



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências

**Expressão de GDNF em células estriatais: efeito de
fatores solúveis libertados por células do mesencéfalo
ventral após lesão dopaminérgica**

Susana Martins Gama

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

Orientador: Prof. Doutora Carla Fonseca

Co-orientador: Prof. Doutora Graça Baltazar

Covilhã, Junho de 2012

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todos aqueles que contribuíram de forma decisiva para a realização deste trabalho. A todos eles deixo aqui o meu agradecimento sincero.

À Prof. Doutora Carla Fonseca, por todos os ensinamentos, disponibilidade, paciência, compreensão e apoio manifestados na orientação deste trabalho. Agradeço o empenho, interesse e encorajamento nos momentos mais difíceis.

À Prof. Doutora Graça Baltazar, pela transmissão de conhecimentos, espírito crítico e incentivo. Obrigado por todos os conselhos que se revelaram muito úteis no desenvolvimento deste trabalho.

À Prof. Doutora Liliana Bernardino quero agradecer a cooperação e disponibilidade para ajudar, que sempre manifestou.

Aos meus colegas de mestrado, Diana, Paulo, Rita, Joel, Estela e Ana, agradeço a ajuda, o espírito de equipa, a amizade e o acompanhamento na realização deste trabalho.

A todos os meus amigos, em especial à Ana Isabel e à Carina, que mesmo à distância nunca deixaram de me apoiar, incentivar e transmitir força. Obrigado pela vossa amizade.

Aos meus pais, pelo apoio incondicional ao longo de toda a minha vida, motivação e paciência. O meu muito obrigado, sem vocês não seria possível.

A toda a minha restante família gostaria de agradecer o apoio e incentivo que sempre demonstraram.

Resumo

A doença de Parkinson (DP) é uma doença neurodegenerativa caracterizada pela degeneração progressiva dos neurónios dopaminérgicos (DA) que projetam da *substantia nigra* (SN) *pars compacta* para o estriado, o que leva à redução dos níveis de dopamina nesta região encefálica. A principal abordagem terapêutica no tratamento da DP é a reposição da dopamina na forma do seu precursor L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA). Embora esta terapia controle os sintomas nos estágios iniciais da doença, não é curativa e pode originar efeitos secundários.

O uso de fatores neurotróficos pode ser uma estratégia terapêutica devido à sua capacidade de promoverem a sobrevivência, diferenciação, manutenção e proteção dos neurónios contra lesões. O fator neurotrófico derivado de uma linha de células da glia (GDNF) é um potente fator neurotrófico dos neurónios DA da via nigroestriatal. Os aumentos na expressão de GDNF em células de estriado protegem os neurónios DA contra a lesão da via nigroestriatal induzida por toxinas e promovem a recuperação de neurónios lesados, sugerindo que o GDNF endógeno pode ser neuroprotetor. Assim, a estimulação farmacológica da síntese de GDNF endógeno no estriado poderá vir a ser uma potencial escolha no tratamento da DP.

O principal objetivo deste trabalho foi avaliar se a libertação de moléculas solúveis em consequência da lesão dopaminérgica é capaz de induzir alterações na expressão de GDNF em células de estriado. Utilizaram-se culturas do mesencéfalo ventral obtidas a partir de ratos recém-nascidos ou embriões expostas a H_2O_2 ou L-DOPA para recolher os meios condicionados, que posteriormente foram aplicados em culturas de estriado. Avaliou-se a expressão de GDNF ao nível da proteína e do mRNA nas células estriatais por Western blot e PCR em tempo real, respetivamente. A lesão dopaminérgica foi avaliada através da expressão de tirosina hidroxilase (TH), por Western blot, e da contagem do número de células que expressam TH, por microscopia de fluorescência.

Verificou-se que os fatores solúveis libertados por culturas mistas do mesencéfalo ventral expostas a $50\mu M$ de H_2O_2 ou $200\mu M$ de L-DOPA induziram um aumento nos níveis de mRNA do GDNF nas células do estriado. Este aumento é desencadeado por mediadores solúveis libertados apenas na presença de neurónios DA, pois não observámos aumentos de GDNF nas células estriatas após exposição aos fatores solúveis libertados apenas por astrócitos do mesencéfalo ventral, previamente incubados com os mesmos agentes oxidantes. Foram testadas concentrações superiores de H_2O_2 e L-DOPA em culturas embrionárias mistas do mesencéfalo ventral. Foi observada uma diminuição no número de células TH^+ nestas culturas quando expostas a $600\mu M$ de L-DOPA ou $400\mu M$ de H_2O_2 . Verificámos também que os fatores solúveis libertados após lesão dopaminérgica induziram aumentos de GDNF nas células estriatais.

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que após lesão dos neurónios DA, as células do mesencéfalo ventral libertam mediadores solúveis que atuam ao nível das células estriatais, induzindo um aumento na expressão de GDNF nessas células, provavelmente como uma estratégia neuroprotetora. Assim, estes resultados poderão contribuir para uma melhor compreensão do papel do GDNF estriatal no contexto da lesão dopaminérgica. A manipulação dos níveis endógenos deste fator neurotrófico poderá, no futuro, constituir uma alternativa no tratamento de doenças neurodegenerativas, como a DP.

Palavras-chave

Doença de Parkinson, Estriado, GDNF, Neurónios dopaminérgicos, Neuroprotecção.

Abstract

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disorder characterized by the progressive degeneration of dopaminergic (DA) neurons that project from the *substantia nigra* (SN) *pars compacta* to the striatum, which leads to the reduction of dopamine levels in this brain region. The main therapeutic approach in the treatment of PD is dopamine replacement in the form of its precursor L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA). Although this therapy control the symptoms in the early stages of the disease it is not curative and may cause side effects.

The use of neurotrophic factors can be a therapeutic strategy due to their ability to promote survival, differentiation, maintenance and protection of neurons against injury. Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) is a potent neurotrophic factor for DA neurons of the nigrostriatal pathway. Increases in GDNF expression in striatal cells protect DA neurons against toxin-induced nigrostriatal pathway injury and promote recovery of damaged neurons, suggesting that endogenous GDNF can be neuroprotective. Thus, the pharmacological stimulation of striatal endogenous GDNF synthesis can be a potential choice for the treatment of PD.

The main objective of this study was to examine whether the release of soluble molecules as a result of DA injury is capable to induce changes in GDNF expression in striatal cells. We used postnatal and embryonic ventral midbrain cultures exposed to H₂O₂ or L-DOPA to collect conditioned media, which were subsequently applied to the striatal cultures. We assessed GDNF expression at mRNA and protein level in striatal cells by Western blot and real time PCR, respectively. The DA injury was evaluated by tyrosine hydroxylase (TH) expression, by Western blot, and by counting the number of cells expressing TH, using fluorescence microscopy.

We found that soluble factors released by postnatal neuron-glia ventral midbrain cultures exposed to 50 μ M H₂O₂ or 200 μ M L-DOPA induced an increase in GDNF mRNA levels on striatal cells. This increase is triggered by soluble mediators released only in the presence of DA neurons, since there was no increase in striatal GDNF after exposure to soluble factors released by ventral midbrain astrocytes, previously incubated with the same oxidizing agents. We tested higher concentrations of H₂O₂ and L-DOPA in mixed embryonic ventral midbrain cultures. We observed a decrease of TH⁺ cells in these cultures exposed to 600 μ M L-DOPA or 400 μ M H₂O₂. We also found that soluble factors released upon DA injury induced GDNF up-regulation in striatal cultures.

The present results indicate that upon DA neurons injury, ventral midbrain cells release soluble mediators that increase GDNF expression in striatal cells, probably as a neuroprotective strategy. Thus, these results may contribute to a better understanding the role of endogenous striatal GDNF in the context of DA injury. The manipulation of the endogenous levels of this neurotrophic factor may constitute, in the future, an alternative in treatment of neurodegenerative diseases, such as PD.

Keywords

Dopaminergic neurons, GDNF, Neuroprotection, Parkinson's disease, Striatum.

Índice

Agradecimentos	iii
Resumo	v
Palavras-Chave	vi
Abstract	vii
Keywords	ix
Lista de Figuras	xiv
Lista de Tabelas	xvii
Lista de Acrónimos	xix
Capítulo 1- Introdução	1
1.1. Doenças Neurodegenerativas	1
1.1.1. Doença de Parkinson	1
1.2. Fatores neurotróficos: importância do GDNF	3
1.2.1. Papel do GDNF na via nigrostriatal	5
1.2.2. GDNF na lesão nigrostriatal	6
1.2.3. GDNF como mediador na comunicação neurónios-astrocitos-microglia	8
1.2.4. GDNF e stress oxidativo	10
Capítulo 2- Objetivos	13
Capítulo 3- Materiais e métodos	14
3.1. Materiais	14
3.2. Preparação das culturas celulares	14
3.2.1. Culturas de astrócitos do mesencéfalo ventral	14
3.2.2. Culturas mistas de astrócitos e neurónios do mesencéfalo ventral	15
3.2.3. Culturas embrionárias de neurónios do mesencéfalo ventral	16
3.2.4. Culturas embrionárias mistas de astrócitos e neurónios do mesencéfalo ventral	17
3.2.5. Culturas mistas de astrócitos e neurónios do estriado	17
3.3. Preparação e aplicação dos meios condicionados	17
3.4. Preparação dos extratos celulares e quantificação da proteína total	18
3.5. Western blot	18
3.6. Extração de RNA	19
3.7. Síntese de cDNA	20

3.8. PCR em tempo real	20
3.9. Imunocitoquímica	21
3.10. Análise de dados e estatística	22
Capítulo 4- Resultados	23
4.1. Efeito dos fatores solúveis libertados por culturas mistas do mesencéfalo ventral, expostas a L-DOPA ou H ₂ O ₂ , nos níveis de mRNA do GDNF em culturas mistas de estriado	23
4.2. Efeito dos meios condicionados por astrócitos do mesencéfalo ventral, expostos a L-DOPA ou H ₂ O ₂ , na expressão de GDNF em células estriatais	24
4.3. Efeito dos meios condicionados de culturas embrionárias mistas e de neurónios do mesencéfalo ventral expostas a L-DOPA ou H ₂ O ₂ , na expressão de GDNF em culturas mistas de estriado	26
4.4. Avaliação da lesão neuronal em culturas embrionárias mistas e de neurónios do mesencéfalo ventral expostas a L-DOPA ou H ₂ O ₂	29
4.4.1- Determinação da expressão de TH	29
4.4.2. Quantificação das células TH positivas	30
4.4.3. Quantificação dos neurónios totais	30
4.5. Indução de lesão dopaminérgica com diferentes concentrações de L-DOPA e H ₂ O ₂ : que efeito tem ao nível da expressão de GDNF estriatal?	31
4.5.1. Determinação da expressão de GDNF	32
4.5.2. Quantificação do número de células TH positivas	33
Capítulo 5- Discussão dos Resultados	34
Capítulo 6- Conclusão	40
Capítulo 7- Perspetivas Futuras	41
Capítulo 8- Referências Bibliográficas	42

Lista de Figuras

- Figura 1** - Vias neuronais que degeneram na Doença de Parkinson. 2
- Figura 2** - Interação do GDNF com o seu recetor. 4
- Figura 3** - Efeito dos meios condicionados de culturas mistas do mesencéfalo ventral, expostas a 200 μ M de L-DOPA ou 50 μ M de H₂O₂, nos níveis de mRNA do GDNF em culturas mistas de estriado. 23
- Figura 4** - Efeito dos MC por culturas de astrócitos do mesencéfalo ventral, previamente expostas a 200 μ M de L-DOPA (A) e 50 μ M de H₂O₂ (B) durante os períodos de tempo indicados, na expressão de GDNF em culturas mistas de estriado. 25
- Figura 5** - Imagem de fluorescência representativa das culturas embrionárias de neurónios do mesencéfalo ventral (A) e das culturas embrionárias mistas do mesencéfalo ventral (B). 27
- Figura 6** - Expressão de GDNF em culturas mistas de estriado incubadas com MC de culturas embrionárias mistas (A) e de neurónios (B) do mesencéfalo ventral expostas a 200 μ M de L-DOPA (L200) e 50 μ M de H₂O₂ (H50), durante 1 hora. 28
- Figura 7** - Expressão de TH em culturas embrionárias mistas (A) e de neurónios (B) do mesencéfalo ventral incubadas com 200 μ M de L-DOPA (L200) e 50 μ M de H₂O₂ (H50) durante 1 hora. 29
- Figura 8** - Avaliação da extensão da lesão dopaminérgica em culturas embrionárias mistas (A) e de neurónios (B) do mesencéfalo ventral incubadas com 200 μ M de L-DOPA (L200) e 50 μ M de H₂O₂ (H50), durante 1 hora. 30
- Figura 9** - Avaliação da lesão dos neurónios em culturas embrionárias mistas (A) e de neurónios (B) do mesencéfalo ventral expostas a 200 μ M de L-DOPA (L200) e 50 μ M de H₂O₂ (H50), durante 1 hora. 31
- Figura 10** - Expressão de GDNF em culturas mistas de estriado incubadas com MC de culturas embrionárias mistas do mesencéfalo ventral expostas a diferentes concentrações de L-DOPA (400 μ M, 600 μ M e 800 μ M; L400, L600 e L800, respetivamente) (A) ou de H₂O₂ (100 μ M, 200 μ M, 400 μ M; H100, H200 e H400, respetivamente) (B), durante 1 hora. 32

Figura 11 - Avaliação da extensão da lesão dopaminérgica em culturas embrionárias mistas do mesencéfalo ventral expostas a 600 μ M de L-DOPA e 400 μ M de H₂O₂, durante 1 hora.

33

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Características dos <i>primers</i> específicos para o GDNF e GAPDH, usados para as reações de PCR em tempo real.	21
Tabela 2 - Características do protocolo dos ciclos de PCR em tempo real.	21

Lista de Acrónimos

6-OHDA	6-Hidroxidopamina
CAPS	Ácido ciclohexilamino propanosulfónico
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
d’NTPs	Deoxinucleótidos trifosfatados
DA	Dopaminérgicos
DEPC	Dietil pirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Doença de Parkinson
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenoaminotetracético
ERK	Quinase regulada por sinalização extracelular
FBS	Soro fetal bovino
FDU	5-Fluorodesoxiuridina
GDNF	Fator neurotrófico derivado de uma linha de células da glia
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
GFR α	Recetor α da família do GDNF
GSH	Glutathione
IL	Interleucina
JNK	Quinase c-Jun N-terminal
L-DOPA	L-3,4-dihidroxifenilalanina
MAP2	Proteína 2 associada aos microtúbulos
MAPK	Proteína quinase ativada por mitogénios
MC	Meio condicionado
MEM	Meio mínimo essencial de Eagle
M-MLV RT	Enzima Transcriptase Reversa do Vírus da Leucemia Murínica de Moloney
MNB	Meio Neurobasal
MPP ⁺	1-metil-4-fenilpiridina
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
NCAM	Molécula de adesão celular neural
PBS	Tampão fosfato salino
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase
PLC γ	Fosfolipase C- γ
PSA	Persulfato de amónio
RET	Recetor de quinase de tirosina
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Espécies reativas de oxigénio

SDS	Dodecil sulfato de sódio
SNC	Sistema nervoso central
TBS-T	Tampão salino de Tris e Tween
TEMED	Tetrametiletilenodiamina
TH	Tirosina hidroxilase
TRI	Trizol

Capítulo 1

Introdução

1.1. Doenças neurodegenerativas

As doenças neurodegenerativas são caracterizadas pela perda lenta e progressiva de neurónios no sistema nervoso central (SNC), o que leva a défices de funções específicas associadas à região do SNC afetada (por exemplo, a memória, cognição e movimento). Estas doenças incluem a doença de Alzheimer, doença de Parkinson (DP), esclerose lateral amiotrófica, esclerose múltipla, doença de Huntington e atrofia multi-sistémica (Gao & Hong, 2008).

