controlo, Figura 14). Para confirmar o envolvimento do GPER na proteção mediada pelo E2 as células foram

incubadas com E2 na presença do antagonista seletivo dos GPER, o G15. Na presença de G15 a capacidade do E2 em proteger os neurónios dopaminérgicos da lesão induzida pelo MPP<sup>+</sup> ficou comprometida observando-se havendo uma redução do número de células TH<sup>+</sup> para 50,1% do controlo (Figura 14). A exposição das células a E2, G1 e G15 (na ausência de lesão) não afetou o número de células TH<sup>+</sup> relativamente ao controlo.



**Figura 14** - A ativação dos recetores GPER protege as células dopaminérgicas da lesão induzida por exposição a MPP<sup>+</sup>

A- Quantificação da lesão dopaminérgica induzida por exposição a MPP<sup>+</sup> na presença de um agonista ou de um antagonista do GPER. As células foram estimuladas com E2 (100nM), G1 (100nM) e G15 (100nM) 24 horas antes de uma exposição a MPP<sup>+</sup> (10µM). Os resultados foram expressos em percentagem de

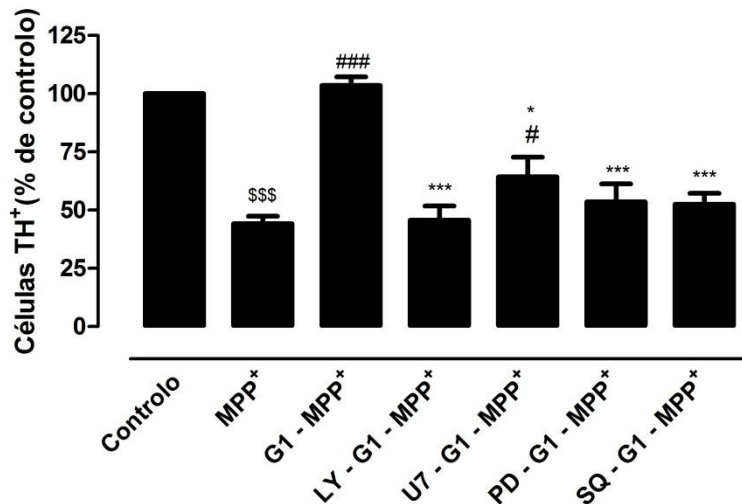
controlo e representam a média  $\pm$  S.E.M de 3 - 4 experiências independentes realizadas em triplicado. A análise estatística foi realizada com o teste one-way ANOVA seguido do Bonferroni post Test. # P <0,05 e ## P <0,01 quando comparado com o controlo. \*\*\* P <0,001 quando comparado com MPP<sup>+</sup>.

B- Imagem representativa da uma imunocitoquímica para TH<sup>+</sup> e MAP-2 usada para avaliar a lesão induzida por exposição MPP<sup>+</sup> em células do mesencéfalo ventral. O núcleo das células marcado com Hoescht é visível a azul (A). Os neurónios marcados com anti-MAP-2 aparecem a vermelho (B) e os neurónios dopaminérgicos marcados com anti-TH aparecem marcados a verde (C). A imagem D corresponde à conjugação das imagens A-C.

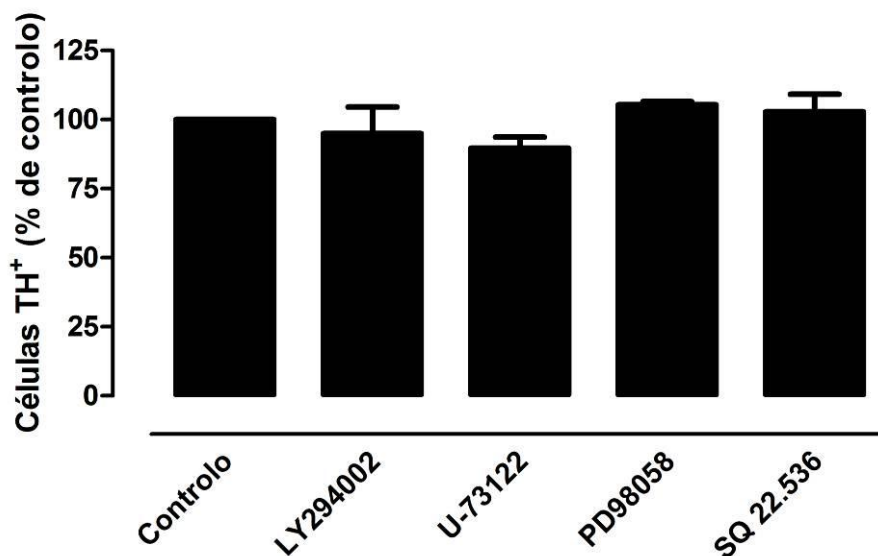
### 4.3. Vias de sinalização envolvidas na proteção dopaminérgica mediada pelo GPER

Depois de avaliada a capacidade do GPER em promover a proteção dopaminérgica, fomos tentar determinar que vias de sinalização mediavam o efeito protetor exercido por ativação deste recetor. Uma vez que há dados que indicam que a ativação do GPER pode conduzir à ativação da via das PI3K, das MAPK, da adenil ciclase e da fosfolipase C (Filardo *et al.* 2000; Filardo *et al.* 2002; Prossnitz *et al.* 2008) neste trabalho fomos tentar determinar a contribuição de cada uma destas vias para a proteção dopaminérgica mediada por ativação do GPER recorrendo para isso a inibidores seletivos de cada uma das vias.

Na presença dos inibidores da PI3K (LY 294002), da adenilciclase (SQ 22,536) e da MEK (PD98059) o G1 foi incapaz de impedir a lesão induzida por exposição a MPP<sup>+</sup>, tendo-se observado percentagens de células TH<sup>+</sup> semelhantes às observadas na presença de MPP<sup>+</sup> apenas. Na presença do inibidor da fosfolipase C (U-73122) a proteção mediada pelo G1 foi significativamente diminuída mas nesta situação manteve-se ainda alguma proteção (Figura 15). Estes resultados sugerem que a proteção dopaminérgica promovida pelo GPER envolve várias vias de sinalização que provavelmente convergem ou têm alvos comuns. A exposição das células aos inibidores das vias de sinalização (na ausência de lesão) não afectou a viabilidade dopaminérgica (Figura 16).



**Figura 15** - Vias de sinalização envolvidas na proteção dopaminérgica mediada pelo GPER. Trinta minutos antes da adição de G1 (100nM as células foram incubadas com LY 294002 (25 $\mu$ M), SQ 22.536 (0,1mM), PD98059 (50 $\mu$ M) e U-73122 (10nM). Seguiu-se uma incubação com MPP<sup>+</sup> (10 $\mu$ M) durante mais 24 horas. A cultura foi analisada por imunocitoquímica. Os resultados representam a média  $\pm$  S.E.M de oito experiências independentes realizadas em triplicado e foram expressos em percentagem de controlo. A análise estatística foi realizada com o teste one-way ANOVA seguido do Bonferroni post Test. \$\$\$ P <0,001 quando comparado com o controlo. ### P <0,001 e # P <0,05 quando comparado com MPP<sup>+</sup>. \* P <0,05 e \*\*\* P <0,001 quando comparado com o controlo.