Vários fatores têm sido apontados como possíveis causas para o aparecimento destas doenças; entre eles, tem sido sugerido que defeitos na degradação e agregação de proteínas, stress oxidativo e formação de radicais livres, disfunções bioenergéticas mitocondriais comprometidas e processos neuroinflamatórios possam ter um papel na patogénese destas doenças (revisto por Cacciatore et al., 2012).

Variações nos níveis dos fatores neurotróficos, devido a alterações na sua síntese, libertação ou atividade, associadas a fatores genéticos ou ao envelhecimento, também podem estar envolvidas na perda neuronal observada em doenças neurodegenerativas como a DP (revisto por Siegel & Chauhan, 2000; revisto por Mattson & Magnus, 2006).

1.1.1. Doença de Parkinson

A DP é a segunda doença neurodegenerativa mais comum e afeta 1-2% da população com idade superior a 65 anos (Hastings, 2009). Os principais sintomas da DP incluem uma dificuldade em iniciar movimento, lentidão de movimentos (bradicinesia), rigidez e tremores em repouso (Kirik et al., 2004), bem como problemas não motores, tais como distúrbios cognitivos, afetivos e autónomos (Hurelbrink & Barker, 2004).

Esta doença caracteriza-se por uma grave deficiência de dopamina no estriado, resultante de uma degeneração seletiva e progressiva dos neurónios dopaminérgicos (DA) na *substantia nigra (SN) pars compacta* (Hong et al., 2009) que estendem os seus axónios principalmente para o estriado dorsal (caudado-putamen) para formar a via nigrostriatal, essencial para o controlo do comportamento motor voluntário (Figura 1). A degeneração axonal progressiva do sistema nigrostriatal, bem como de outros sistemas neuroquímicos, conduz a uma transmissão dopaminérgica aberrante. Além disso, a interrupção da sinalização glutamatérgica,

serotoninérgica e colinérgica normal pode ocorrer independentemente da transmissão dopaminérgica na DP (Wakeman et al., 2011).

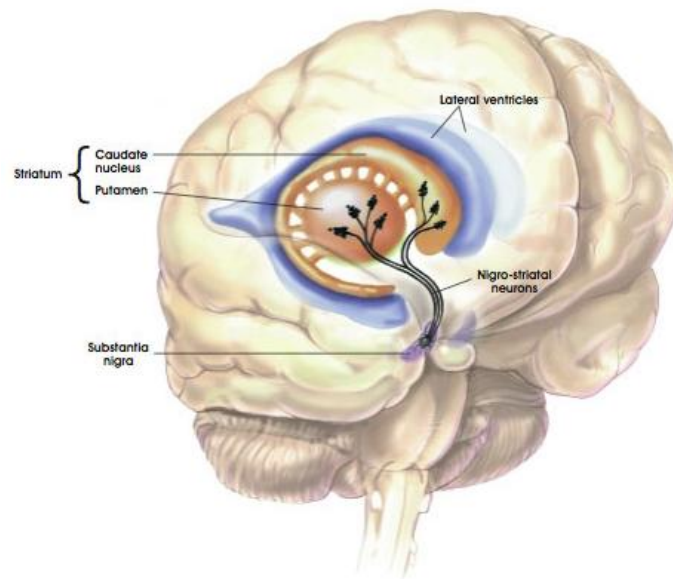


Figura 1. Vias neuronais que degeneram na Doença de Parkinson. Os sinais que controlam os movimentos do corpo são transmitidos ao longo dos axônios que projetam da SN *pars compacta* para o estriado (caudado-putamen). Estes neurónios nigrostriatais libertam dopamina nos seus alvos no estriado. Em doentes de Parkinson, os neurónios DA na via nigrostriatal degeneram (adaptada de National Institutes of Health, 2001).

Esta doença é também caracterizada pela formação de corpos de Lewy (Gaig & Tolosa, 2009). Mutações nos genes que codificam a α -sinucleína, parkina e hidrolase L1 C-terminal da ubiquitina, foram identificadas em formas familiares da DP e pensa-se que possam causar degeneração nigral através da disfunção no *handling* das proteínas. Existe uma vasta gama de proteínas agregadas nos corpos de Lewy, que incluem a α -sinucleína, ubiquitina, neurofilamento e outras proteínas nitradas ou danificadas oxidativamente (Du et al., 2007). Várias evidências têm sugerido que a falha do sistema ubiquitina-proteossoma para remover proteínas *misfolded* pode desempenhar um importante papel na etiopatogenia da DP (revisito por Ardley & Robinson, 2004).

A perda de células nigrais acontece durante muitos anos, durante a fase inicial sintomática, durante a manifestação da DP e durante o grave estágio final. No início da doença, aquando dos primeiros sinais, cerca de 50% dos neurónios DA foram perdidos, e existe uma perda adicional de 45%, em média, dentro da primeira década, acompanhada por uma deservação dopaminérgica estriatal profunda (Kirik et al., 2004).

1.2. Fatores neurotróficos: importância do GDNF

Os fatores neurotróficos são proteínas secretadas que regulam o desenvolvimento, manutenção, função e plasticidade do sistema nervoso dos vertebrados. Quatro das classes principais de moléculas que compreendem a família dos fatores neurotróficos são: a neurotrofina familiar, o fator neurotrófico derivado de uma linha de células da glia (GDNF), as citocinas neurotróficas, e a família do fator neurotrófico da dopamina cerebral (CDNF) e do fator neurotrófico derivado de astrócitos mesencefálicos (MANF) (revisado por Aron & Klein, 2011).

Os fatores neurotróficos endógenos regulam a morte celular natural durante o desenvolvimento e preservam as inervações alvo e a sobrevivência das células durante a vida pós-natal. Um declínio na produção dos fatores neurotróficos ou uma transdução de sinal comprometida em neurónios envelhecidos pode contribuir para a neurodegeneração patológica (Kramer et al., 2007). Estes fatores surgiram assim como promissores agentes terapêuticos para doenças neurodegenerativas, incluindo a DP (revisado por Aron & Klein, 2011), pois regulam a diferenciação neuronal, a manutenção do fenótipo e atividade sináptica, protegem os neurónios adultos de lesões mecânicas, tóxicas ou isquêmicas, e interferem na morte de neurónios por necrose ou apoptose (Sanchez et al., 2009).

O GDNF foi originalmente isolado a partir do sobrenadante da linha celular de glioblastoma B49 de rato e descobriu-se ser um potente fator de sobrevivência para os neurónios DA do mesencéfalo (Lin et al., 1993). Desde então tem-se demonstrado que o GDNF promove a sobrevivência e diferenciação de muitos outros tipos de populações neuronais, tais como neurónios motores da coluna vertebral e central, neurónios noradrenérgicos do tronco cerebral, neurónios colinérgicos do prosencéfalo basal, neurónios entéricos, células de Purkinje do cerebelo e neurónios simpáticos e sensoriais (Sandhu et al., 2009).

O GDNF é uma proteína homodimérica, heterogeneamente glicosilada e com massa molecular entre os 33 e 45 KDa (revisado por Saavedra et al., 2008). É um membro da superfamília do fator de crescimento transformador β (TGF- β) e a sua sinalização é mediada por um sistema que consiste num recetor acoplado a um ligando glicosil-fosfatidilinositol (GPI), a família de recetores $\alpha 1$ do GDNF (GFR $\alpha 1-4$) e o recetor de sinalização transmembranar de quinase de tirosina RET, codificado pelo proto-oncogene c-ret (Sandhu et al., 2009; Cao et al., 2010). Este complexo induz a autofosforilação do recetor de tirosina e a ativação de uma cascata de transdução de sinal, levando finalmente à inibição da apoptose (Yang et al., 2009). O GDNF também pode ativar vias de sinalização intracelular através do recetor GFR $\alpha 1-4$ na ausência de RET (Sandhu et al., 2009; Cao et al., 2010).

O GDNF homodimérico liga-se primeiro ao GFR α 1 monomérico ou dimérico. Este complexo interage com duas moléculas RET, resultando na autofosforilação de resíduos de tirosina nos domínios intracelulares das proteínas RET, como indicado na Figura 2. A autofosforilação da tirosina é necessária para a atividade catalítica do RET e para a sinalização *downstream*, e constitui o primeiro evento intracelular da cascata de sinalização RET ativada por membros da família do ligando GDNF (Sariola & Saarma, 2003).

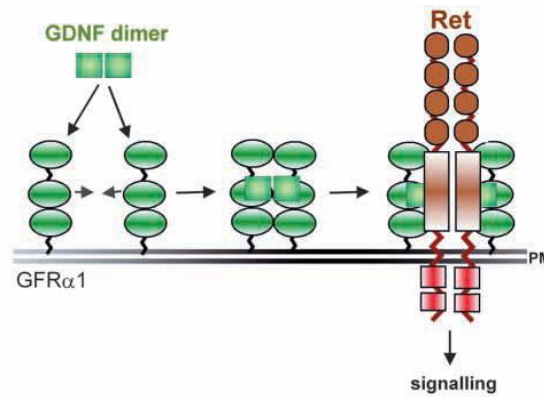


Figura 2. Interação do GDNF com o seu recetor. Um dímero de GDNF interage com duas moléculas de GFR α 1. Este complexo dimeriza duas moléculas de RET que conduzem à transfosforilação dos seus domínios de tirosina-quinase (Adaptada de Sariola & Saarma, 2003).

Tal como outros recetores de quinase de tirosina, o RET pode ativar diferentes vias de sinalização, incluindo a via da quinase regulada por sinalização extracelular Ras/ERK, via do fosfatidilinositol 3-quinase PI3K/Akt, via da proteína quinase ativada por mitogénios p38/MAPK, via da fosfolipase C- γ (PLC γ) e via da quinase c-Jun N-terminal (JNK). De entre as várias quinases de tirosinas do RET, demonstrou-se que a Tyr1062 está envolvida na ativação das vias Ras/Erk ou PI3K/AKT e é necessária para a diferenciação e sobrevivência de neurónios mediada pelo GDNF (Sariola & Saarma, 2003; Di Liberto et al., 2011).

Em 2003, Paratcha et al. confirmou que a molécula de adesão celular neural -140 (NCAM-140) poderia atuar como um recetor de sinalização transmembranar para o GDNF. Também foi descrito que o GDNF, quando injetado na SN de ratos, poderia ativar a via de sinalização da NCAM (Paratcha et al., 2003). Outras moléculas de adesão como as integrinas e N-caderinas também são expressas em neurónios DA. Estas não só são capazes de aderir às células, mas também mediar a transdução de sinal entre célula-célula ou célula-matriz extracelular. Estudos anteriores de Cao et al. (2010) sugeriram que a integrina β 1 e a N-caderina, importantes na transdução de sinal entre célula-célula ou célula-matriz extracelular e também expressas em neurónios DA (Cao et al., 2010), podem mediar a sinalização do GDNF, podendo ser outros recetores de sinalização transmembranares para o GDNF e estar envolvidos nos efeitos do GDNF nos neurónios DA em desenvolvimento (Paratcha et al., 2003; Cao et al., 2010).

1.2.1. Papel do GDNF na via nigrostriatal

O GDNF é expresso em elevados níveis em neurónios do estriado durante o desenvolvimento pós-natal e regula a morte natural dos neurónios DA da SN (revisto por Burke, 2004). O GDNF é também expresso na SN (Sarabi et al., 2001), contudo os níveis de mRNA de GDNF nesta região são muito mais baixos do que no estriado (Choi-Lundberg & Bohn, 1995; Oo et al., 2005). Os astrócitos reativos no sistema nigrostriatal também expressam vários fatores neurotróficos, incluindo o GDNF (Bresjanac & Antauer, 2000; Nakagawa & Schwartz, 2004).

A observação de transporte axonal retrógrado do GDNF em neurónios nigrostriatais adultos indica um papel de manutenção neuronal para o GDNF no sistema nervoso adulto (Tomac et al., 1995). Um suporte neurotrófico deficiente também foi sugerido como um fator envolvido na degeneração dos neurónios nigrostriatais na DP (revisto por Siegel & Chauhan, 2000). A hipótese de que o GDNF é um fator neurotrófico limitante para o desenvolvimento dos neurónios DA da SN é suportada pela observação de que a administração intraestriatal de GDNF durante o período de morte celular ontogenética suprime a apoptose dos neurónios DA da SN. Além disso, a neutralização do GDNF endógeno através da aplicação de anticorpos para o GDNF no estriado aumenta a morte celular (Oo et al., 2003).

A importância do GDNF para o desenvolvimento e manutenção da via nigroestriatal é reforçada por estudos que mostram que ratos que não expressam o recetor Ret apresentam perda progressiva de neurónios DA especificamente na SN, degeneração dos terminais nervosos DA no estriado e ativação glial acentuada (Kramer et al., 2007). Estes estudos sugerem fortemente que o GDNF desempenha um papel essencial no desenvolvimento do sistema nigrostriatal dopaminérgico, e que uma ligeira perturbação deste sistema devido a uma diminuição dos níveis de GDNF pode comprometer a sobrevivência dopaminérgica na vida adulta (revisto por Saavedra et al., 2008).

O GDNF atua em diferentes níveis induzindo a recuperação dos tecidos. Assim o GDNF induz o aparecimento de axónios DA e a inibição *antisense* da expressão de GDNF reduz o surgimento de axónios DA na lesão estriatal (Batchelor et al., 2000). O GDNF reduz a degeneração das fibras dopaminérgicas, um processo que é regulado por vias intracelulares, tais como o sistema ubiquitina-proteassoma (Gonzalez-Aparicio et al., 2010). A inibição deste sistema aumenta a degeneração dos neurónios DA, e o GDNF protege contra a inibição do proteassoma induzida pela degeneração dos neurónios DA, através da supressão do stress do retículo endoplasmático e da ativação da caspase-3 (Li et al., 2007).

Além de promover a sobrevivência dos neurónios DA, o GDNF também pode alterar a funcionalidade dopaminérgica em vários níveis, incluindo o reforço da síntese e metabolismo de dopamina, modulação transcricional de enzimas da biossíntese de dopamina, aumento da disponibilidade de dopamina e da excitabilidade dos neurónios DA (Yang et al., 2009).

A tirosina hidroxilase (TH) é uma enzima limitante da síntese de dopamina, cujo nível de expressão indica o estado da função do sistema DA nigrostriatal. Foi demonstrado que o GDNF poderia promover a expressão de TH nos neurónios DA da SN (Cao et al., 2010). A administração de GDNF aumenta a fosforilação da TH e, conseqüentemente, a atividade da TH e a síntese de dopamina no estriado de ratos. Estes efeitos do GDNF na atividade da TH são mediados pela ativação da MEK-1 e ERK (Gonzalez-Aparicio et al., 2010; Yang et al., 2009).

1.2.2. GDNF na lesão nigrostriatal

Entre as neurotoxinas utilizadas experimentalmente para induzir neurodegeneração dopaminérgica, a 6-hidroxidopamina (6-OHDA) e o 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), são as mais utilizadas (revisto por Dauer & Przedborski, 2003). A 6-OHDA tem algumas semelhanças estruturais com a dopamina e a norepinefrina, exibindo uma elevada afinidade para vários transportadores catecolaminérgicos. Assim, a 6-OHDA pode penetrar tanto em neurónios DA como noradrenérgicos e danificar as vias catecolaminérgicas no SNC e periférico, através de um efeito conjunto de espécies reativas de oxigénio (ROS) e quinonas (Bové et al., 2005). O MPTP é altamente lipofílico e atravessa rapidamente a barreira hemato-encefálica. A toxina MPTP é convertida no metabolito tóxico ativo 1-metil-4-fenilpiridina (MPP⁺), que se acumula nos neurónios DA e se liga ao complexo mitocondrial I levando a depleção de energia e formação de ROS (revisto por Dauer & Przedborski, 2003).

O trabalho inicial sobre a eficácia do GDNF em modelos animais da DP (usando 6-OHDA ou MPTP) envolveu o estudo dos efeitos de injeções ou infusões de GDNF administradas diretamente nos ventrículos laterais ou no parênquima cerebral. Isto demonstrou que o GDNF tem propriedades tanto de proteção como de reparação (administrado antes ou após a lesão, respetivamente), com injeções intra-estriatais, proporcionando melhorias mais consistentes na sobrevivência neuronal dopaminérgica e crescimento de fibras dopaminérgicas. No entanto, a administração de GDNF intranigral e intracerebroventricular também se tem mostrado benéfica (Hurelbrink & Barker, 2004).

Diversas experiências em modelos animais têm mostrado que o GDNF injetado diretamente na SN ou no estriado protege os neurónios DA de neurotoxinas, tais como 6-OHDA e MPTP. Existem também evidências para a restauração da função de neurónios lesados pelo GDNF após estes insultos tóxicos, embora as ações de reparação não sejam geralmente tão acentuadas como as ações neuroprotetoras (Peterson & Nutt, 2008).

A entrega de genes através de vetores virais que codificam para o GDNF tem demonstrado também prevenir a morte celular dopaminérgica e o enfraquecimento motor induzidos por vários insultos, tais como axotomia do feixe do prosencéfalo medial, injeção de 6-OHDA ou tratamento com MPTP (Yang et al., 2009; Xing et al., 2010). Um estudo de Connor (2001),

demonstrou que injeções estriatais de adenovírus de GDNF protegeram os terminais nigrostriatais e corpos celulares nigrais, mantendo a função motora num modelo animal da DP, enquanto injeções na SN não tiveram este efeito (Connor, 2001). Noutro estudo de Kordower e seus colaboradores (2000) foi usado um vetor de lentivírus para entregar o gene de GDNF por injeção estereotáxica no estriado e SN *in vivo* em macacos Rhesus, uma semana antes do tratamento com MPTP, o que resultou num aumento no número de neurónios DA TH positivos. Além disso, os macacos Rhesus tratados com o vetor lentiviral melhoraram o desempenho comportamental (Kordower et al., 2000).

Foi demonstrado que o sistema de entrega de segurança biológica de microesferas poliméricas biodegradáveis contendo pequenas quantidades de GDNF, implantáveis por cirurgia estereotáxica num modelo animal de DP, proporciona recuperação parcial das projeções de neurónios DA lesionados com 6-OHDA (Gouhier et al., 2002; Garbayo et al., 2009). O implante intra-estriatal de microesferas que distribuem GDNF ou células estaminais neurais programadas para produzir GDNF podem também melhorar o desempenho motor e prevenir a degeneração dopaminérgica em modelos animais da DP (Hurelbrink & Barker, 2004).

Verificou-se também noutros estudos que a implantação unilateral de células encapsuladas produtoras de GDNF no estriado de ratos uma semana antes da injeção intraestriatal de 6-OHDA produziu proteção substancial nos neurónios DA estriatais e da SN (Shingo et al., 2002; Sajadi et al., 2006).

Apesar de todos os resultados experimentais promissores com GDNF, a utilização clínica deste fator neurotrófico na DP é limitada devido ao tamanho da proteína. Com um peso molecular de cerca de 30 kDa, a molécula é demasiado grande para atravessar a barreira hematoencefálica (Mertens et al., 2009). Existem também outras dificuldades em aplicar diretamente o GDNF na via dopaminérgica, uma vez que os efeitos do GDNF são transitórios e o GDNF interage com recetores que estão amplamente distribuídos no cérebro (Grandoso et al., 2007). Por esta razão, pequenas moléculas que consigam transpor esta barreira e que sejam capazes de estimular a expressão de GDNF endógeno estriatal podem ser promissores neuroprotetores (Mertens et al., 2009; Xu et al., 2010).

Foi sugerido que o XIB4035, uma pequena molécula que atua como um agonista do recetor GFR α 1 e imita os efeitos neurotróficos do GDNF em células Neuro-2A, pode ter efeitos benéficos para o tratamento da DP (Tokugawa et al., 2003).

A incubação com PYM50028, um não-peptídeo indutor de fatores neurotróficos, mostrou também proteger culturas de neurónios DA do efeito tóxico de MPP⁺, um efeito quase completamente perdido na presença do anticorpo anti-GDNF e/ou anti-GFR α 1. A administração oral de PYM50028 em ratinhos lesados com MPTP resultou num aumento significativo dos níveis de GDNF no estriado e atenuação da perda dos neurónios DA da SN

(Visanji et al., 2008).O efeito protetor do catalpol, um componente ativo extraído e purificado a partir de *Rehmannia glutinosa* foi investigado num modelo animal de MPTP e em neurónios mesencefálicos tratados com MPP⁺.

A administração oral de catalpol melhorou a capacidade locomotora, elevou significativamente os níveis de dopamina no estriado e o número de neurónios TH positivos na SN. O tratamento com catalpol aumentou também os níveis estriatais de GDNF, e o número de neurónios DA foi positivamente correlacionado com os níveis de GDNF. Além disso, o catalpol protegeu os neurónios mesencefálicos em cultura contra a toxicidade por MPP⁺ e aumentou os níveis de mRNA de GDNF (Xu et al., 2010).

Descobrir moléculas como XIB4035, PYM50028 ou catalpol, capazes de estimular a expressão e sinalização de GDNF, pode revelar-se benéfico para o tratamento da DP e poderá superar a maioria dos problemas associados com o fornecimento de GDNF no cérebro, com a expressão de GDNF induzida por vetores virais ou com a utilização de células encapsuladas produtoras de GDNF (Bespalov & Saarma, 2007).

1.2.3. GDNF como mediador na comunicação neurónios-astrócitos-microglia

O tecido nervoso responde à lesão através da ativação de mecanismos de proteção e de reparação. Os neurónios lesados alteram a sua própria expressão génica e estimulam os astrócitos e células da microglia que estão próximos a fornecer suporte. Após a lesão, as células gliais parecem ser a fonte predominante de substâncias tróficas (revisto por Saavedra et al., 2008).

Os astrócitos são o tipo de célula mais abundante dentro do SNC (Blackburn et al., 2008). Formam domínios anatómicos altamente organizados com pouca sobreposição entre células adjacentes e estão interligados em redes funcionais através de junções de hiato (revisto por Allaman et al, 2011). Os astrócitos são células multifuncionais que têm um papel fundamental na homeostase do glutamato e água, contribuem para o processamento de informação em condições fisiológicas e são capazes de gerar uma resposta a qualquer tipo de insulto ao SNC. (Buffo et al., 2010; revisto por Allaman et al., 2011). Não fornecem apenas suporte trófico, metabólico e estrutural para os neurónios, mas desempenham também um papel ativo na comunicação do complexo neuronal-glial, sinalização sináptica e regulação do fluxo sanguíneo (Blackburn et al., 2008).

Na sua reação à lesão (astrogliose) deixam o seu estado de repouso e tornam-se ativados. Durante este processo, eles sofrem hipertrofia, aumentam os filamentos intermediários constituídos por nestina, vimentina e proteína ácida fibrilar glial (GFAP), e ativam a proliferação celular. Além disso, no seu estado reativo, os astrócitos podem continuar a

dividir-se e migram para o local da lesão onde formam a cicatriz glial e libertam vários fatores que medeiam a resposta inflamatória tecidual e regeneração após a lesão (Buffo et al., 2010).

Os papéis neuroprotetor e neurodegenerativo dos astrócitos dependem, em grande parte, das moléculas que libertam para o espaço extracelular, que é o microambiente que os astrócitos e os neurónios partilham. Por exemplo, os astrócitos podem libertar e fornecer aos neurónios fatores de crescimento e neurotróficos como o fator de crescimento neuronal (NGF), neurotrofina-3, GDNF, fator de crescimento de fibroblastos básico (bFGF), fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), bem como substratos metabólicos tais como lactato e o antioxidante glutatona para a sobrevivência e o normal funcionamento dos neurónios (Allaman et al, 2011; Rappold & Tieu, 2010).

Por seu lado, em caso de lesão, os neurónios libertam fatores para o meio que atuam nos astrócitos e os levam a aumentar a expressão e libertar fatores tróficos, que contribuem para a proteção desses neurónios e sua regeneração. Um estudo de Saavedra e seus colaboradores (2006) mostrou que os neurónios DA da SN, em resposta a uma lesão, podem libertar moléculas solúveis que atuam nos astrócitos aumentando a expressão de GDNF, a sua síntese e libertação, como uma estratégia neuroprotetora (Saavedra et al., 2006).

No entanto, os neurónios da SN que estão sob stress ou danificados, podem exacerbar a ativação microglial e induzi-la a libertar fatores neurotóxicos. Substâncias que são produzidas por neurónios DA lesados, e que podem ativar a microglia, incluem: agregados de α -sinucleína, adenosina trifosfato (ATP), e neuromelanina. As citocinas pró-inflamatórias, interleucina (IL)-1 β , fator de necrose tumoral (TNF- α), IL-2 e IL-6, são expressas em níveis muito baixos no cérebro saudável, mas têm sido encontradas em níveis muito mais elevados em pacientes com DP, no cérebro *post-mortem*, bem como em soro e fluido cefalorraquidiano *in vivo* (Long-Smith et al., 2009).

Trabalhos recentes do nosso grupo mostraram que o GDNF, um mediador solúvel libertado por culturas de astrócitos do mesencéfalo ventral, é capaz de inibir a ativação microglial induzida pelo agente pró-inflamatório Zymosan A. Assim, a ação neuroprotetora do GDNF no sistema nigrostriatal pode resultar não apenas de um efeito direto sobre os neurónios DA, mas também através de um impacto indireto sobre estes, através da modulação de interações gliais e da cascata neuroinflamatória que ocorre na DP (Rocha et al., 2010).

1.2.4. GDNF e stress oxidativo

Os neurónios DA da SN são particularmente vulneráveis à degeneração e à exposição a stress oxidativo, pois o metabolismo da dopamina dá origem a várias moléculas que podem atuar como toxinas endógenas, se não tratadas adequadamente (Blum et al., 2001; revisto por Lotharius & Brundin, 2002). Outra característica única dos neurónios DA da SN é a presença do pigmento neuromelanina, que dá a esta região uma cor escura típica. Na SN, o pigmento contém dopamina reduzida e metabolitos da dopamina, bem como uma variedade de proteínas e lípidos. A neuromelanina é um antioxidante celular e armazena metais em neurónios pigmentados (Double, 2012). A auto-oxidação não enzimática da dopamina leva à formação de neuromelanina que potencia a formação de radicais hidroxilo quando combinada com ferro (Blum et al., 2001).

Assim, a progressão da DP é também devida a danos resultantes do stress oxidativo, não só devido à atividade da microglia (que se encontra aumentada em cérebros de doentes de Parkinson) mas também devido, em grande parte, ao aumento do *turnover* da dopamina nos neurónios (revisto por Peterson & Flood, 2012).

Depois de mais de 40 anos de uso clínico, a levodopa ou L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) continua a ser o principal fármaco utilizado no tratamento sintomático da DP. A L-DOPA é um precursor da dopamina e, ao contrário desta, atravessa a barreira hemato-encefálica tendo fácil acesso ao tecido nervoso. Em comparação com outras terapias dopaminérgicas disponíveis, a reposição da dopamina com L-DOPA está associada a uma melhoria na função motora (revisto por Poewe et al., 2010). A terapia com L-DOPA é altamente eficaz durante as fases iniciais do tratamento. Contudo, com o tratamento prolongado, muitos pacientes desenvolvem complicações motoras, como flutuações na resposta clínica e movimentos involuntários anormais (discinesia) (Löhle & Reichmann, 2010).

A L-DOPA pode no entanto induzir stress oxidativo nos neurónios DA. Em doses elevadas a L-DOPA é neurotóxica e pode levar à morte celular em neurónios devido à ativação da apoptose através das vias de sinalização ASK1 e MAP-K (revisto por Nagatsua & Sawadab, 2009; Liedhegner et al., 2011). A L-DOPA é facilmente oxidada não enzimaticamente, levando à produção de metabolitos altamente reativos que podem lesar organelos subcelulares e membranas celulares de neurónios DA (revisto por Nagatsua & Sawadab, 2009).

A dopamina tem uma boa reputação como neurotransmissor, mas ao mesmo tempo é um bom quelante de metais e doador de eletrões levando à geração de radicais livres tóxicos (Uttara et al., 2009). A dopamina pode auto-oxidar a pH normal, via monoamina oxidase (MAO) ou auto-oxidação de amins e pode dar origem a espécies de radicais superóxido, peróxido de hidrogénio (H₂O₂), semiquinonas, e quinonas. O H₂O₂ resultante do metabolismo ou auto-oxidação da L-DOPA e dopamina pode ser facilmente reduzido na presença de ferro ferroso

(Fe^{2+}) (os níveis deste são mais elevados na SN do que noutras regiões do cérebro), através da reação de Fenton originando o radical hidroxilo ($\text{HO}\cdot$), que é considerado o radical citotóxico mais prejudicial para as células vivas (Lotharius & Brundin, 2002; Pedrosa & Soares-da-Silva, 2002). Espécies reativas de oxigénio levam a alterações funcionais nas proteínas, DNA e lípidos. Os danos lipídicos, por sua vez, levam à perda da integridade da membrana e aumentam a permeabilidade a iões, como o cálcio, que pode promover excitotoxicidade (Lotharius & Brundin, 2002).

Outra das causas do aumento da produção das ROS mitocondriais e stress oxidativo é a disfunção mitocondrial na DP, que foi identificada como uma deficiência ou parcial inibição do Complexo I da cadeia transportadora de eletrões. O stress oxidativo é observado nos danos a macromoléculas, assim como na diminuição dos níveis de glutathiona (GSH). Como principal agente redutor na célula, a redução nos níveis de GSH é particularmente importante, especialmente porque encontra-se significativamente diminuída no início da DP (Hastings, 2009).

Smith & Cass (2007) investigaram a capacidade do GDNF para reduzir o stress oxidativo num modelo animal de DP. Neste estudo, os animais foram tratados com GDNF antes da administração de 6-OHDA. Mediu-se a dopamina no estriado e na SN para confirmar a capacidade do GDNF para reduzir a depleção de dopamina induzida pela 6-OHDA. Avaliaram-se compostos com grupos carbonilo e 4-hidroxinonenal para medir a capacidade do GDNF para reduzir ou inibir o stress oxidativo. Os resultados obtidos neste estudo sugerem que o GDNF, quando administrado antes da 6-OHDA, diminui o stress oxidativo induzido pela 6-OHDA e reduz a depleção de dopamina no estriado e na SN induzida por esta neurotoxina (Smith & Cass, 2007).

Num estudo de Sandhu e seus colaboradores (2009) examinaram-se os efeitos do GDNF, libertado por astrócitos que sobre-expressam este fator neurotrófico, em neurónios sujeitos a stress oxidativo induzido por 6-OHDA. Para isso, usaram co-culturas de neurónios-astroglia, o que criou condições para se estabelecerem contatos diretos e comunicação célula-célula. Tanto os astrócitos humanos como de rato transfetados com vetores de GFAP ou citomegalovírus secretaram GDNF biologicamente ativo e promoveram neuroproteção em condições de stress oxidativo (Sandhu et al., 2009).

Um estudo de Saavedra et al. (2006) demonstrou que a L-DOPA e o H_2O_2 estimulam a produção de GDNF em culturas mistas de neurónios-glia da SN mas não em culturas apenas de astrócitos, o que sugere que os neurónios têm um papel importante na estimulação da expressão de GDNF. Os neurónios podem regular esta produção por si só ou estimular as células gliais a produzir e libertar GDNF (Saavedra et al., 2006). Além disso, na presença de um anticorpo que reconhece o GDNF, a viabilidade celular dopaminérgica diminui em culturas de SN tratadas com H_2O_2 , mostrando que a regulação do GDNF endógeno em resposta ao H_2O_2

é capaz de proteger os neurónios DA na cultura (Saavedra et al., 2006). Anteriormente também tinha sido mostrado que em culturas neurónios-glia da SN, a regulação do GDNF em resposta ao H_2O_2 diminuiu a expressão de heme-oxigenase-1, um marcador de stress oxidativo (Saavedra et al., 2005). Noutro estudo de Saavedra et al. (2007) verificou-se que a toxicidade resultante da exposição de neurónios DA a H_2O_2 promove a libertação de mediadores solúveis, nomeadamente a interleucina $IL-1\beta$, que induzem aumentos na expressão de GDNF pelos astrócitos (Saavedra et al., 2007).