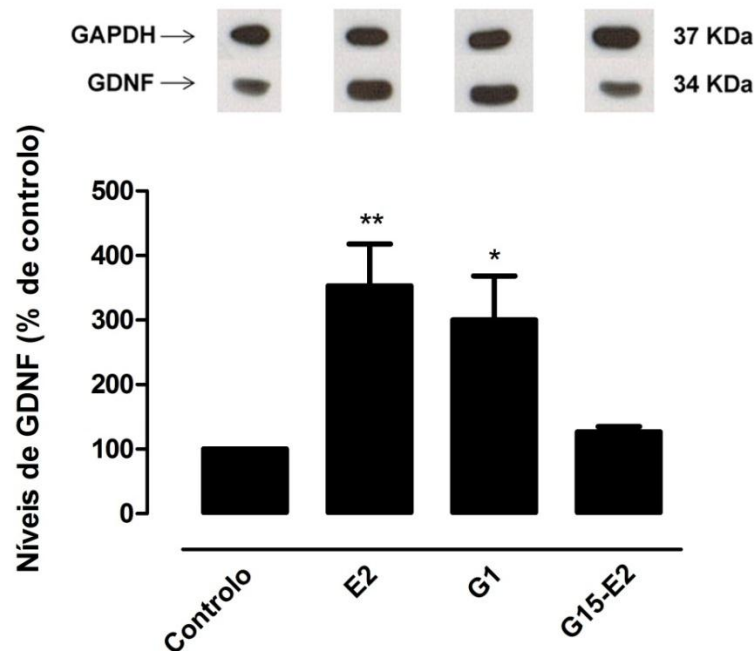


**Figura 16** - Influência dos inibidores das diferentes vias de sinalização na viabilidade dopaminérgica. Os inibidores das diferentes vias de sinalização não afectam a viabilidade dopaminérgica observada em situações controlo. Análise quantitativa da imunocitoquímica das células embrionárias da SN estimuladas com LY 294002 (25 $\mu$ M), SQ 22,536 (0.1mM), PD98059 (50 $\mu$ M) e U-73122 (10nM) durante 48 horas. As células foram fixadas e analisadas por imunocitoquímica. Os resultados representam a média  $\pm$  S.E.M de

três experiências independentes realizadas em triplicado e foram expressos em percentagem de controlo. A análise estatística é realizada com o teste one-way ANOVA seguido do Bonferroni post Test.

#### 4.4. Regulação da expressão de GDNF por ativação do GPER

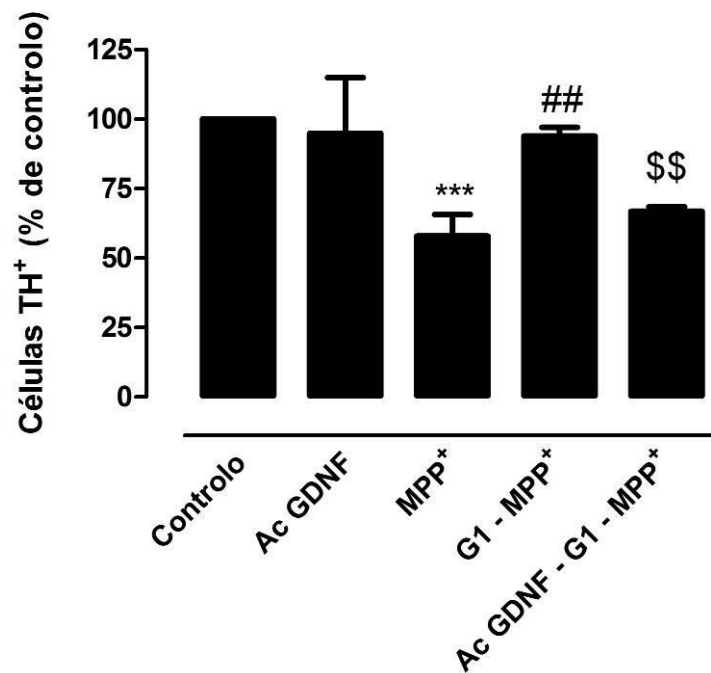
Sabe-se que o E2 promove a regulação da expressão de fatores de crescimento e que alguns dos efeitos biológicos do estradiol dependem destes fatores de crescimento. Uma vez que num estudo anterior do nosso grupo mostrámos que o E2 tem a capacidade de promover o aumento da expressão do GDNF em cultura do mesencéfalo neste estudo fomos avaliar se a ativação do GPER consegue regular a expressão dos níveis de GDNF nas células do mesencéfalo ventral. As células foram estimuladas durante 48 horas com E2 (100nM), G1 (100nM) e E2 + G15 (100nM). A análise por Western blot mostra que o E2 promoveu um aumento de 296% nos níveis do péptido. A ativação do GPER induzida pela estimulação com G1 provoca também um aumento da proteína, neste caso em cerca de 200%. Nas células foram incubadas com E2 na presença do antagonista seletivo do GPER, G15, não houve nenhuma alteração significativa relativamente ao controlo (Figura 17).



**Figura 17** - Regulação da expressão de GDNF por ativação do recetor GPER. As células foram estimuladas com E2 (100nM), G1 (100nM) e G15 (100nM) durante 48 horas. Os resultados são a média  $\pm$  S.E.M de três experiências independentes realizadas em triplicado e a são expressos em percentagem de controlo. A análise estatística é realizada com o teste one-way ANOVA seguido do Bonferroni post Test. \*\* P <0,01 e \* P <0,05 quando comparado com o controlo.

## 4.5. Papel do GDNF na proteção dopaminérgica induzida pelo G1

De forma a podermos avaliar qual a importância dos aumentos de GDNF promovidos por ativação do GPER na proteção dopaminérgica induzida pelo estradiol repetimos a estimulação das células com o agonista G1 mas desta vez em presença de um anticorpo contra o GDNF. O objetivo foi proceder à depleção do GDNF livre e ver de que forma a proteção era afetada por esta remoção. A capacidade do G1 em proteger da lesão induzida pelo MPP<sup>+</sup> foi totalmente comprometida pela depleção do GDNF, provocando uma redução das células TH<sup>+</sup> de 94% para 62% (Figura 18). Isto sugere que a neuroproteção observada pela ativação do recetor GPER envolve, efetivamente, a ação do GDNF.



**Figura 18** - Papel do GDNF na neuroproteção dopaminérgica induzida pelo G1. As células foram estimuladas com G1 (100nM) na presença de anticorpo contra o GDNF (0,4 µg/ml). Seguiu-se um insulto tóxico com MPP<sup>+</sup> (10µM) por um período de 24 horas (também em presença de anti-GDNF). A cultura foi analisada por imunocitoquímica. Os resultados são a média ± S.E.M de três experiências independentes realizadas em triplicado e expressos em percentagem de controlo. A análise estatística foi realizada com o teste one-way ANOVA seguido do Bonferroni post Test \*\*\* P <0,001 quando comparado com o controlo, ## P <0,01 quando comparado com MPP<sup>+</sup>, \$\$ P <0,01 quando comparado com G1-MPP<sup>+</sup>.