Os aumentos de GDNF podem assim proteger os neurónios DA contra a lesão induzida por toxinas e promover a recuperação de neurónios danificados. Vários estudos mostram aumentos na expressão de GDNF em células de estriado após lesão da via nigroestriatal, sugerindo que o GDNF endógeno pode ser neuroprotetor (Mosley et al., 2006; Peterson & Nutt, 2008). Assim, a estimulação farmacológica da síntese de GDNF endógeno no estriado poderá vir a ser uma potencial escolha no tratamento da DP.

Capítulo 2

Objetivos

O GDNF é um fator neurotrófico que protege os neurónios DA, logo poderá vir a ser usado com um agente terapêutico no tratamento da doença de Parkinson. É necessário compreender os mecanismos e sinais que podem regular a expressão endógena de GDNF no estriado após a lesão.

Assim, o objetivo geral deste trabalho foi analisar se a libertação de fatores solúveis por culturas do mesencéfalo ventral, em consequência da lesão dopaminérgica através da exposição a L-DOPA e H_2O_2 , é capaz de induzir alterações na expressão de GDNF em culturas de estriado.

Os objetivos específicos foram os seguintes:

- estudar o efeito dos fatores solúveis libertados por culturas mistas do mesencéfalo ventral, expostas a L-DOPA ou H_2O_2 , nos níveis de mRNA do GDNF em culturas mistas de estriado;
- analisar o efeito dos meios condicionados de culturas de astrócitos e culturas mistas de astrócitos e neurónios do mesencéfalo ventral, expostas a L-DOPA ou H_2O_2 , na expressão de GDNF em células estriatais;
- avaliar a lesão neuronal em culturas do mesencéfalo ventral expostas a L-DOPA ou H_2O_2 .

Capítulo 3

Materiais e Métodos

3.1. Materiais

A papaína, a L-DOPA, o H_2O_2 , a poli-D-Lisina, o meio mínimo essencial de Eagle (MEM) e os anticorpos primários anti-tubulina e anti-proteína 2 associada aos microtúbulos (MAP2) de coelho foram obtidos da Sigma. As placas de cultura foram obtidas da Nunc e da Orange. O meio neurobasal (MNB), o meio neurobasal-A (MNB-A) e o suplemento B27 foram adquiridos à Gibco, enquanto o soro fetal bovino (FBS) foi obtido da Biochrom. Os anticorpos secundários conjugados à fosfatase alcalina anti-coelho e anti-ratinho e o substrato da fosfatase alcalina ECF foram obtidos da GE Healthcare. O anticorpo primário anti-GDNF de coelho foi obtido da Santa Cruz Biotechnology, o anticorpo primário anti-TH de ratinho foi adquirido à BD Transduction Laboratories e o anticorpo primário anti-GFAP de galinha obteve-se da Chemicon. Os *Random Primers*, os deoxinucleótidos trifosfatados (d’NTPs), o tampão First-Strand 5x, o ditioneitol (DTT), a enzima Transcriptase Reversa do Vírus da Leucemia Murínica de Moloney (M-MLV RT), o Hoescht e os anticorpos secundários cabra anti-ratinho, cabra anti-coelho e cabra anti-galinha, conjugados com os fluoróforos Alexa Fluor® 488 ou Alexa Fluor® 594, foram obtidos da Invitrogen. A sonda Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2x) foi obtida da Fermentas Life Sciences e o meio de montagem foi obtido da Dako. Os restantes reagentes foram obtidos da Sigma, Merck, Biorad e Pancread.

3.2. Preparação das culturas celulares

3.2.1. Culturas de astrócitos do mesencéfalo ventral

Os animais foram manipulados de acordo com os requisitos éticos nacionais para a investigação animal e de acordo com a Convenção Europeia para a Proteção de Animais Vertebrados Usados para Fins Experimentais e Outros Fins Científicos. Para cada preparação da cultura de astrócitos do mesencéfalo ventral utilizaram-se 10 a 15 ratos Wistar recém-nascidos com 2 a 4 dias. Os animais foram decapitados, retiraram-se os encéfalos e colocaram-se numa caixa de Petri com tampão fosfato salino (PBS) frio ($NaCl$ 140mM, KCl 2,7mM, KH_2PO_4 1,5mM e Na_2HPO_4 8,1mM, pH 7,4). Dissecou-se a zona correspondente ao mesencéfalo ventral, retiraram-se as meninges e colocou-se o tecido em PBS frio. Os pedaços de tecido obtidos dividiram-se por dois tubos contendo a solução de digestão enzimática (papaína 20U/mL, cisteína 1mM, $CaCl_2$ 1,5mM, $NaCl$ 116mM, KCl 5,4mM, $NaHCO_3$ 26mM, $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ 2mM, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1mM, EDTA 0,5mM, glicose 25mM e vermelho de fenol 0,001%)

e colocaram-se a 37°C, sob agitação e com oxigenação, durante 10 minutos. A solução de digestão enzimática foi previamente esterilizada por filtração e colocada sob oxigenação e agitação durante aproximadamente 30 minutos antes da colocação do tecido. No final da digestão, retirou-se a solução sobrenadante e o tecido sedimentado foi lavado 3 vezes com M10C-G (MEM contendo FBS não inativado pelo calor 10%, glicose 0,34%, penicilina 12000 U/L, estreptomicina 12mg/L, anfotericina B 30µg/L e insulina 5mg/L) aquecido a 37°C, a fim de parar a digestão e remover os restos desta solução. Dissociou-se o tecido mecanicamente por ressuspensão com pontas estéreis com orifícios de tamanho 20G, 23G e 25G, sequencialmente. De seguida, centrifugou-se o tecido durante 3 minutos a 405×g, à temperatura ambiente (3K18C Bioblock Scientific; Sigma Laboratory Centrifuges) e no final removeu-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o sedimento em 10mL de M10C-G. Para efetuar a contagem das células viáveis preparou-se uma diluição 1:1 da suspensão celular com azul de tripano (0,4% de azul de tripano em 0,9% de NaCl) e contaram-se as células numa câmara de Neubauer, no microscópio ótico. A viabilidade das células foi determinada pela capacidade de exclusão do corante azul de tripano: as células viáveis apresentam membranas intactas, capazes de impedir a entrada do corante, enquanto as células mortas ou não viáveis são incapazes de o fazer, apresentando-se coradas de azul. A partir da média do número de células dos quatro quadrantes diluiu-se a suspensão celular em M10C-G de forma a obter uma densidade celular de $0,102 \times 10^6 / \text{cm}^2$ e cultivaram-se as células em placas de 12 poços previamente revestidas com poli-D-Lisina (0,1mg/mL). As células foram então colocadas numa incubadora a 37°C, numa atmosfera humidificada contendo 95% de ar e 5% de CO₂. Aproximadamente duas horas após a cultura, efetuaram-se três lavagens com MEM frio, com o objetivo de remover restos celulares e neurónios presentes. No final adicionou-se M10C-G aquecido e colocaram-se as células de novo a 37°C.

3.2.2. Culturas mistas de astrócitos e neurónios do mesencéfalo ventral

Os neurónios foram cultivados sobre uma monocamada de astrócitos sete dias após o seu isolamento (descrito na secção 3.2.1). Dois dias antes do isolamento dos neurónios substituiu-se o meio M10C-G das culturas de astrócitos por MNB-A suplementado (suplemento B27 a 2%, FBS inativado pelo calor a 1%, glutamato 0,4mM, HCl 0,5mM e quinurenato 0,05mM).

O isolamento de neurónios foi semelhante ao isolamento de astrócitos, existindo no entanto algumas diferenças: utilizaram-se ratos Wistar recém-nascidos com 2 a 3 dias; na dissecção do mesencéfalo ventral eliminou-se a área tegmental ventral VTA, fazendo um corte vertical paramediano à esquerda e à direita para separar a SN da VTA; a solução de digestão enzimática continha HCl 2,5mM e quinurenato 0,5mM, para além dos outros componentes da solução de digestão utilizada para o isolamento de astrócitos; o meio utilizado durante o

isolamento e cultura foi o MNB-A com soro, em vez do meio M10C-G e a densidade celular utilizada foi de $0,109 \times 10^6 / \text{cm}^2$.

Um dia após o isolamento dos neurónios, inibiu-se o crescimento dos astrócitos com 5-fluorodesoxiuridina (FDU) (FDU $27 \mu\text{M}$ e uridina $68 \mu\text{M}$). As experiências nestas culturas mistas foram realizadas três dias após o isolamento de neurónios, sendo o meio substituído por MNB-A sem soro (mesma composição do MNB-A com soro, mas sem FBS) aproximadamente 12 horas antes do tratamento.

3.2.3. Culturas embrionárias de neurónios do mesencéfalo ventral

Sacrificou-se uma fêmea grávida com 15 a 16 dias de gestação, retiraram-se os embriões e colocaram-se numa caixa de petri contendo PBS frio. Dissecou-se a zona correspondente ao mesencéfalo ventral, colocou-se o tecido num tubo com 7,5mL de PBS e adicionaram-se 2,5mL da solução de digestão enzimática (tripsina 4,5mg/mL e DNase 2,5 mg/mL dissolvidas em PBS), previamente filtrada e aquecida a 37°C. O tecido foi incubado nesta solução durante 10 minutos, a 37°C, sob agitação. No final da digestão, centrifugou-se o tecido a $88 \times g$, durante 1 minuto, à temperatura ambiente. De seguida desprezou-se o sobrenadante, adicionou-se ao sedimento 10mL de PBS contendo 10% de FBS inativado pelo calor e centrifugou-se a $88 \times g$ durante 1 minuto. O sobrenadante foi novamente desprezado e adicionaram-se 10mL de PBS. O tecido foi dissociado com uma pipeta de vidro de 5mL e com pontas estéreis com orifícios de tamanho 20G, 23G e 25G, sequencialmente. De seguida, centrifugou-se a $405 \times g$, durante 3 minutos e desprezou-se o sobrenadante. O sedimento contendo as células foi ressuspenso em MNB suplementado (MNB contendo suplemento B27 a 2%, glutamato $25 \mu\text{M}$, glutamina 0,5mM e gentamicina $120 \mu\text{g}/\text{mL}$) e fez-se uma diluição 1:1 da suspensão celular com azul de tripano, para efetuar a contagem das células viáveis. Cultivaram-se as células em placas de 12 poços, com e sem lamelas, previamente revestidas com poli-D-Lisina (0,1mg/ml), a uma densidade de $0,229 \times 10^6 / \text{cm}^2$, e colocaram-se numa incubadora a 37°C, numa atmosfera humidificada contendo 95% de ar e 5% de CO_2 .

As experiências nestas culturas foram realizadas cinco a seis dias após a sua preparação, sendo o meio substituído por MNB-A sem soro aproximadamente 12 horas antes do início das experiências.

3.2.4. Culturas embrionárias mistas de astrócitos e neurónios do mesencéfalo ventral

As culturas embrionárias mistas foram realizadas de modo idêntico às culturas embrionárias de neurónios com exceção do meio onde as células foram cultivadas, que consistiu em MNB suplementado onde se acrescentou 10% de FBS inativado pelo calor. Dois a três dias após o isolamento, inibiu-se o crescimento dos astrócitos com FDU.

3.2.5. Culturas mistas de astrócitos e neurónios do estriado

As culturas mistas de astrócitos e de neurónios do estriado foram efetuadas de modo semelhante às culturas mistas do mesencéfalo ventral, obtidas a partir de ratos recém-nascidos, com exceção da zona de interesse a dissecar. Nestas culturas, mudou-se o meio M10C-G das culturas de astrócitos para MNB-A com soro um dia antes do isolamento de neurónios. O meio de cultura foi substituído por MNB-A sem soro aproximadamente 12 horas antes do início das experiências.

3.3. Preparação e aplicação dos meios condicionados

As culturas de astrócitos do mesencéfalo ventral foram expostas a 200 μ M de L-DOPA ou 50 μ M de H₂O₂, durante diferentes tempos de incubação (0.5, 1, 3, 6 e 12 horas). Os meios condicionados (MC) foram recolhidos e aplicados nas culturas mistas de estriado durante 24 horas.

As culturas mistas de astrócitos e neurónios do mesencéfalo ventral foram expostas aos mesmos estímulos, durante 1 hora, e os MC foram aplicados nas culturas mistas de estriado em tempos distintos (0.5, 1, 3, 6 e 12 horas).

As culturas embrionárias mistas e de neurónios foram expostas a diferentes concentrações de L-DOPA (200 μ M, 400 μ M, 600 μ M e 800 μ M) e de H₂O₂ (50 μ M, 100 μ M, 200 μ M e 400 μ M), durante 1 hora. Os MC foram recolhidos e aplicados em culturas mistas de estriado durante 24 horas.

A solução primária de L-DOPA foi preparada em HCl 200mM. As diluições intermédias de L-DOPA e H₂O₂ foram preparadas em MEM, antes da sua adição às culturas celulares.

3.4. Preparação dos extratos celulares e quantificação da proteína total

No final das experiências, aspirou-se o meio experimental e adicionaram-se 17 μ L/cm² de meio de lise completo (DTT 1mM, fluoreto de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1mM, leupeptina 25 μ g/mL, Tris 25mM, ácido etilenoaminotetracético (EDTA) 2,5mM, ácido etilenoaminotetracético (EGTA) 2,5mM e Triton-X-100 a 0,2%) a cada poço. Raspou-se o fundo de cada poço e recolheu-se todo o extrato celular para tubos de microcentrífuga. As amostras foram sonicadas durante 5 minutos a frio e centrifugadas a 15800 \times g durante 10 minutos a 4°C, sendo o sobrenadante recolhido. A quantidade de proteína total presente na amostra foi determinada através do método de Bradford (Biorad Protein Assay), utilizando a albumina sérica de bovino como padrão. A leitura da absorvância foi realizada ao comprimento de onda de 595nm. Com os níveis de proteína total determinados por amostra calculou-se o volume de extrato celular a utilizar na eletroforese, de modo a aplicar 20 a 40 μ g de proteína total, dependendo da proteína a analisar (TH ou GDNF), em cada poço do gel.

3.5. Western blot

Os extratos celulares (preparados como descrito na secção 3.4) foram desnaturados por adição de solução desnaturante (Tris 100mM, glicina 100mM, dodecil sulfato de sódio (SDS) 4%, ureia 8M e azul de bromofenol 0,01%) e aquecimento a 100°C durante 5 minutos. Aplicaram-se os volumes de extrato celular anteriormente determinados num gel de acrilamida com 1,5mm de espessura. O gel de resolução foi preparado com acrilamida 12% (em Tris-HCl 1,5M (pH 8,8), SDS 10%, persulfato de amónio (PSA) 0,05% etetrametiletlenodiamina (TEMED) 0,05%). O gel de concentração continha acrilamida 4% (em Tris-HCl 0,5M (pH 6,8), SDS 10%, PSA 0,05% e TEMED 0,1%). A eletroforese das amostras e do padrão de pesos moleculares foi realizada a 160V, à temperatura ambiente, durante aproximadamente 1 hora, em tampão de eletroforese (Tris 25mM, glicina 192mM e SDS 0,1%). Após a eletroforese colocou-se o gel em tampão de eletrotransferência (ácido 3-ciclohexilamino-1-propanosulfónico (CAPS) 10 mM, metanol 10%, pH 11) durante 5 minutos, e ativaram-se as membranas de fluoreto de polivinilideno durante 5 segundos em metanol, seguido de 5 minutos em água e 15 minutos em tampão de eletrotransferência. Efetuou-se a eletrotransferência das amostras em tampão de eletrotransferência a 750mA, durante aproximadamente 1 hora e 30 minutos, a 4 °C e com agitação constante.