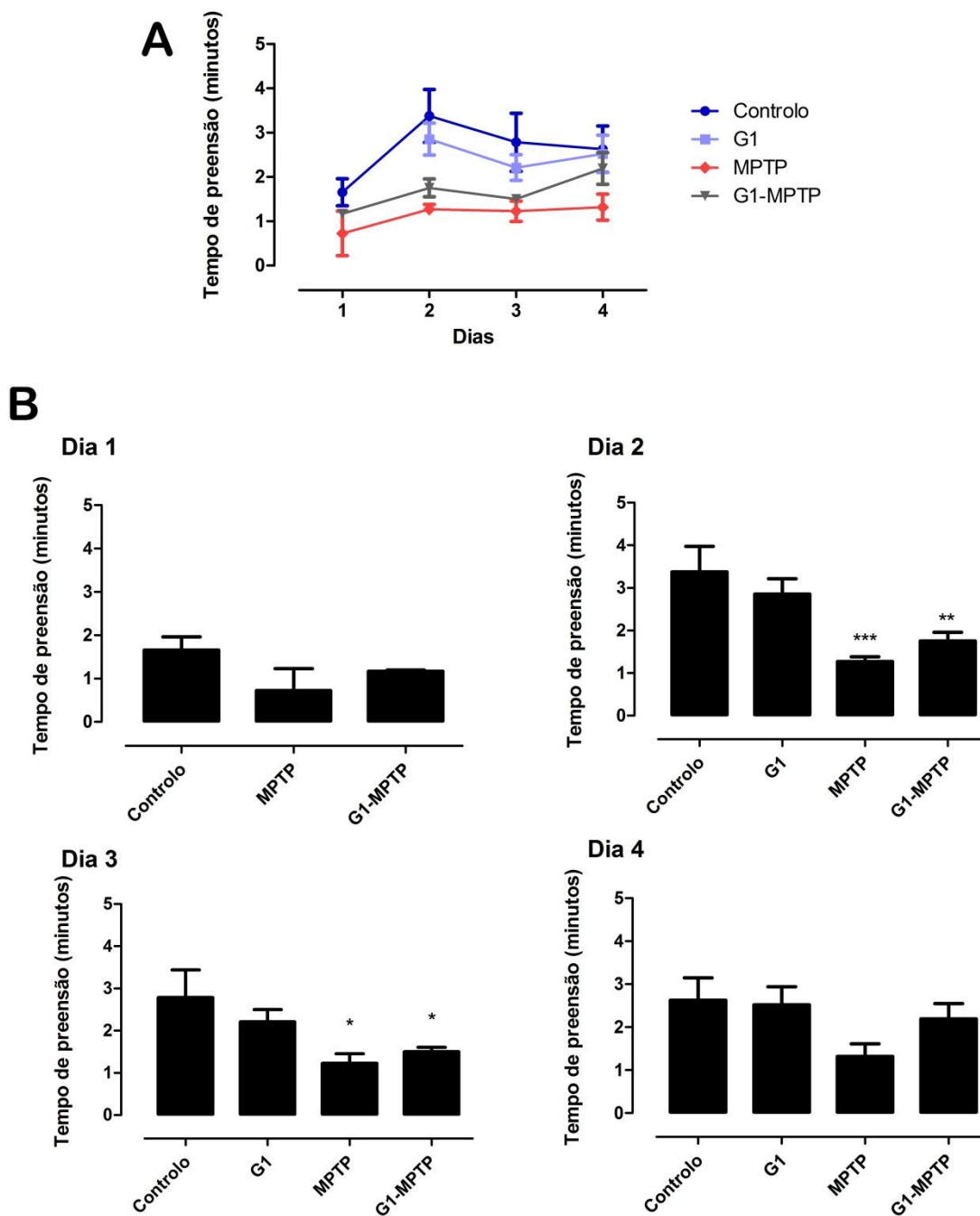
## 4.6. Efeito da ativação do GPER na proteção da função motora

Os resultados apresentados anteriormente mostraram que o estradiol, via ativação dos GPER, tem, em modelos *in vitro* da DP, a capacidade de proteger os neurónios dopaminérgicos.

Com esta parte do trabalho pretendemos estender esta avaliação a um modelo mais complexo, *in vivo*, e determinar ainda se a proteção se dá apenas a nível bioquímico ou se a nível funcional também é possível impedir as alterações motoras características dos modelos animais da DP.

O modelo usado foi o do MPTP. Os murganhos foram injetados com solução salina ou G1 duas vezes ao dia durante 10 dias consecutivos tendo ao 5º dia sido sujeitos a quatro injeções de MPTP (50mg/kg) com 2 horas de intervalo. Todos os murganhos foram sujeitos 4 vezes aos testes de comportamento durante 7 dias.

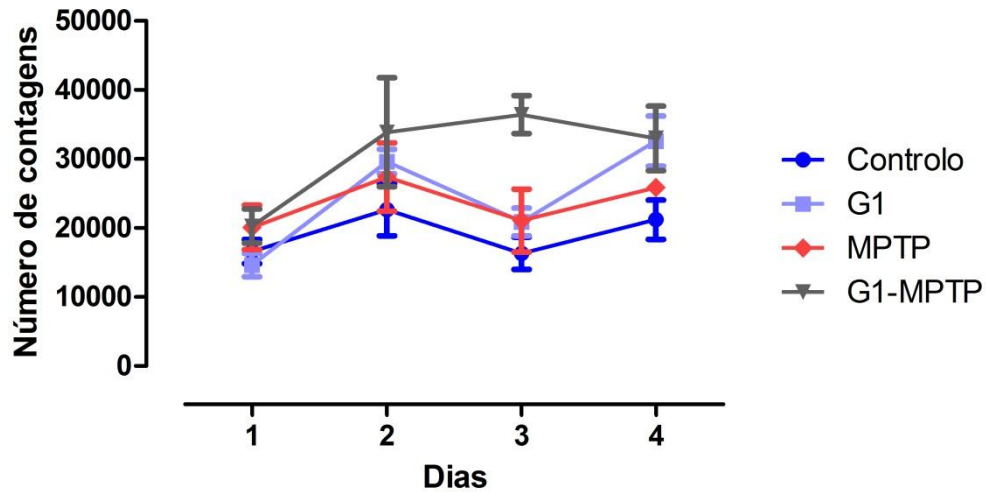
A fim de avaliar os movimentos mais finos dos animais, a capacidade de preensão, os animais foram sujeitos ao “grip test” em que se analisa o tempo total que os murganhos conseguem manter-se agarrados a uma grade metálica invertida. Os resultados obtidos mostram que os animais lesionados com MPTP e tratados com solução salina apresentam tempos de latência à queda inferiores aos animais do grupo controlo, embora só se verifiquem diferenças significativas no segundo e terceiro teste. Os animais sujeitos ao tratamento com o agonista seletivo do recetor GPER e sujeitos às injeções de MPTP, apresentam também diminuição nos tempos de latência à queda. Embora pareça haver uma pequena recuperação, esta não foi significativa (Figura 19 A).



**Figura 19** - Efeito da ativação do GPER na capacidade de preensão. Os murganhos foram injetados com solução salina ou G1 (5 $\mu$ g/100 $\mu$ L) durante um período de 10 dias. No 5º dia os animais foram injetados com MPTP (50mg/kg intraperitoneal) 4 vezes ao dia de 2 em 2 horas. Após o tratamento todos os murganhos foram sujeitos ao “grip test” e o tempo de latência à queda contabilizado. \*\*\* P <0,001, \* P <0,05, \* P <0,05 quando comparado com o controlo.

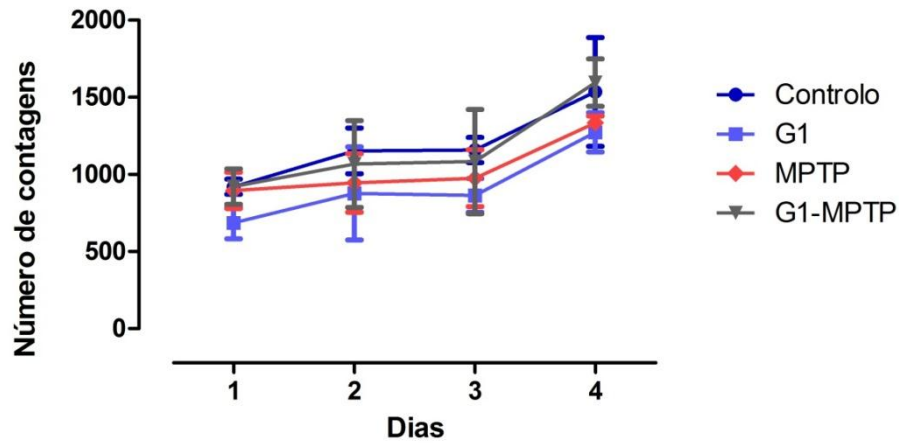
Para avaliar a atividade motora geral de cada grupo, foi contabilizado o número de contagens durante 2 horas, para determinar a distância percorrida e as elevações. Foi também adquirida

a velocidade média dos murganhos durante o teste. Por análise dos dados obtidos, verificamos que não existem alterações significativas indicadoras de déficit motor para estes parâmetros entre animais tratados com MPTP e animais controle (Figura 20, 21 e 22).

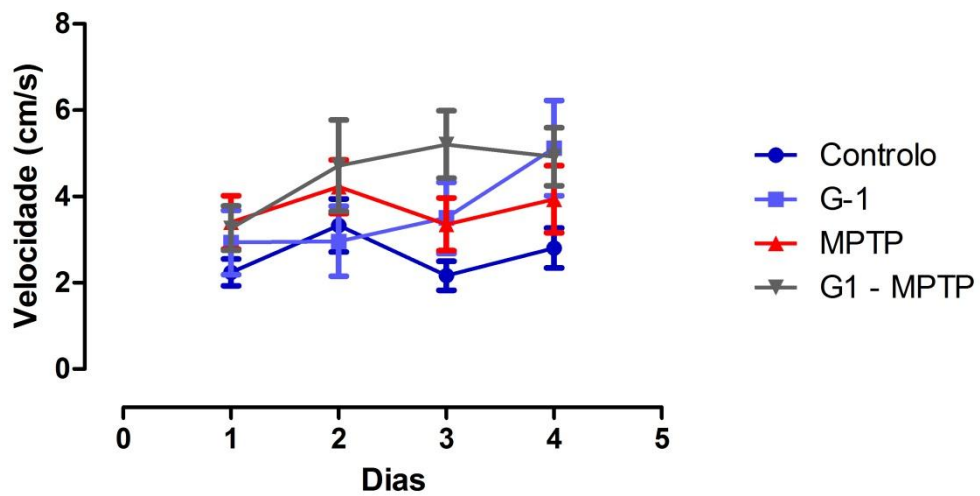


**Figura 20** - Distância total percorrida pelos animais. Após o tratamento já descrito os murganhos foram sujeitos ao teste de campo aberto durante 2 horas e a distância percorrida por cada animal foi registrada em número de contagens. A passagem dos animais em frente a um feixe de luz interrompe a transmissão desse mesmo feixe sendo detectado como uma contagem. O número de contagens registradas pelo grupo de murganhos injetados com MPTP é semelhante ao grupo controle, o que indica a ausência de déficit motor significativo.

A medição da contagem de elevações e a velocidade são parâmetros que também permitem avaliar o comprometimento motor. Nos testes realizados em murganho aos quais foi administrado veículo ou G1 e injetado MPTP (Figura 22 e 23) não se registaram diferenças significativas entre o grupo de murganhos injetados com MPTP e o grupo controle quer para as elevações, quer para a velocidade, o que parece indicar que a lesão dopaminérgica foi insuficiente para se traduzir em alterações motoras significativas a nível global, mas que pode ter resultado em algum comprometimento dos movimentos mais precisos como os avaliados no “grip test”. A ausência de alterações motoras significativas impede que possam ser tiradas conclusões quanto a uma possível ação protetora dos agonistas do GPER a nível funcional.



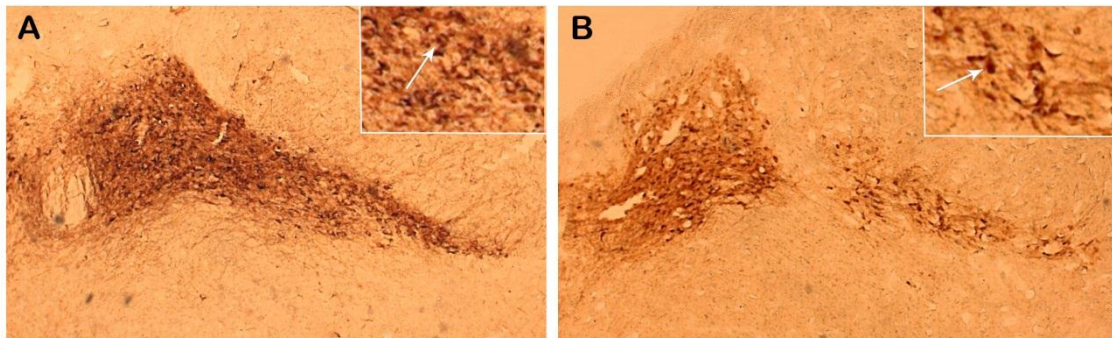
**Figura 21** - Quantificação do número de elevações em murganhos. Os murganhos foram injetados com solução salina ou G1 ( $5\mu\text{g}/100\mu\text{L}$ ) durante um período de 10 dias. No 5º dia os animais foram injetados com MPTP ( $50\text{mg}/\text{kg}$  intraperitoneal) 4 vezes ao dia de 2 em 2 horas. Após o tratamento todos os murganhos foram sujeitos ao teste de campo aberto durante 2 horas e as elevações de cada murganho determinadas em número de contagens. Não foram registadas diferenças significativas entre os grupos.



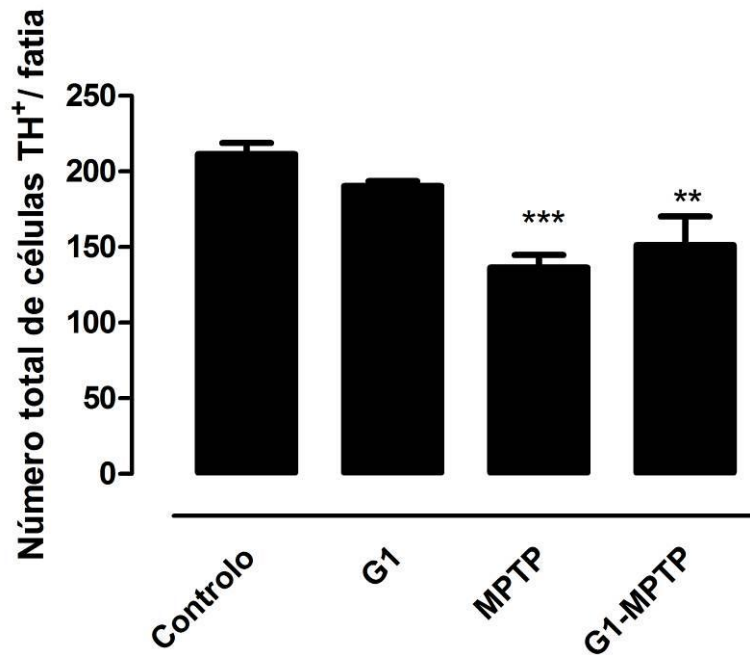
**Figura 22** - Quantificação da velocidade dos murganhos. Os murganhos foram injetados com solução salina ou G1 ( $5\mu\text{g}/100\mu\text{L}$ ) durante um período de 10 dias. No 5º dia os animais foram injetados com MPTP ( $50\text{mg}/\text{kg}$  intraperitoneal) 4 vezes ao dia de 2 em 2 horas. Após o tratamento todos os murganhos foram sujeitos ao teste de campo aberto durante 2 horas e o número de contagens registado, não apresentando diferenças

## 4.7. Lesão dopaminérgica induzida pelo MPTP

Dois dias após o fim dos testes motores os animais foram sacrificados e os cérebros foram processados por imunohistoquímica para a tirosina hidroxilase (TH) de forma a ser determinada a lesão dopaminérgica em cada uma das condições utilizadas. Verificamos que existe uma redução das células TH<sup>+</sup> nos murganhos injetados com MPTP relativamente ao controlo de 35,4%. O número de células TH<sup>+</sup> nos murganhos a que foi administrado G1 e injetados com MPTP também apresentam menor número de células TH<sup>+</sup> relativamente ao controlo (28,5%).