Terminada a eletrotransferência retiraram-se as membranas e procedeu-se ao bloqueio das ligações não específicas com tampão salino de Tris e Tween (TBS-T) (Tris 20mM, NaCl 137mM e Tween 0,1%, pH 7,6) contendo leite magro 5%, durante 1 hora, à temperatura ambiente e com agitação constante. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas com os anticorpos

primários anti-GDNF de coelho (1:1000), anti-TH de ratinho (1:5000) e anti-tubulina de ratinho (1:5000) diluídos em TBS-T e azida sódica 0,02%. A incubação foi feita durante a noite a 4 °C (exceto a incubação com anti-tubulina, que foi feita durante 1 hora à temperatura ambiente), sob agitação constante. Depois da incubação lavaram-se as membranas 3 vezes com TBS-T, durante 15 minutos cada, sob agitação constante. Posteriormente incubaram-se as membranas com os anticorpos secundários conjugados à fosfatase alcalina diluídos em TBS-T e azida sódica 0,02%: anti-coelho (1:20000) ou anti-ratinho (1:10000). A incubação com estes anticorpos decorreu durante 1 hora, à temperatura ambiente, e no final fizeram-se 3 lavagens de 15 minutos cada com TBS-T e sob agitação constante. De seguida, as membranas foram incubadas com o substrato da fosfatase alcalina ECF durante 5 minutos. As bandas foram detetadas através do aparelho Molecular Imager FX system (Biorad) e quantificadas por análise densitométrica usando o software Quantity One (Biorad).

3.6. Extração de RNA

Após incubação das culturas mistas de estriado com os MC das culturas mistas do mesencéfalo ventral, as células foram lisadas e ressuspendidas com o reagente Trizol (TRI) (0,1mL/cm²), de acordo com o protocolo do fabricante, para a extração de ácido ribonucleico (RNA) total. De seguida, as amostras foram colocadas 5 minutos à temperatura ambiente. Foram adicionados 200µL de clorofórmio por cada mL de TRI utilizado para a extração do RNA, agitaram-se vigorosamente os tubos e incubaram-se durante 10 minutos, à temperatura ambiente. Após a incubação procedeu-se a uma centrifugação a 15930×g (Mikro 200R, Hettich Zentrifugen), durante 15 minutos a 4°C, tendo-se obtido três fases distintas: uma fase orgânica vermelha inferior onde se encontram as proteínas, a interfase que contém o ácido desoxirribonucleico (DNA) e uma fase aquosa incolor superior onde está o RNA. Esta última fase foi recolhida com cuidado para um novo tubo, onde se adicionou isopropanol, numa proporção de 500µL por cada mL de TRI utilizado, de modo a precipitar o RNA. Homogeneizaram-se as amostras invertendo os tubos e incubaram-se durante 10 minutos, à temperatura ambiente. Centrifugaram-se as amostras a 15930×g, durante 15 minutos a 4°C, removeu-se o sobrenadante e lavou-se o sedimento de RNA através da adição de etanol 75% a -20°C (1mL por cada mL de TRI usado). De seguida homogeneizaram-se as amostras e procedeu-se a uma última centrifugação a 9570×g, durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi excluído e o sedimento foi seco ao ar durante aproximadamente 10 minutos. Ressuspendeu-se o sedimento contendo o RNA em 15µL de água tratada com 0.01 % dietil pirocarbonato (DEPC) (água livre de RNases). Os níveis de RNA total foram quantificados através do uso do espectrofotómetro UV/Vis NanoPhotometer (Implen), onde foi lida a densidade ótica (OD) a 260 e 280nm. A concentração de RNA total calculou-se com base na OD260 e no coeficiente de extinção para o RNA (40µg/mL), tendo em conta o fator de diluição utilizado. A qualidade do RNA foi analisada através da razão OD260/OD280 e consideraram-se adequados valores entre 1,7 e 2. Foi também efetuada uma eletroforese em

gel de agarose 1% em tampão Tris-acetato-EDTA (TAE) com brometo de etídio 0,1%, a 100V, durante aproximadamente 10 minutos, para verificar a integridade do RNA, e visualizaram-se as bandas obtidas sob luz ultravioleta.

3.7. Síntese de cDNA

Para a síntese de DNA complementar (cDNA) a partir de RNA total foram preparadas duas misturas (mix1 e mix2). A mix1 consistiu no volume de RNA total correspondente a 1µg, para cada amostra, *Random Primers* (0,3µg/µL), d’NTPs (10mM) e água DEPC; a mix2 preparou-se com tampão First-Strand 5x, DTT (0,1M), M-MLV RT (200U/µL) e água DEPC. A mix1 foi incubada no termociclador (My Cycloer™, thermal cycler, Biorad) durante 5 minutos a 65°C. De seguida os tubos foram retirados do termociclador e adicionaram-se 8µL da *mix2* a cada um deles, sendo novamente incubados no termociclador durante 10 minutos a 25°C, 1 hora a 37°C e 15 minutos a 75°C.

3.8. PCR em tempo real

As seqüências de bases dos *primers* para o GDNF e para a desidrogenase do gliceraldeído 3-fosfato (GAPDH) encontram-se na Tabela 1. Foi preparada uma mistura em que se adicionou 1µL de cDNA a 10µL da sonda Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2x), sendo a concentração final de cada *primer* 0,3µM, num volume final de 20µL. O PCR em tempo real foi efetuado através do uso do termociclador (IQ5 Multicolor Real Time PCR Detection System, iCycler, Biorad) e as características do protocolo dos ciclos estão indicadas na Tabela 2. A curva de *melting* foi realizada com aquecimento lento, com contínua medição da fluorescência, permitindo a deteção de eventuais produtos não específicos. Todas as reações foram realizadas em duplicado. Os níveis de expressão relativos de RNA mensageiro (mRNA) do GDNF foram normalizados utilizando-se a GAPDH como controlo interno. Como controlo negativo da reação foi usada uma mistura com os *primers* adequados, mas sem adição de cDNA. Os produtos amplificados do PCR em tempo real foram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE com brometo de etídio 0,1%, a 100V, durante aproximadamente 20 minutos, sendo depois visualizados sob luz ultravioleta.

Tabela 1. Características dos *primers* específicos para o GDNF e GAPDH, usados para as reações de PCR em tempo real.

<i>Primer</i>	<i>Sequências</i>
GDNF	<i>Forward</i> 5' GAC TTG GGT TTG GGC TAC GAA 3'
	<i>Reverse</i> 5' ATT GTC TCG GCC GCT TCA C 3'
GAPDH	<i>Forward</i> 5' AGA CAG CCG CAT CTT CTT GT 3'
	<i>Reverse</i> 5' TGA TGG CAA CAA TGT CCA CT 3'

Tabela 2. Características do protocolo dos ciclos de PCR em tempo real.

Passo	Temperatura (°C)	Tempo	Número de ciclos
Desnaturação inicial	95	10 min	1
Desnaturação	95	15 s	40
Hibridação / Extensão	60	1 min	
Curva de <i>Melting</i>	55 - 95 (0,5°C/ciclo)	10 s	81

3.9. Imunocitoquímica

As células foram fixadas em paraformaldeído 4% (dissolvido em PBS) durante 5 minutos e permeabilizadas com Triton X-100 1% em PBS durante 5 minutos à temperatura ambiente. De seguida, efetuou-se o bloqueio das ligações inespecíficas através da incubação com FBS 20% em PBS contendo Tween 0,1% (PBS-T) durante 1 hora à temperatura ambiente. Depois lavaram-se as células com PBS-T e incubaram-se durante 1 hora, à temperatura ambiente, com os seguintes anticorpos primários: anti-TH de ratinho (1:1000), anti-MAP2 de coelho (1:200) e anti-GFAP de galinha (1:800), previamente diluídos em PBS-T contendo FBS 1%. Para remover o excesso de anticorpo primário, fizeram-se 6 lavagens sequenciais com PBS-T e no final incubaram-se as células, durante 1 hora à temperatura ambiente, com os seguintes anticorpos secundários: cabra anti-ratinho (1:1000), cabra anti-coelho (1:1000) e cabra anti-galinha (1:100), conjugados com os fluoróforos Alexa Fluor® 488 ou Alexa Fluor® 594, previamente diluídos em PBS-T contendo FBS 1%. Após 6 lavagens sequenciais com PBS-T, incubaram-se as células com Hoescht (dissolvido em PBS-T com FBS 1%) a uma concentração final de 2µM, durante 10 minutos. Depois desta incubação realizaram-se 2 lavagens com PBS-T. As lamelas com as células foram então montadas em lâminas com meio de montagem e as

preparações foram posteriormente observadas no microscópio de fluorescência Zeiss (Axiobserver Z1, Zeiss).

3.10. Análise de dados e estatística

Os dados foram apresentados como percentagem relativamente aos valores obtidos em condições controlo e representam a média \pm o erro padrão da média (S.E.M) de pelo menos três experiências independentes, realizadas em triplicado (salvo algumas exceções indicadas na legenda das figuras). A análise dos dados foi realizada utilizando-se o GraphPad Prism versão 3.0 e 5.0 para Windows, GraphPad Software, San Diego Califórnia, USA. A análise estatística foi efetuada usando o teste one-way ANOVA seguida do teste Bonferroni's Multiple Comparison. Os valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Capítulo 4

Resultados

4.1. Efeito dos fatores solúveis libertados por culturas mistas do mesencéfalo ventral, expostas a L-DOPA ou H₂O₂, nos níveis de mRNA do GDNF em culturas mistas de estriado

Estudos anteriores do nosso grupo, ainda não publicados, mostraram que os MC de culturas mistas do mesencéfalo ventral expostas a 50 μ M de H₂O₂ e 200 μ M de L-DOPA durante 1h induzem aumentos na expressão de GDNF em culturas mistas de estriado.

Assim, com o objetivo de completar esse estudo, determinou-se o efeito dos mediadores solúveis libertados pelas células do mesencéfalo ventral, expostas a L-DOPA e H₂O₂, nos níveis de mRNA do GDNF nas células estriatais. As culturas mistas do mesencéfalo ventral foram expostas a 200 μ M de L-DOPA e 50 μ M de H₂O₂, durante 1 hora, e os meios condicionados foram aplicados nas culturas mistas de estriado durante diferentes períodos de tempo (0.5, 1, 3, 6 e 12 horas) (Figura 3). Após estes tempos, procedeu-se à extração do RNA total e posterior análise do mRNA do GDNF por PCR em tempo real.

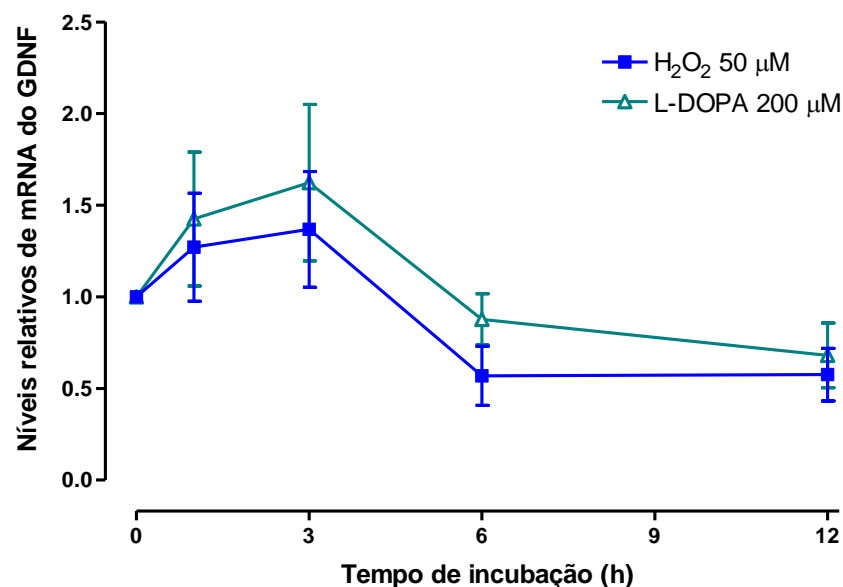


Figura 3. Efeito dos meios condicionados de culturas mistas do mesencéfalo ventral, expostas a 200 μ M de L-DOPA ou 50 μ M de H₂O₂, nos níveis de mRNA do GDNF em culturas mistas de estriado. Os níveis de mRNA do GDNF foram normalizados em relação aos níveis de mRNA do GAPDH usando o método $\Delta\Delta C_t$. Os valores apresentados representam a média de 3 a 4 experiências independentes, realizadas em triplicado.

Na Figura 3 pode verificar-se que os MC por culturas mistas do mesencéfalo ventral, expostas a L-DOPA e H₂O₂, induziram um aumento dos níveis do mRNA do GDNF em células estriatais, para os tempos de incubação de 1 e 3 horas, sendo este aumento mais acentuado no tempo de 3h (1.62 ± 0.42 para a L-DOPA e 1.37 ± 0.32 para o H₂O₂). Os aumentos foram mais acentuados quando as culturas foram expostas a L-DOPA, não havendo no entanto diferenças estatisticamente significativas para nenhum dos estímulos utilizados.

4.2. Efeito dos meios condicionados por astrócitos do mesencéfalo ventral, expostos a L-DOPA ou H₂O₂, na expressão de GDNF em células estriatais

Estudos prévios desenvolvidos pelo nosso grupo, ainda não publicados, demonstraram que mediadores solúveis libertados por culturas de astrócitos do mesencéfalo ventral, expostas a 200µM de L-DOPA ou 50µM de H₂O₂ durante 1 hora, não induziram aumentos na expressão de GDNF em células estriatais. No presente trabalho, avaliámos se diferentes tempos de condicionamento com L-DOPA ou H₂O₂, nos astrócitos de mesencéfalo ventral, poderiam ou não afetar a expressão de GDNF nas células estriatais.

Para avaliar o efeito dos meios condicionados na expressão de GDNF em culturas mistas de estriado, foram testados diferentes tempos de exposição (0.5, 1, 3, 6 e 12 horas) das culturas de astrócitos do mesencéfalo ventral a 200µM de L-DOPA e 50µM de H₂O₂ (Figura 4). Os meios condicionados das culturas de astrócitos do mesencéfalo ventral foram transferidos para as culturas mistas de estriado durante 24 horas e os extratos celulares foram preparados para análise dos níveis proteicos de GDNF por Western blot.

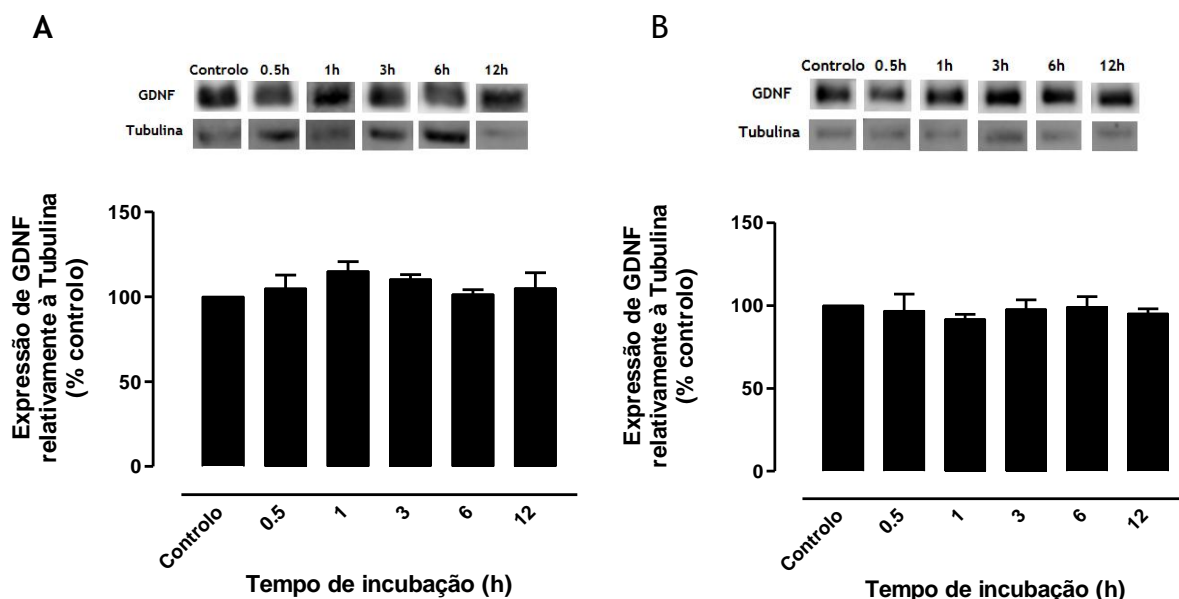


Figura 4. Efeito dos MC por culturas de astrócitos do mesencéfalo ventral, previamente expostas a 200 μ M de L-DOPA (A) e 50 μ M de H₂O₂ (B) durante os períodos de tempo indicados, na expressão de GDNF em culturas mistas de estriado. A expressão de GDNF nos extratos celulares foi determinada por Western blot. Os dados apresentados encontram-se expressos em percentagem de controlo, em relação à tubulina, representando a média de 3 a 6 experiências independentes, realizadas em triplicado (exceto para as condições 1, 3 e 6h de incubação com H₂O₂, para as quais está representada a média de 2 experiências independentes realizadas em triplicado). São apresentadas imagens representativas do Western blot para GDNF (peso molecular 45 kDa) e tubulina (55 kDa).