**Figura 23** - Imunohistoquímica para a TH<sup>+</sup> na SN de murganhos. Imagem representativa da imunohistoquímica para TH<sup>+</sup> em animais controlo (A, n=4) e em murganhos injetados com MPTP (B, n=4). As fatias foram coradas com DAB. Observou-se uma diminuição significativa de células TH<sup>+</sup> nos murganhos injectados com MPTP relativamente aos animais injectados com solução veículo. O número de células TH<sup>+</sup> foi contado apenas na SN e não na área tegmental ventral. A análise da imunohistoquímica foi feita em 3 - 4 animais por grupo e 1 - 4 fatia por cada animal.



**Figura 24** - Neurónios TH<sup>+</sup> da SN. Efeito do MPTP e do G1 nos neurónios dopaminérgicos. Análise quantitativa das células TH<sup>+</sup> após lesão com MPTP e tratamento com G1. Os animais foram administrados durante 10 dias com G1 e injetados com MPTP 4 vezes de 2 em 2 horas. Dois dias depois os animais foram sacrificados e os cérebros processados para imunohistoquímica. O grupo de murganços injetados com MPTP tem uma redução significativa do número de neurónios TH<sup>+</sup> na SN quando comparado com o grupo controlo (211,4 para 136,6 células TH<sup>+</sup>/fatia). Os grupo ao qual foi administrado G1 e injetado MPTP tem uma redução de neurónios TH<sup>+</sup> próxima dos murganços injetados com MPTP e solução salina. Os valores são expressos em neurónios TH<sup>+</sup> totais  $\pm$  S.E.M. e análise estatística foi realizada com o teste one-way ANOVA seguido do Bonferroni post Test. \*\* P <0,01, \*\*\* P <0,001 quando comparado com o controlo.

Os resultados obtidos por imunohistoquímica, mostraram que as injeções com MPTP promoveram uma redução significativa do número de neurónios dopaminérgicos. No entanto, esta lesão parece não ter sido suficientemente extensa para se traduzir num défice da actividade motora geral. Por outro lado, a administração do agonista selectivo do GPER não protegeu as células dopaminérgicas da lesão induzida pelo MPTP. No entanto, estes dados devem ser analisados com alguma cautela uma vez que quer o número de animais quer o número de fatias analisada/animal foram bastante reduzidos o que pode comprometer a relevância destes resultados. Torna-se necessário analisar um maior número de fatias por animal e aumentar também o número de animais analisados de forma a clarificar se os resultados obtidos são ou não representativos das condições experimentais testadas.



# **Capítulo 5**

## **Discussão**

## 5. Discussão

Estudos *in vitro* (Sawada e Shimohama 2000) e *in vivo* (Shughrue 2004) mostram o papel neuroprotector do estradiol contra a degeneração dos neurónios dopaminérgicos da SN. Adicionalmente, sabe-se que a capacidade neuroprotetora do estradiol é mediada pela ativação de recetores intracelulares, como os recetores de estrogénio  $\alpha$  (Morissette *et al.* 2008), e pela ativação de recetores membranares, como os recetores acoplados a proteína G, especificamente o GPER (Liu *et al.* 2011; Bourque *et al.* 2013).

Neste estudo, utilizando agonistas e antagonistas seletivos para o GPER e avaliando a sobrevivência dos neurónios dopaminérgicos, por contagem das células TH<sup>+</sup>, confirmámos que o estradiol protege os neurónios dopaminérgicos da lesão induzida pelo MPP<sup>+</sup> através da ativação do recetor GPER. Este resultado está de acordo com outros estudos em que a proteção dopaminérgica foi avaliada por determinação dos níveis de dopamina estriatais ou por determinação dos transportadores membranares e vesiculares da dopamina (Bourque *et al.* 2013). Usando o mesmo modelo, investigámos que vias de sinalização participam na ação neuroprotetora do GPER. Com este objetivo analisámos vias de sinalização já anteriormente descritas como sendo ativadas pelo GPER (Maggiolini e Picard 2009). A ativação do GPER pode ativar a adenil ciclase e levar ao aumento de cAMP que por sua vez irá ativar a PKA. Por outro lado, a ativação do recetor pode ativar fatores de crescimento epidérmicos que levam à ativação da ERK e da PI3K/Akt e de forma mais indireta a fosfolipase C (Maggiolini e Picard 2009). Os resultados por nós obtidos mostraram que as vias associadas à PLC, à PI3K, à adenilciclase e às MAPK eram essenciais à ação protetora mediada pelo agonista seletivo do GPER, G1. Inibidores de diferentes vias impediram totalmente a proteção dopaminérgica promovida pelo G1 o que sugere que esta proteção depende de várias vias ou que as diferentes vias convergem, ou têm alvos comuns, fazendo que a inibição de cada uma individualmente acabe por comprometer totalmente a proteção.

A capacidade do estradiol em regular a expressão dos factores neurotróficos BDNF, IGF ou artemina foi anteriormente descrita em várias regiões cerebrais (Dittrich *et al.* 1999; Ivanova *et al.* 2001; Zhou *et al.* 2005; Garcia-Segura *et al.* 2007; Kang *et al.* 2010; Pan *et al.* 2010; Pietranera *et al.* 2010). O estradiol é ainda capaz de regular a expressão de GDNF em neurónios hipotalâmicos e na via nigroestriatal ((Garcia-Segura *et al.* 2001; Ivanova *et al.* 2002). Neste trabalho, mostrámos que o estradiol, via ativação do GPER, promove também o aumento da expressão do GDNF e ainda que o GDNF é essencial à proteção mediada pelo GPER.

Curiosamente as vias de sinalização que vimos serem essenciais à proteção mediada pelo GPER também estão envolvidas na regulação da expressão de GDNF (Saavedra *et al.* 2008).

Seria interessante analisar se em presença dos inibidores das vias de sinalização usados também se observa uma inibição da expressão de GDNF promovido por ativação do GPER.

Por avaliação de parâmetros bioquímicos como a presença de os transportadores de dopamina ou os níveis de dopamina. Bourque e colaboradores (2013) demonstraram recentemente a participação do GPER nos efeitos neuroprotetores do E2 contra a lesão por MPTP em murganhos C57BL/6. Neste trabalho, avaliamos o papel do GPER na proteção dos neurónios dopaminérgicos e também na proteção da função motora usando o mesmo modelo da doença de Parkinson. A capacidade motora dos animais foi avaliada através do “grip test”, com o objetivo de determinar efeitos em movimentos mais finos dos murganhos, e também através do teste de campo aberto, no qual foram avaliados parâmetros como distância total percorrida, o número de elevações e a velocidade. Através do “grip test” verificámos que os murganhos injetados com MPTP apresentaram tempos inferiores de latência à queda, os quais não foram significativamente alterados pelo tratamento com G1. A análise dos resultados da imunohistoquímica demonstrou que também a nível do número de células dopaminérgicas não houve proteção pelo G1. Assim, na concentração administrada, o agonista G1, não foi eficaz em proteger a via nigrostriatal contra a toxina dopaminérgica no modelo *in vivo*, contrariamente ao descrito por Bourque *et al.* 2013. De modo esclarecermos quanto às concentrações de G1 atingidas, avaliarmos a sua estabilidade e difusão no cérebro deveríamos quantificar o G1 presente no cérebro e no LCR quer na altura da injeção com MPTP quer no final da experiência.