Os MC por astrócitos do mesencéfalo ventral, expostos tanto a L-DOPA como a H₂O₂, não induziram aumentos significativos na expressão de GDNF nas células estriatais, relativamente à situação controlo, em nenhum dos tempos de incubação testados. No entanto, parece existir um aumento nos níveis de GDNF estriatais quando as células foram expostas a MC por astrócitos expostos a L-DOPA durante 1 hora (15.03 \pm 5.62%, em relação ao controlo), mas sem significado estatístico.

4.3. Efeito dos meios condicionados de culturas embrionárias mistas e de neurónios do mesencéfalo ventral expostas a L-DOPA ou H₂O₂, na expressão de GDNF em culturas mistas de estriado

Uma vez que, inesperadamente, os MC das culturas mistas do mesencéfalo ventral obtidas a partir de ratos recém-nascidos não induziram aumentos significativos nos níveis de mRNA do GDNF nas culturas de estriado, fomos avaliar se esta ausência de efeito se poderia dever a um número reduzido de neurónios DA nas culturas mistas do mesencéfalo ventral. Assim, realizou-se uma imunocitoquímica para observar as células que expressavam o marcador dopaminérgico TH. Verificou-se de facto que na cultura mista do mesencéfalo ventral existia um número muito reduzido de neurónios DA.

Optou-se, então, por utilizar culturas preparadas a partir do mesencéfalo de embriões de rato para recolher os MC, pois estas culturas contêm maior número de neurónios DA, que quando lesados poderiam contribuir para os aumentos de GDNF nas células estriatais. Para verificar se as culturas embrionárias contêm um maior número de neurónios DA do que as culturas obtidas a partir de ratos recém-nascidos, e se as culturas mistas que foram cultivadas em MNB suplementado contendo 10% de FBS inativado pelo calor contêm astrócitos, realizou-se uma imunocitoquímica com marcação para os núcleos (Hoescht, azul), neurónios (MAP2, vermelho), neurónios DA (TH, verde) e astrócitos (GFAP, verde) (Figura 5).

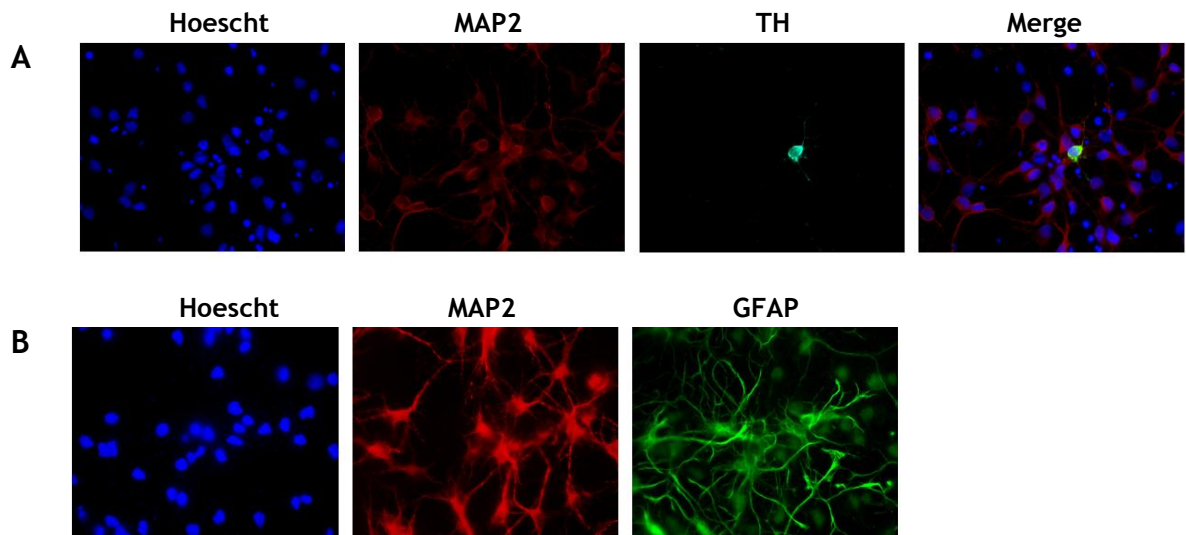


Figura 5. Imagem de fluorescência representativa das culturas embrionárias de neurónios do mesencéfalo ventral (A) e das culturas embrionárias mistas do mesencéfalo ventral (B). A imunocitoquímica foi realizada com marcação para os núcleos (Hoescht, azul), neurónios (MAP2, vermelho), neurónios dopaminérgicos (TH, verde) e astrócitos (GFAP, verde). Está representada também a sobreposição das imagens (*merge*). As imagens foram obtidas através de um microscópio de fluorescência Zeiss (Axioobserver Z1, Zeiss), com ampliação de 63x.

Foi possível observar com a realização desta imunocitoquímica que as culturas embrionárias contêm um maior número de neurónios DA do que as culturas obtidas a partir de ratos recém-nascidos (Figura 5A). Verificou-se também que as culturas embrionárias mistas contêm neurónios e astrócitos (Figura 5B). A percentagem média de células dopaminérgicas numa cultura embrionária de neurónios foi de aproximadamente 0,7% e numa cultura mista de 0,8%.

Assim, para avaliar se os MC de culturas embrionárias do mesencéfalo ventral expostas a L-DOPA e H₂O₂ podem regular os níveis de GDNF em culturas de estriado, avaliou-se a expressão desta proteína através de Western blot. As culturas embrionárias mistas e de neurónios do mesencéfalo ventral foram expostas a 200µM de L-DOPA e 50µM de H₂O₂ durante 1 hora e os MC foram transferidos para as culturas mistas de estriado durante 24 horas (Figura 6).

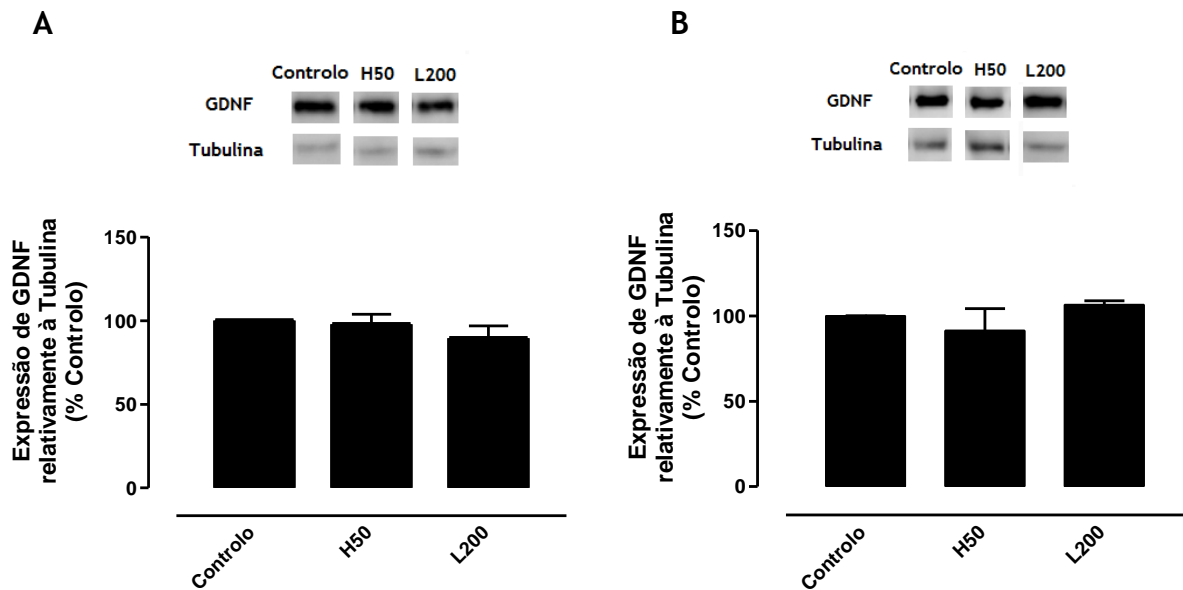


Figura 6. Expressão de GDNF em culturas mistas de estriado incubadas com MC de culturas embrionárias mistas (A) e de neurónios (B) do mesencéfalo ventral expostas a 200 μ M de L-DOPA (L200) e 50 μ M de H₂O₂ (H50), durante 1 hora. Os dados apresentados são expressos em percentagem de controlo, em relação à tubulina, e representam a média de 3 a 4 experiências independentes, realizadas em triplicado, exceto para a condição H50 do gráfico B, para a qual apenas foram realizadas 2 experiências independentes, em triplicado. São apresentadas imagens representativas do Western blot para GDNF (45 kDa) e tubulina (55 kDa).

Não se observaram aumentos significativos dos níveis de GDNF nas culturas de estriado quando expostas a MC de culturas embrionárias mistas ou de neurónios do mesencéfalo ventral, para nenhum dos estímulos utilizados, em relação ao controlo.

Com estes resultados concluiu-se que a inesperada ausência de efeito dos MC na expressão de GDNF nas células estriatais não se deveu ao número de neurónios DA nas culturas do mesencéfalo ventral. Consequentemente, surgiu a hipótese de que as concentrações de L-DOPA e H₂O₂ utilizadas não fossem suficientes para induzir morte dos neurónios DA, e daí não se observarem alterações na expressão de GDNF no estriado. Esta hipótese foi avaliada de seguida e os resultados são apresentados na secção seguinte.

4.4. Avaliação da lesão neuronal em culturas embrionárias mistas e de neurónios do mesencéfalo ventral expostas a L-DOPA ou H₂O₂

Avaliou-se a extensão da lesão dos neurónios DA e dos neurónios totais, após exposição a L-DOPA e H₂O₂, através da avaliação da expressão da TH, por Western blot, bem como pela determinação do número de células que expressam TH e o marcador neuronal MAP2, recorrendo ao método de imunocitoquímica.

4.4.1- Determinação da expressão de TH

Para avaliar a extensão da lesão dopaminérgica nas culturas embrionárias mistas e de neurónios do mesencéfalo ventral, quando expostas a 200µM de L-DOPA e 50µM de H₂O₂, durante 1 hora, mediram-se os níveis da expressão de TH, por Western Blot (Figura 7).

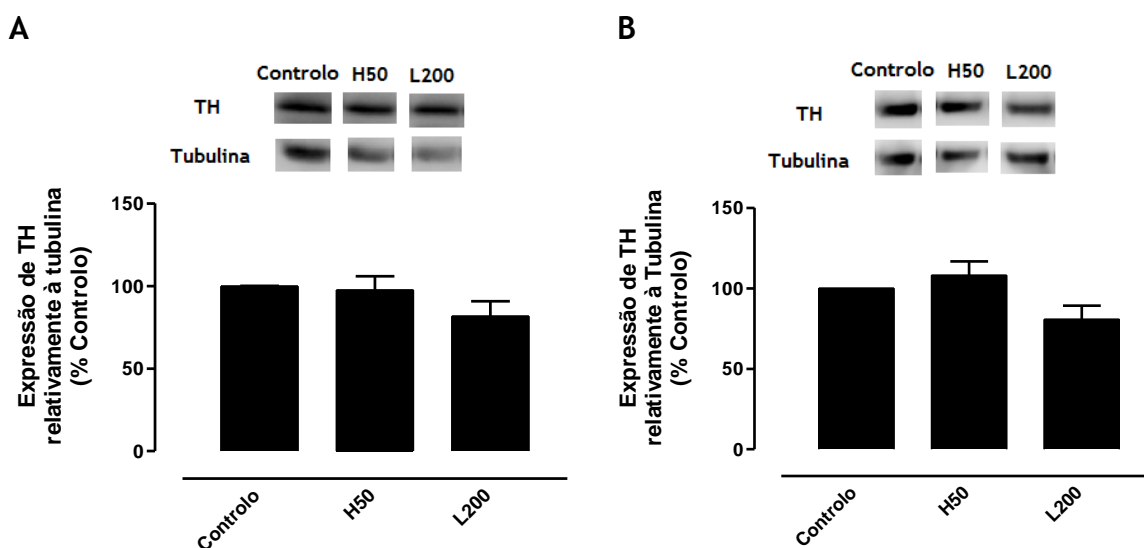


Figura 7. Expressão de TH em culturas embrionárias mistas (A) e de neurónios (B) do mesencéfalo ventral incubadas com 200µM de L-DOPA (L200) e 50µM de H₂O₂ (H50) durante 1 hora. Os dados apresentados são expressos em percentagem de controlo, em relação à tubulina, e representam a média de 2 a 3 experiências independentes, realizadas em triplicado. São apresentadas imagens representativas do Western blot para TH (59 kDa) e tubulina (55 kDa).

Não foram observadas alterações significativas na expressão de TH, nem nas culturas embrionárias mistas nem de neurónios, em comparação com o controlo. Verificou-se uma pequena diminuição na expressão de TH, quando as duas culturas foram expostas a L-DOPA (18,26 ± 8.97% nas mistas e 19,27 ± 8.47% nos neurónios, relativamente ao controlo), sem existir no entanto um efeito estatisticamente significativo.

4.4.2. Quantificação das células TH positivas

A lesão dopaminérgica foi também avaliada através da contagem do número de células que expressam TH, ou seja, células TH positivas (TH⁺) (Figura 8). Para tal realizou-se uma imunocitoquímica nas culturas embrionárias mistas e de neurónios do mesencéfalo ventral expostas a 200 μ M de L-DOPA e 50 μ M de H₂O₂, durante 1 hora.

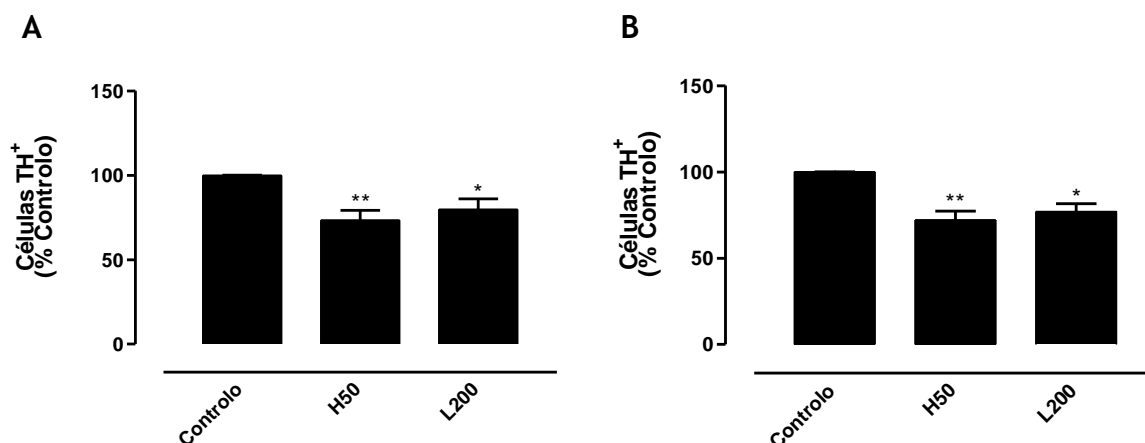


Figura 8. Avaliação da extensão da lesão dopaminérgica em culturas embrionárias mistas (A) e de neurónios (B) do mesencéfalo ventral incubadas com 200 μ M de L-DOPA (L200) e 50 μ M de H₂O₂ (H50), durante 1 hora. Os dados apresentados são expressos em percentagem de controlo, relativamente ao número total de células, e representam a média de 3 a 4 experiências independentes, realizadas em duplicado. Foram efetuadas contagens de 54 campos por lamela. *P <0.05 e **P <0.01 quando comparado com o controlo.

Através da análise da Figura 8, pode observar-se que em ambas as culturas embrionárias mistas e de neurónios existiu uma diminuição significativa no número de células TH⁺, relativamente ao controlo. Nas culturas embrionárias mistas ocorreu uma diminuição de 26,63 \pm 5.85% para o H₂O₂ e 20,27 \pm 6.34% para a L-DOPA, enquanto nas culturas embrionárias de neurónios verificou-se uma diminuição de 27,88 \pm 5.22% para o H₂O₂ e 23,02 \pm 4.61% para a L-DOPA. Estes resultados indicam que a exposição das culturas embrionárias mistas e de neurónios a 200 μ M de L-DOPA e 50 μ M de H₂O₂, durante 1 hora, induz uma diminuição da viabilidade dos neurónios DA, ou seja, lesão dopaminérgica.

4.4.3. Quantificação dos neurónios totais

Averiguou-se também se a lesão observada nas culturas embrionárias mistas e de neurónios do mesencéfalo ventral expostas a 200 μ M de L-DOPA e 50 μ M de H₂O₂, acontecia especificamente nos neurónios DA ou se exposição a estes agentes afetava também a viabilidade dos outros tipos de neurónios presentes nas culturas. Para tal, realizou-se uma imunocitoquímica e

procedeu-se à contagem do número de células marcadas para o marcador neuronal MAP2 (Figura 9).

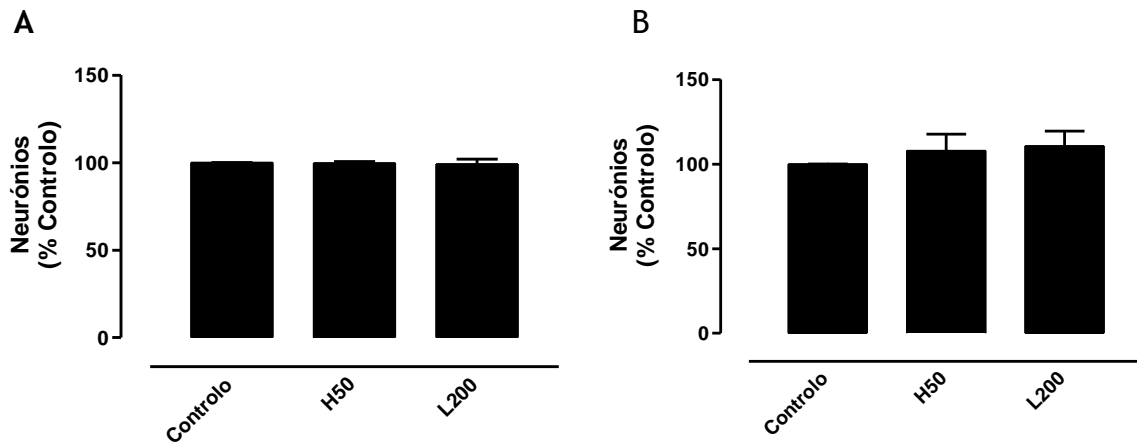


Figura 9. Avaliação da lesão dos neurónios em culturas embrionárias mistas (A) e de neurónios (B) do mesencéfalo ventral expostas a 200 μ M de L-DOPA (L200) e 50 μ M de H₂O₂ (H50), durante 1 hora. Os dados apresentados são expressos em percentagem de controlo, relativamente ao número total de células, e representam a média de 3 experiências independentes, realizadas em duplicado. Foram efetuadas contagens de 54 campos por lamela.

Os resultados apresentados na Figura 9 demonstram que não existiu uma diminuição significativa no número de células marcadas para MAP2, relativamente ao controlo, em nenhuma das culturas embrionárias expostas a 200 μ M de L-DOPA e 50 μ M de H₂O₂.

4.5. Indução de lesão dopaminérgica com diferentes concentrações de L-DOPA e H₂O₂: que efeito tem ao nível da expressão de GDNF estriatal?

Os resultados apresentados até agora mostraram que as concentrações de 200 μ M de L-DOPA e 50 μ M de H₂O₂ são suficientes para induzir lesão apenas nos neurónios DA nas culturas embrionárias. No entanto, esta lesão não parece ser suficiente para induzir aumentos de GDNF nas células estriatais, pelo que o passo seguinte foi utilizar concentrações superiores de L-DOPA e H₂O₂, e avaliar o efeito dos MC das culturas embrionárias mistas do mesencéfalo ventral nos níveis de GDNF estriatal.

4.5.1. Determinação da expressão de GDNF

Assim, estudaram-se os efeitos da exposição de diferentes concentrações de L-DOPA (400 μM , 600 μM e 800 μM) e de H_2O_2 (100 μM , 200 μM , 400 μM) nas culturas embrionárias mistas do mesencéfalo ventral, de forma a avaliar se os MC destas culturas, expostas a concentrações mais elevadas de L-DOPA e H_2O_2 , podem aumentar a expressão de GDNF no estriado. Os MC por culturas embrionárias mistas do mesencéfalo ventral expostas a estas concentrações, durante 1 hora, foram transferidos para as culturas mistas de estriado durante 24 horas, e os extratos celulares foram preparados para análise da expressão de GDNF por Western blot (Figura 10).

Optou-se por realizar estas experiências apenas nas culturas embrionárias mistas pois nos estudos anteriores do nosso grupo, ainda não publicados, verificaram-se aumentos na expressão de GDNF em culturas mistas de estriado quando incubadas com MC por culturas mistas do mesencéfalo ventral obtidas a partir de ratos recém-nascidos.

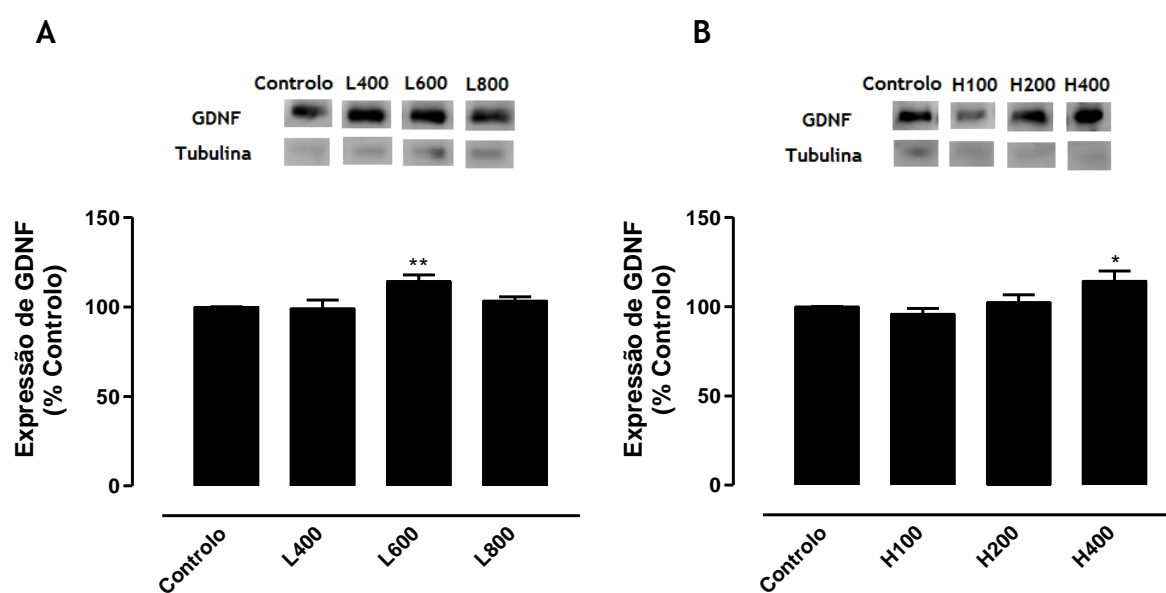


Figura 10. Expressão de GDNF em culturas mistas de estriado incubadas com MC de culturas embrionárias mistas do mesencéfalo ventral expostas a diferentes concentrações de L-DOPA (400 μM , 600 μM e 800 μM ; L400, L600 e L800, respetivamente) (A) ou de H_2O_2 (100 μM , 200 μM , 400 μM ; H100, H200 e H400, respetivamente) (B), durante 1 hora. A expressão de GDNF foi avaliada por Western blot e os dados apresentados foram expressos em percentagem de controlo, representando a média de 4 a 5 experiências independentes, realizadas em triplicado. São apresentadas imagens representativas do Western blot para GDNF (45 kDa) e tubulina (55 kDa). *P <0.05 e **P <0.01 quando comparado com o controlo.

Verificou-se que a exposição das culturas embrionárias mistas do mesencéfalo ventral a 600 μ M de L-DOPA e 400 μ M de H₂O₂, durante 1h, aumentou significativamente a expressão de GDNF nas culturas mistas de estriado comparativamente com o controlo (14.55 \pm 3.24% para a L-DOPA e 14.50 \pm 5.42% para o H₂O₂, relativamente ao controlo). Isto significa que os mediadores solúveis presentes nos MC de culturas mistas do mesencéfalo ventral, expostas a estas concentrações de L-DOPA ou H₂O₂, induzem aumentos de GDNF nas células estriatais.

4.5.2. Quantificação do número de células TH positivas

Analisou-se de seguida se os aumentos da expressão de GDNF em células estriatais podem ser devidos a lesão dopaminérgica, induzida por estes agentes oxidantes, nas culturas mistas do mesencéfalo ventral. Assim, para avaliar a extensão da lesão dopaminérgica nas culturas embrionárias mistas do mesencéfalo ventral expostas a 600 μ M de L-DOPA e 400 μ M de H₂O₂, durante 1 hora, realizou-se uma imunocitoquímica e procedeu-se à contagem do número de células TH⁺ (Figura 11).

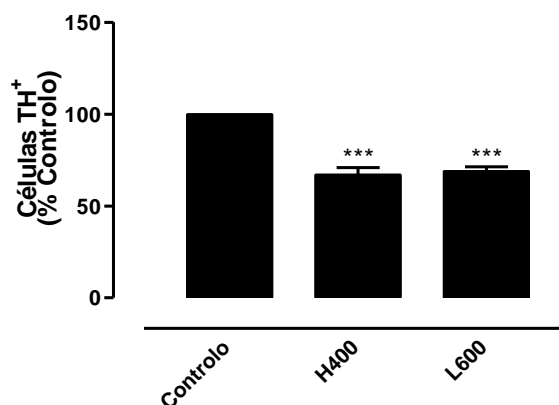


Figura 11. Avaliação da extensão da lesão dopaminérgica em culturas embrionárias mistas do mesencéfalo ventral expostas a 600 μ M de L-DOPA e 400 μ M de H₂O₂, durante 1 hora. Os dados apresentados são expressos em percentagem de controlo, relativamente ao número total de células, e representam a média de 3 experiências independentes, realizadas em duplicado ou triplicado. Foram efetuadas contagens de 20 campos por lamela. ***P <0.001 quando comparado com o controlo

Os resultados apresentados na Figura 11, demonstram que ocorreu uma diminuição significativa do número de células TH⁺, relativamente ao controlo, quando as culturas embrionárias mistas do mesencéfalo ventral foram expostas a 600 μ M de L-DOPA (30,88 \pm 2.25%) e 400 μ M de H₂O₂ (32,85 \pm 3.76%), o que indica que existe lesão dopaminérgica nestas condições.

Capítulo 5

Discussão dos resultados

Com este trabalho pretendeu-se averiguar o efeito dos meios condicionados por células do mesencéfalo ventral, previamente expostas a L-DOPA ou H₂O₂, na expressão de GDNF pelas células do estriado, ou seja, analisar se os fatores solúveis libertados pelas células do mesencéfalo ventral em resposta a lesão dopaminérgica induzem alterações na expressão de GDNF nas células estriatais.

O GDNF foi identificado em 1993 com base na sua capacidade para manter o desenvolvimento de neurónios DA embrionários em cultura (Lin et al., 1993). Aumentos de GDNF nas células estriatais desencadeados por uma lesão dopaminérgica podem ser relevantes na neuroprotecção dos terminais DA no estriado, pois foi demonstrado que pode proteger e reparar neurónios DA numa variedade de modelos de lesão em diferentes espécies (Xing et al., 2010; Yang et al., 2009). Como descrito por Wu et al., (2008), a identificação de compostos que possam induzir a secreção endógena de fatores neurotróficos ou aumentar a sua sinalização poderá ter grande importância como opção terapêutica alternativa para a DP.

Em estudos anteriores mostrou-se que, na presença de H₂O₂ e a L-DOPA, os neurónios DA do mesencéfalo ventral libertam fatores solúveis, nomeadamente IL-1 β , que induzem a expressão de GDNF em astrócitos da mesma região encefálica (Saavedra et al., 2006; Saavedra et al., 2007). Para além disto, observou-se que o bloqueio da ação do GDNF nos meios condicionados de culturas do mesencéfalo ventral tratadas com H₂O₂ teve como consequência uma diminuição da viabilidade dopaminérgica. No seu conjunto, estes resultados sugeriram que a expressão de GDNF nos astrócitos do mesencéfalo ventral aumenta em resposta à lesão dopaminérgica, tratando-se provavelmente de uma estratégia neuroprotetora. Assim, o stress oxidativo induz a sobre-expressão de GDNF e este aumento pode proteger as células de danos oxidativos (Saavedra et al., 2006).

Estudos anteriores do nosso grupo, ainda não publicados, mostraram que os MC de culturas mistas do mesencéfalo ventral, expostas a 200 μ M de L-DOPA e 50 μ M de H₂O₂ durante 1h, aumentam a expressão de GDNF em culturas mistas de estriado. Assim, no presente trabalho avaliou-se se também existem aumentos no mRNA do GDNF, concordantes com os aumentos observados anteriormente na expressão da proteína pelo nosso grupo. Para determinar os níveis do mRNA do GDNF em culturas mistas de estriado, aplicaram-se no estriado os meios condicionados de culturas mistas do mesencéfalo ventral expostas a 200 μ M de L-DOPA e 50 μ M de H₂O₂ durante diferentes períodos de tempos.

Para permitir a comparação com os estudos anteriores, foram utilizadas culturas de células pós-natais. Em ratos recém-nascidos a SN e a VTA estão mais desenvolvidas, permitindo uma dissecação mais precisa destas duas zonas. Isto é particularmente importante devido à sensibilidade diferencial de neurónios DA da SN e da VTA a insultos tóxicos (Ding et al., 2004; Saavedra et al., 2006). Nestas culturas não existe a contribuição dos neurónios da VTA, que não projetam para o estriado, o que é importante visto que para este estudo apenas interessam os neurónios da SN que enviam projeções para o estriado, fazendo parte da via nigrostriatal.

As culturas foram expostas a L-DOPA visto ser o principal tratamento sintomático na DP, mas está apontada nalguns estudos como indutora de neurotoxicidade devido a auto-oxidação (Pardo et al., 1995). A neurodegeneração seletiva na DP parece sugerir que os neurónios DA da SN são mais vulneráveis a ROS, sendo a oxidação da dopamina uma das explicações possíveis. Como esta é usada como neurotransmissor nestes neurónios, e é gerado H_2O_2 como um subproduto do catabolismo da dopamina pela monoamina oxidase, as culturas foram também expostas a este agente oxidante. Além disso, a oxidação da dopamina pode resultar na formação de quinonas, que podem modificar diretamente as proteínas (Tsang & Chung, 2009).