No teste de campo aberto não se observaram diferenças significativas para nenhum dos parâmetros avaliado (distância total percorrida, velocidade e nº de elevações) entre o grupo controlo de animais e o grupo injetado com MPTP. A ausência de alterações significativas no teste de campo aberto em animais injetados com MPTP pode indicar que a lesão dopaminérgica foi insuficiente. De facto, ao determinarmos a extensão da lesão através de uma imunohistoquímica para a TH verificámos que a redução das células TH<sup>+</sup> nos murganhos injetados com MPTP, relativamente ao controlo, foi de apenas 35,5%. Uma vez que é conhecido que os primeiros sintomas motores da DP surgem quando a perda dos neurónios dopaminérgicos é bastante mais acentuada (>60%), é provável que a ausência de défice motor no modelo por nós utilizado se deva a uma lesão pouco extensa. De qualquer modo os resultados que apresentamos para a imunohistoquímica são ainda preliminares e devem ser analisados com alguma cautela uma vez que o número de fatias analisadas por cada animal foi muito reduzida, o que pode comprometer a representatividade dos dados. O número de animais analisado foi também reduzido (4). Só após a análise de mais fatias e de mais animais se poderá concluir com segurança acerca dos níveis de lesão.

Em conjunto os resultados obtidos neste trabalho demonstraram a eficácia dos agonistas GPER em proteger os neurónios dopaminérgicos em culturas primárias do mesencéfalo ventral e ainda que esta proteção depende dos níveis de GDNF. A capacidade dos mesmos agonistas em

protegerem em modelos *in vitro* deverá ser reavaliada para concentrações mais elevadas de G1 e também para lesões mais extensas.

## **Capitulo 6**

# **Conclusão e Perspectivas Futuras**

## 6. Conclusão e Perspectivas Futuras

Vários estudos (Numakawa *et al.* 2011; Campos *et al.* 2012) mostram o papel neuroprotetor do E2 por interacção com factores de crescimento e evidenciam a importância de recetores membranares para esta acção.

Com este trabalho mostramos que a ativação do recetor GPER protege a via nigrostriatal face à lesão induzida pela toxina dopaminérgica num modelo *in vitro* de células do mesencéfalo ventral, através de um processo que envolve a regulação da expressão de GDNF.

Adicionalmente, no modelo *in vivo*, mostramos que a lesão induzida pelo MPTP detetada no “grip test”, não foi revertida pela administração de G1. No entanto, a ausência de alterações motoras significativas no teste de campo aberto impede que possam ser tiradas conclusões quanto a uma possível acção protetora dos agonistas do GPER a nível funcional.

Assim, pretendemos ajustar a lesão neuronal para níveis que acentuam os sintomas motores da DP e testar a administração de várias concentrações de agonista selectivo do recetor GPER. Neste estudo, poderão também ser quantificados os níveis de G1 ao longo do estudo.

O nosso grupo pretende também avaliar *in vivo* a expressão de GDNF e averiguar o seu papel neste modelo, assim como de alguns factores inflamatórios por ativação do GPER.

Estes resultados, conjuntamente com o fato do recetor ser um recetor de estrogénio que não medeia efeitos nos órgãos reprodutores, sugere que poderá ser usado como uma estratégia alvo designada para proteger a lesão dopaminérgica.

## **Capítulo 7**

# **Referências Bibliográficas**

## 7. Referências Bibliográficas

Arai, H., V. M.-Y. Lee, et al. (1992). "Lewy bodies contain beta-amyloid precursor proteins of Alzheimer's disease." Brain Research **585**(1): 386-390.

Arenas, E., M. Trupp, et al. (1995). "GDNF prevents degeneration and promotes the phenotype of brain noradrenergic neurons in vivo." Neuron **15**(6): 1465-1473.

Arevalo, M.-A., M. Santos-Galindo, et al. (2010). "Actions of estrogens on glial cells: Implications for neuroprotection." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects **1800**(10): 1106-1112.

Aronica, S. M., W. L. Kraus, et al. (1994). "Estrogen action via the cAMP signaling pathway: stimulation of adenylate cyclase and cAMP-regulated gene transcription." Proceedings of the National Academy of Sciences **91**(18): 8517-8521.

Bae, Y.-H., J.-Y. Hwang, et al. (2000). "Anti-oxidative neuroprotection by estrogens in mouse cortical cultures." Journal of Korean medical science **15**(3): 327-336.

Baloh R.H., T. M. G., Lampe P.A., Fahrner T.J., Enomoto H., Simburger K.S., Leitner M.L., Araki T., Johnson E.M. & Milbrandt J. (1998). "rtemin, a Novel Member of the GDNF Ligand Family, Supports Peripheral and Central Neurons and Signals through the GFRA3–RET Receptor Complex." Neuron **21**: 1291 - 1302.

Becker, J. B. (1999). "Gender differences in dopaminergic function in striatum and nucleus accumbens." Pharmacology Biochemistry and Behavior **64**(4): 803-812.

Betarbet, R., T. B. Sherer, et al. (2002). "Animal models of Parkinson's disease." Bioessays **24**(4): 308-318.

Blandini, F. e M.-T. Armentero (2012). "Animal models of Parkinson's disease." FEBS Journal **279**(7): 1156-1166.

Blesa, J., S. Phani, et al. (2012). "Classic and new animal models of Parkinson's disease." BioMed Research International **2012**(1): 1-10.

Bourque, M., M. Morissette, et al. (2013). "Implication of GPER1 in neuroprotection in a mouse model of Parkinson's disease." Neurobiology of Aging **34**(3): 887-901.

Bové, J. e C. Perier (2012). "Neurotoxin-based models of Parkinson's disease." Neuroscience **211**(1): 51-76.

Braak, H., K. D. Tredici, et al. (2003). "Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease." Neurobiology of Aging **24**(2): 197-211.

Brooks, A., C. Chadwick, et al. (1999). "Paraquat elicited neurobehavioral syndrome caused by dopaminergic neuron loss." Brain Research **823**(1): 1-10.

Brunet, A., A. Bonni, et al. (1999). "Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor." Cell **96**(6): 857-868.

Campos, F. L., A. C. Cristovão, et al. (2012). "GDNF Contributes to Oestrogen-Mediated Protection of Midbrain Dopaminergic Neurones." Journal of Neuroendocrinology **24**(11): 1386-1397.

Cannon, J. R. e J. T. Greenamyre (2010). "Neurotoxic in vivo models of Parkinson's disease." Progress in Brain Research **184**(1): 17-33.

Carrer, H. F., A. Araque, et al. (2003). "Estradiol regulates the slow Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> current in hippocampal pyramidal neurons." The Journal of Neuroscience **23**(15): 6338-6344.

Chimento, A., R. Sirianni, et al. (2010). "17 $\beta$ -Estradiol activates rapid signaling pathways involved in rat pachytene spermatocytes apoptosis through GPR30 and ER $\alpha$ ." Molecular and Cellular Endocrinology **320**(1-2): 136-144.

Chong, Z., F. Li, et al. (2005). "Activating Akt and the brain's resources to drive cellular survival and prevent inflammatory injury." Histology and histopathology **20**(1): 299.

Dauer, W. e S. Przedborski (2003). "Parkinson's disease: mechanisms and models." Neuron **39**(6): 889-909.

Dawson, T. M., H. S. Ko, et al. (2010). "Genetic animal models of Parkinson's disease." Neuron **66**(5): 646-661.

de Rijk, M. C., M. M. B. Breteler, et al. (1995). "Prevalence of Parkinson's disease in the elderly: The Rotterdam Study." Neurology **45**(12): 2143-2146.

Deumens, R., A. Blokland, et al. (2002). "Modeling Parkinson's Disease in Rats: An Evaluation of 6-OHDA Lesions of the Nigrostriatal Pathway." Experimental Neurology **175**(2): 303-317.

Dhandapani, K. M. e D. W. Brann (2002). "Protective effects of estrogen and selective estrogen receptor modulators in the brain." Biology of reproduction **67**(5): 1379-1385.

Dickson, D. W. (2012). "Parkinson's disease and parkinsonism: neuropathology." Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine **2**(8): a009258.

Double, K. e G. Halliday (2006). New face of neuromelanin. Parkinson's Disease and Related Disorders, Springer. **70**: 119-123.

Dunnett, S. B., A. A. Boulton, et al. (1999). Neural transplantation methods, Humana Press.

Duty, S. e P. Jenner (2011). "Animal models of Parkinson's disease: a source of novel treatments and clues to the cause of the disease." British Journal of Pharmacology **164**(4): 1357-1391.

Endoh, H., H. Sasaki, et al. (1997). "Rapid activation of MAP kinase by estrogen in the bone cell line." Biochemical and Biophysical Research Communications **235**(1): 99-102.

Fahn, S. (2003). "Description of Parkinson's disease as a clinical syndrome." Annals of the New York Academy of Sciences **991**(1): 1-14.

Ferrer, I. (2011). "Neuropathology and Neurochemistry of Nonmotor Symptoms in Parkinson's Disease." Parkinson's Disease **2011**(1): 1-13.

Filardo, E., J. Quinn, et al. (2007). "Activation of the Novel Estrogen Receptor G Protein-Coupled Receptor 30 (GPR30) at the Plasma Membrane." Endocrinology **148**(7): 3236-3245.

Filardo, E. J., J. A. Quinn, et al. (2000). "Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF." Molecular endocrinology **14**(10): 1649-1660.

Filardo, E. J., J. A. Quinn, et al. (2002). "Estrogen action via the G protein-coupled receptor, GPR30: stimulation of adenylyl cyclase and cAMP-mediated attenuation of the epidermal growth factor receptor-to-MAPK signaling axis." Molecular endocrinology **16**(1): 70-84.

Funakoshi, T., A. Yanai, et al. (2006). "G protein-coupled receptor 30 is an estrogen receptor in the plasma membrane." Biochemical and Biophysical Research Communications **346**(3): 904-910.

Garcia-Segura, L. M., I. Azcoitia, et al. (2001). "Neuroprotection by estradiol." Progress in Neurobiology **63**(1): 29-60.

Gillies, G. E. e S. McArthur (2010). "Estrogen actions in the brain and the basis for differential action in men and women: a case for sex-specific medicines." Pharmacological reviews **62**(2): 155-198.

Goodman, Y., A. J. Bruce, et al. (1996). "Estrogens Attenuate and Corticosterone Exacerbates Excitotoxicity, Oxidative Injury, and Amyloid  $\beta$ -Peptide Toxicity in Hippocampal Neurons." Journal of neurochemistry **66**(5): 1836-1844.

Green, P. S. e J. W. Simpkins (2000). "Neuroprotective effects of estrogens: potential mechanisms of action." International Journal of Developmental Neuroscience **18**(4): 347-358.

Greenamyre, J. T., R. Betarbet, et al. (2003). "The rotenone model of Parkinson's disease: genes, environment and mitochondria." Parkinsonism & Related Disorders **9**: 59-64.

Haaxma, C. A., B. R. Bloem, et al. (2007). "Gender differences in Parkinson's disease." Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry **78**(8): 819-824.

Handa, R. J., S. Ogawa, et al. (2012). "Roles for Oestrogen Receptor  $\beta$  in Adult Brain Function." Journal of Neuroendocrinology **24**(1): 160-173.

He, Y.-Y., B. Cai, et al. (2009). "Estrogenic G protein-coupled receptor 30 signaling is involved in regulation of endometrial carcinoma by promoting proliferation, invasion potential, and interleukin-6 secretion via the MEK/ERK mitogen-activated protein kinase pathway." Cancer Science **100**(6): 1051-1061.

Houlden, H. e A. B. Singleton (2012). "The genetics and neuropathology of Parkinson's disease." Acta Neuropathologica **124**(3): 325-338.

Improta-Brears, T., A. R. Whorton, et al. (1999). "Estrogen-induced activation of mitogen-activated protein kinase requires mobilization of intracellular calcium." Proceedings of the National Academy of Sciences **96**(8): 4686-4691.

Ivanova, T., M. Karolczak, et al. (2002). "Estradiol stimulates GDNF expression in developing hypothalamic neurons." Endocrinology **143**(8): 3175-3175.

Jankovic, J. (2008). "Parkinson's disease: clinical features and diagnosis." Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry **79**(4): 368-376.

Kajta, M. g. e W. a. a. Lasoñ (2000). "Oestrogen effects on kainate-induced toxicity in primary cultures of rat cortical neurons." Acta neurobiologiae experimentalis **60**(3): 365-370.

Kitamura, Y., S. Shimohama, et al. (2000). "The Parkinsonian Models. Invertebrates to Mammals." The Japanese Journal of Pharmacology **84**(3): 237-243.

Kotzbauer, P. T., P. A. Lampe, et al. (1996). "Neurturin, a relative of glial-cell-line-derived neurotrophic factor." Nature **384**(6608): 467-470.

Laflamme, N., R. E. Nappi, et al. (1998). "Expression and neuropeptidergic characterization of estrogen receptors (ER $\alpha$  and ER $\beta$ ) throughout the rat brain: anatomical evidence of distinct roles of each subtype." Journal of neurobiology **36**(3): 357-378.

Langston, J. W., P. Ballard, et al. (1983). "Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis." Science **219**(4587): 979-980.

Laurence L., Brunton K.L.P., et al., Eds. (2008). Goodman & Gilman's Manual of Pharmacology and Therapeutics.

Lieberherr, M., B. Grosse, et al. (1993). "Cell signaling and estrogens in female rat osteoblasts: a possible involvement of unconventional nonnuclear receptors." Journal of Bone and Mineral Research **8**(11): 1365-1376.

Lim, E. (2005). "A walk through the management of Parkinson's disease." ANNALS Academy of Medicine Singapore **34**(2): 188-195.

Liu, S.-B., J. Han, et al. (2011). "Neuroprotective effects of oestrogen against oxidative toxicity through activation of G-protein-coupled receptor 30 receptor." Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology **38**(9): 577-585.

Luine, V. e M. Frankfurt (2012). "Interactions between estradiol, BDNF and dendritic spines in promoting memory." Neuroscience **239**(1): 34-45.

M. kajta, B. B., M. MARSZAL, W. LASÓN (2001). "Effects of 17-beta estradiol and estriol on NMDA-induced toxicity and apoptosis in primary cultures of rat cortical neurons." Journal of Physiology and Pharmacology **52**(3): 437-446.

Manning-Bog, A. B. (2001). "The herbicide paraquat causes up-regulation and aggregation of alpha-synuclein in mice: paraquat and alpha-synuclein." Journal of Biological Chemistry **277**(3): 1641-1644.

Marino, M., P. Galluzzo, et al. (2006). "Estrogen signaling multiple pathways to impact gene transcription." Current genomics **7**(8): 497.

Massano, J. (2011). "Doença de Parkinson." Acta Médica Portuguesa **24**(S4): 827-834.

McEwen, B. (2002). "Estrogen actions throughout the brain." Recent Progress in Hormone Research **57**(1): 357-384.

Michotte, A. (2003). "Recent developments in the neuropathological diagnosis of Parkinson's disease and parkinsonism." Acta neurologica belgica **103**(3): 155-158.

Milbrandt, J., F. J. de Sauvage, et al. (1998). "Persephin, a novel neurotrophic factor related to GDNF and neurturin." Neuron **20**(2): 245-253.

Miller, D. B., S. F. Ali, et al. (1998). "The impact of gender and estrogen on striatal dopaminergic neurotoxicity." Annals of the New York Academy of Sciences **844**(1): 153-165.

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

Moriarty, K., K. H. Kim, et al. (2006). "Estrogen Receptor-Mediated Rapid Signaling." Endocrinology **147**(12): 5557-5563.

Morissette, M., M. Le Saux, et al. (2008). "Contribution of estrogen receptors alpha and beta to the effects of estradiol in the brain." The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology **108**(3-5): 327-338.

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

Nilsson, S., S. Mäkelä, et al. (2001). "Mechanisms of estrogen action." Physiological reviews **81**(4): 1535-1565.

Numakawa, T., T. Matsumoto, et al. (2011). "Protective Action of Neurotrophic Factors and Estrogen against Oxidative Stress-Mediated Neurodegeneration." Journal of Toxicology **2011**(1): 1-12.

Olanow, C. e W. Tatton (1999). "Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease." Annual review of neuroscience **22**(1): 123-144.

Otto, C., I. Fuchs, et al. (2008). "GPR30 Does Not Mediate Estrogenic Responses in Reproductive Organs in Mice." Biology of reproduction **80**(1): 34-41.

Otto, C., B. Rohde-Schulz, et al. (2008). "G Protein-Coupled Receptor 30 Localizes to the Endoplasmic Reticulum and Is Not Activated by Estradiol." Endocrinology **149**(10): 4846-4856.

Prossnitz, E. R., J. B. Arterburn, et al. (2008). "Estrogen Signaling through the Transmembrane G Protein-Coupled Receptor GPR30." Annual Review of Physiology **70**(1): 165-190.

Przedborski, S., V. Jackson-Lewis, et al. (2001). "The parkinsonian toxin 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP): a technical review of its utility and safety." Journal of neurochemistry **76**(5): 1265-1274.

Quesada, A., B. Y. Lee, et al. (2008). "PI3 kinase/Akt activation mediates estrogen and IGF-1 nigral DA neuronal neuroprotection against a unilateral rat model of Parkinson's disease." Developmental Neurobiology **68**(5): 632-644.

Revankar, C. M., D. F. Cimino, et al. (2005). "A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling." Science Signaling **307**(5715): 1625-1630.

Rong, W., J. Wang, et al. (2012). "17 $\beta$ -Estradiol Attenuates Neural Cell Apoptosis Through Inhibition of JNK Phosphorylation in SCI Rats and Excitotoxicity Induced by Glutamate In Vitro." International Journal of Neuroscience **122**(7): 381-387.

Ruan, S.-Q., Z.-H. Wang, et al. (2012). "Heregulin- $\beta$ 1-induced GPR30 upregulation promotes the migration and invasion potential of SkBr3 breast cancer cells via ErbB2/ErbB3-MAPK/ERK pathway." Biochemical and Biophysical Research Communications **420**(2): 385-390.

Saavedra, A., G. Baltazar, et al. (2008). "Driving GDNF expression: The green and the red traffic lights." Progress in Neurobiology **86**(3): 186-215.

Sakamoto, H., K. i. Matsuda, et al. (2007). "Expression of G Protein-Coupled Receptor-30, a G Protein-Coupled Membrane Estrogen Receptor, in Oxytocin Neurons of the Rat Paraventricular and Supraoptic Nuclei." Endocrinology **148**(12): 5842-5850.

Sariola, H. e M. Saarma (2003). "Novel functions and signalling pathways for GDNF." Journal of Cell Science **116**(19): 3855-3862.

Savitt, J. M. (2006). "Diagnosis and treatment of Parkinson disease: molecules to medicine." Journal of Clinical Investigation **116**(7): 1744-1754.

Schapira, A. H. V. (2009). "Etiology and Pathogenesis of Parkinson Disease." Neurologic Clinics **27**(3): 583-603.

Scott, B., A. Borgman, et al. (2000). "Gender differences in Parkinson's disease symptom profile." Acta Neurologica Scandinavica **102**(1): 37-43.

Serrano-Pozo, A., M. P. Frosch, et al. (2011). "Neuropathological alterations in Alzheimer disease." Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine **1**(1): a006189.

Shimizu, K., K. Ohtaki, et al. (2001). "Carrier-mediated processes in blood-brain barrier penetration and neural uptake of paraquat." Brain Research **906**(1): 135-142.

Shughrue, P. J., Scrimo, P. J., and Merchenthaler, I. (1998). "Evidence for the colocalization of estrogen receptor- $\beta$  mRNA and estrogen receptor- $\beta$  immunoreactivity in neurons of the rat forebrain." Endocrinology **139**(12): 5267-5270.

Simpkins, J. W., J. Wang, et al. (2005). "Mitochondria play a central role in estrogen-induced neuroprotection." Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders **4**(1): 69-83.

Singer, T. P. e R. R. Ramsay (1990). "Mechanism of the neurotoxicity of MPTP: an update." FEBS letters **274**(1): 1-8.

Sohrabji, F. e D. K. Lewis (2006). "Estrogen–BDNF interactions: Implications for neurodegenerative diseases." Frontiers in Neuroendocrinology **27**(4): 404-414.

Sohrabji, F., R. C. Miranda, et al. (1994). "Estrogen differentially regulates estrogen and nerve growth factor receptor mRNAs in adult sensory neurons." Obstetrical & Gynecological Survey **49**(7): 495-497.

Thomas, P. (2004). "Identity of an Estrogen Membrane Receptor Coupled to a G Protein in Human Breast Cancer Cells." Endocrinology **146**(2): 624-632.

Toran-Allerand, C. D., R. C. Miranda, et al. (1992). "Estrogen receptors colocalize with low-affinity nerve growth factor receptors in cholinergic neurons of the basal forebrain." Proceedings of the National Academy of Sciences **89**(10): 4668-4672.

Trupp M., B. N., Funakoshi H. & Ibanez C.F. (1997). "Complementary and Overlapping Expression of Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor (GDNF), c-ret Proto-Oncogene, and GDNF Receptor- $\alpha$ Indicates Multiple Mechanisms of Trophic Actions in the Adult Rat CNS." J Neurosci **17**(10): 3554-3567.

Tseng, J. L., E. E. Baetge, et al. (1997). "GDNF reduces drug-induced rotational behavior after medial forebrain bundle transection by a mechanism not involving striatal dopamine." The Journal of Neuroscience **17**(1): 325-333.

Van Den Eeden, S. K. (2003). "Incidence of Parkinson's Disease: Variation by Age, Gender, and Race/Ethnicity." American Journal of Epidemiology **157**(11): 1015-1022.

Viñas, R. e C. S. Watson (2013). "Bisphenol S Disrupts Estradiol-Induced Nongenomic Signaling in a Rat Pituitary Cell Line: Effects on Cell Functions." Environmental Health Perspectives **121**(3): 352-358.

Wakabayashi, K., F. Mori, et al. (2006). "Progression patterns of neuronal loss and Lewy body pathology in the substantia nigra in Parkinson's disease." Parkinsonism & Related Disorders **12**(S2): S92-S98.

Walker, Q., M. Rooney, et al. (1999). "Dopamine release and uptake are greater in female than male rat striatum as measured by fast cyclic voltammetry." Neuroscience **95**(4): 1061-1070.

Wooten, G. F. (2004). "Are men at greater risk for Parkinson's disease than women?" Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry **75**(4): 637-639.