Os resultados obtidos demonstraram que existiu um aumento mais acentuado dos níveis do mRNA do GDNF no estriado para o tempo de incubação de 3 horas com MC provenientes das culturas do mesencéfalo ventral expostas tanto a L-DOPA como a H_2O_2 , havendo uma diminuição dos níveis de mRNA nos tempos mais longos de 6 e 12 horas. O tempo em que ocorreram estes aumentos de mRNA do GDNF foi muito inferior (3 horas), ao tempo de 24 horas onde anteriormente foram observados aumentos na expressão da proteína pelo nosso grupo (estudo não publicado), como seria de esperar. Pode assim concluir-se que os fatores solúveis libertados por culturas do mesencéfalo ventral expostas a H_2O_2 ou L-DOPA induziram um aumento nos níveis de mRNA do GDNF nas células do estriado e este aumento foi mais elevado para o tempo de incubação de 3 horas.

Avaliou-se de seguida se os aumentos de GDNF em culturas mistas de estriado, após exposição das células do mesencéfalo ventral aos agentes oxidantes H_2O_2 e L-DOPA, são devidos aos fatores libertados quando os astrócitos e neurónios estão presentes ou se apenas a presença de astrócitos é suficiente para induzir este aumento. É descrito em vários estudos que os astrócitos têm um papel neuroprotetor que depende dos fatores solúveis que libertam para o meio que os astrócitos e os neurónios partilham, sendo que este meio condicionado constitui um ambiente ideal para estudar as interações entre astrócitos e neurónios. Os astrócitos podem assim libertar e fornecer aos neurónios fatores de crescimento e neurotróficos, como o GDNF (Zhu et al., 2006; Rappold & Tieu, 2010; Allaman et al, 2011).

Estudos ainda não publicados, previamente desenvolvidos pelo nosso grupo, evidenciaram que mediadores solúveis libertados por culturas de astrócitos do mesencéfalo ventral, expostas a L-DOPA ou H₂O₂ durante 1 hora, não induziram aumentos na expressão de GDNF em células estriatais. Para analisar se há alterações na expressão de GDNF com outros tempos de exposição a L-DOPA ou H₂O₂, expuseram-se culturas de astrócitos do mesencéfalo ventral a estes estímulos, durante vários tempos de condicionamento, e recolheram-se os meios condicionados.

Verificou-se que não existiram aumentos na expressão de GDNF nas culturas de estriado, com os MC de culturas apenas de astrócitos, para nenhum dos tempos de incubação. Concluiu-se assim que o aumento dos níveis de GDNF no estriado em resposta aos meios condicionados de culturas do mesencéfalo ventral expostas a H₂O₂ ou L-DOPA é desencadeado por mediadores solúveis libertados apenas na presença dos neurónios DA. Estes resultados sugerem que é necessária a presença de neurónios e/ou a interação entre astrócitos e neurónios para que os fatores libertados possam aumentar os níveis de GDNF nas células estriatais.

Como com os MC de culturas mistas do mesencéfalo ventral obtidas a partir de ratos recém-nascidos não se conseguiram obter aumentos significativos nos níveis de mRNA de GDNF nas culturas de estriado, foi-se avaliar se este efeito se poderia dever ao número reduzido de neurónios DA na cultura mista. Para tal realizou-se uma imunocitoquímica com marcação para o marcador dopaminérgico TH e observou-se um baixo número de células que expressavam TH na cultura mista do mesencéfalo ventral, existindo assim um número muito reduzido de neurónios DA.

Optou-se então por utilizar culturas embrionárias do mesencéfalo ventral para recolher os MC. Embora nestas culturas embrionárias seja mais difícil fazer a dissecção da SN, devido ao pouco desenvolvimento desta zona, as culturas contêm maior número de neurónios DA. Este facto foi comprovado através da realização de uma imunocitoquímica, onde se observou que a percentagem média de células dopaminérgicas numa cultura embrionária de neurónios foi de aproximadamente 0,7% e numa cultura mista de 0,8%. Assim, o efeito da exposição a L-DOPA e H₂O₂ poderia ser maior e induzir um maior aumento de GDNF no estriado. Confirmou-se também através de uma imunocitoquímica com marcação para MAP2, um marcador neuronal, e GFAP, um marcador de astrócitos, que as culturas mistas do mesencéfalo ventral cultivadas em MNB suplementado contendo 10% de FBS inativado pelo calor contêm neurónios e astrócitos.

Prepararam-se, então, culturas embrionárias mistas e de neurónios do mesencéfalo ventral, para estudar em qual delas a exposição a 200µM de L-DOPA ou 50µM de H₂O₂ leva à libertação de fatores solúveis que induzam um maior aumento de GDNF no estriado. Ao contrário do que seria de esperar, não se observaram diferenças significativas nos níveis de GDNF quando as

culturas de estriado foram incubadas tanto com os MC de culturas mistas como de culturas de neurónios expostas a estas concentrações de L-DOPA ou H₂O₂.

Foi também avaliada a extensão da lesão dopaminérgica nas culturas embrionárias mistas e de neurónios do mesencéfalo ventral expostas a 200µM de L-DOPA e 50µM de H₂O₂, durante 1 hora. A viabilidade dos neurónios DA foi avaliada através da medição dos níveis da expressão de TH por Western blot e por contagem das células TH positivas. Não foram observadas diminuições significativas na expressão de TH por Western blot, nem nas culturas embrionárias mistas nem de neurónios.

No entanto, a expressão de TH medida por Western blot pode não traduzir a lesão dopaminérgica, podendo não existir uma diminuição na sua expressão e até se observarem aumentos. Como demonstrado por Yan et al., (2007), o aumento da expressão da proteína tirosina hidroxilase pode refletir uma resposta de compensação dos neurónios DA para aumentarem a sua capacidade de síntese e a eficiência de neurotransmissão dopaminérgica após o traumatismo crânio-encefálico, sugerindo a existência de mecanismos de compensação nos neurónios DA remanescentes (Yan et al., 2007). Outros estudos indicaram também que uma população de neurónios intraestriatais imunorreativos para a tirosina hidroxilase aumentam em número a seguir a lesões do SNC em modelos animais e humanos, talvez como uma reação compensatória à enorme diminuição dos níveis de dopamina estriatais resultantes da lesão da SN (Mura et al., 1995; Betarbet et al., 1997; Porritt et al., 2000; Cossette et al., 2003).

Assim, utilizámos uma técnica alternativa para avaliação da lesão dopaminérgica. Realizou-se uma imunocitoquímica e quantificou-se o número de células que expressam TH, ou seja, células TH positivas. Foi observada uma diminuição no número de células TH⁺, nos dois tipos de culturas embrionárias mistas e de neurónios, quando expostas a H₂O₂ ou L-DOPA, apontando para uma diminuição da viabilidade dos neurónios DA.

Para averiguar se a exposição a L-DOPA ou H₂O₂ afetou apenas a viabilidade dos neurónios DA ou se existiu também lesão nos neurónios totais, procedeu-se à contagem do número de células marcadas para MAP2, um marcador neuronal. Os resultados obtidos demonstraram que não existiu uma diminuição significativa no número de células marcadas para MAP2 em nenhuma das culturas embrionárias expostas a L-DOPA e H₂O₂, o que indica que não existiu lesão nos neurónios totais, apenas nos neurónios DA.

No estudo de Saavedra et al. (2006), também se avaliaram os efeitos da exposição a H₂O₂ e L-DOPA na viabilidade das células totais, utilizando o ensaio do 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo de difeniltetrazolino (MTT), e dos neurónios DA por quantificação das células TH positivas, por imunocitoquímica. Neste estudo as culturas mistas de neurónios-glia da SN foram expostas a concentrações de 50-150µM de H₂O₂ e 50-400µM de L-DOPA e a viabilidade

celular foi analisada 24 horas depois (Saavedra et al., 2006). Observaram-se efeitos na viabilidade celular dopaminérgica e a viabilidade das células totais não foi afetada, assim como nos resultados obtidos neste trabalho. A percentagem de células TH positivas diminuiu em culturas tratadas com 200 e 400 μ M de L-DOPA, mas não existiu efeito na viabilidade das células dopaminérgicas expostas a H₂O₂ (Saavedra et al., 2006).

Nas fases seguintes do trabalho foram utilizadas apenas culturas embrionárias mistas para permitir uma melhor comparação com os estudos anteriores do nosso grupo, ainda não publicados, onde se verificaram aumentos na expressão de GDNF em culturas mistas de estriado quando incubadas com MC de culturas mistas do mesencéfalo ventral obtidas a partir de ratos recém-nascidos. Como referido anteriormente, não se observaram aumentos significativos da expressão de GDNF em células estriatais, quando incubadas com MC de culturas embrionárias do mesencéfalo ventral, expostas a concentrações de 200 μ M de L-DOPA e 50 μ M de H₂O₂.

Constatou-se então que, apesar de existir lesão dopaminérgica nestas culturas embrionárias, não foi possível induzir um efeito semelhante ao obtido com MC de culturas pós-natais (resultados anteriores do nosso grupo), em termos de expressão de GDNF. Verificámos que a lesão induzida não foi suficiente para induzir aumentos de GDNF no estriado. Com base nestes resultados, decidiu-se então testar várias concentrações de L-DOPA e de H₂O₂ para avaliar se os fatores libertados por culturas embrionárias mistas do mesencéfalo ventral expostas a concentrações mais elevadas destes agentes oxidantes poderão induzir um aumento na expressão de GDNF nas células estriatais. Para isso, recolheram-se MC de culturas embrionárias mistas expostas a concentrações de 400, 600 e 800 μ M de L-DOPA e 100, 200 e 400 μ M de H₂O₂. Observou-se que nas concentrações de 600 μ M de L-DOPA e 400 μ M de H₂O₂ ocorreu uma diminuição significativa no número de células TH⁺, e que essas mesmas concentrações induziram aumentos de GDNF nas culturas de estriado. As células TH⁺ foram quantificadas para compreender se os aumentos da expressão de GDNF em células estriatais poderiam ser devidos a uma diminuição da viabilidade dopaminérgica.

Estes resultados mostram que os fatores solúveis libertados após lesão dopaminérgica induzem um aumento na expressão de GDNF nas células estriatais, alvos dos neurónios DA, aumento esse que poderá constituir uma estratégia neuroprotetora das células estriatais em resposta à lesão dopaminérgica.

Diversas experiências em modelos animais mostraram que o GDNF diretamente injetado na *substantia nigra* ou no estriado protege os neurónios DA de neurotoxinas, existindo também evidências de renovação da função de neurónios lesados pelo GDNF após insultos tóxicos (Peterson & Nutt, 2008). O GDNF previne também a degeneração de neurónios DA da SN após a injeção de 6-OHDA e sobrevivência de enxertos mesencefálicos ventrais em estriado lesionado com 6-OHDA (Rosenblad et al., 2000; Nakajima et al., 2001). Comparando com

estudos anteriores onde a lesão da via nigroestriatal *in vivo* por 6-OHDA aumentou a expressão de GDNF no estriado (Nakajima et al., 2001), os resultados obtidos com este trabalho são concordantes, verificando-se também um aumento de GDNF nas células estriatais após lesão. Os aumentos de GDNF protegem os neurónios DA contra a lesão induzida por toxinas e promovem a recuperação de neurónios danificados (Kirik et al., 2000). Vários estudos mostram aumentos na expressão de GDNF em células de estriado após lesão da via nigroestriatal, sugerindo que o GDNF endógeno pode ser neuroprotetor (Mosley et al., 2006; Peterson & Nutt, 2008).

Os resultados apresentados neste trabalho indicam assim que a lesão dopaminérgica induzida por L-DOPA e H₂O₂ leva à libertação de fatores solúveis para o meio extracelular que induzem um aumento da expressão de GDNF nas células estriatais. Estas observações sugerem que esse aumento pode ser neuroprotetor sendo importante, no futuro, a utilização de estratégias terapêuticas capazes de aumentar a expressão e a secreção endógena de GDNF de forma a permitir a proteção dos neurónios DA ainda presentes na SN *pars compacta* e retardar, dessa forma, a progressão da doença de Parkinson.

Capítulo 6

Conclusão

Os estudos realizados neste trabalho permitiram concluir que:

- os fatores solúveis libertados por culturas mistas pós-natais do mesencéfalo ventral expostas a 50 μ M de H₂O₂ ou 200 μ M de L-DOPA induzem um aumento nos níveis do mRNA do GDNF nas células do estriado, para o tempo de incubação de 3 horas;
- o aumento dos níveis de GDNF nas células do estriado em resposta aos MC por células do mesencéfalo ventral expostas a H₂O₂ ou L-DOPA é desencadeado por mediadores solúveis libertados apenas na presença dos neurónios DA, uma vez que não se observaram aumentos de GDNF após exposição a MC de culturas de astrócitos do mesencéfalo ventral;
- a lesão dopaminérgica de culturas embrionárias mistas do mesencéfalo ventral com concentrações de 400 μ M de H₂O₂ e 600 μ M de L-DOPA induz um aumento de GDNF nas células estriatais, provavelmente como uma estratégia neuroprotetora.

Os resultados obtidos neste trabalho são importantes para compreender a resposta das células estriatais na presença de uma lesão dopaminérgica. Dado o conhecido papel neuroprotetor do GDNF endógeno, os resultados sugerem que o aumento da expressão de GDNF estriatal constitui uma estratégia neuroprotetora em resposta à lesão dos neurónios DA que projetam para o estriado.

Dadas as dificuldades na implementação de terapias que visam a libertação de GDNF diretamente no cérebro, a manipulação da expressão endógena deste fator neurotrófico pode ser importante clinicamente para o tratamento da DP. Assim, esforços adicionais deverão ser feitos para identificar os mediadores intercelulares libertados após lesão dopaminérgica e os mecanismos moleculares que levam à sobre-expressão de GDNF nas células estriatais. Estes mediadores poderão, no futuro, constituir possíveis alvos terapêuticos para retardar ou mesmo travar a progressão da doença de Parkinson.

Capítulo 7

Perspetivas Futuras

Para compreender melhor os mecanismos que regulam a expressão endógena de GDNF no estriado após lesão e demonstrar de forma clara o envolvimento do GDNF na neuroprotecção, seria relevante a realização dos seguintes estudos:

- identificar quais os mediadores solúveis libertados pelas células do mesencéfalo ventral capazes de induzir aumentos de GDNF nas células estriatais;
- verificar se os MC de culturas embrionárias apenas de neurónios, expostas a concentrações de $400\mu\text{M}$ de H_2O_2 e $600\mu\text{M}$ de L-DOPA, também podem induzir aumentos na expressão de GDNF em células estriatais, ou se tem de existir a interação entre astrócitos e neurónios para tal acontecer;
- determinar que tipo(s) de células estriatais, astrócitos e/ou neurónios, respondem aos fatores solúveis libertados após lesão dopaminérgica com aumentos na expressão de GDNF;
- averiguar se os aumentos na expressão de GDNF estriatal observados são protetores para os neurónios DA expostos a L-DOPA ou H_2O_2 .

Capítulo 8

Referências Bibliográficas

Allaman, I., Bélanger, M. & Magistretti, P. (2011). Astrocyte-neuron metabolic relationships: for better and for worse. *Trends in Neurosciences*, 34(2), 76-87.

Ardley, H. & Robinson, P. (2004). The role of ubiquitin-protein ligases in neurodegenerative disease. *Neurodegenerative Diseases*, 1(2-3), 71-87.

Aron, L. & Klein, R. (2011). Repairing the parkinsonian brain with neurotrophic factors. *Trends in Neurosciences*, 34(2), 88-100.

Batchelor, P., Liberatore, G., Porritt, M., Donnan, G. & Howells, D. (2000). Inhibition of brain-derived neurotrophic factor and glial cell line-derived neurotrophic factor expression reduces dopaminergic sprouting in the injured striatum. *The European Journal of Neuroscience*, 12(10), 3462-3468.

Bespalov, M. & Saarma, M. (2007). GDNF family receptor complexes are emerging drug targets. *Trends in Pharmacological Sciences*, 28(2), 68-74.

Betarbet R., Turner R., Chockkan V., DeLong M., Allers K., Walters J., Levey A. & Greenamyre J. (1997). Dopaminergic neurons intrinsic to the primate striatum. *The Journal of Neuroscience*, 17(17), 6761-6768.

Blackburn, D., Sargsyan, S., Monk, P. & Shaw, P. (2009). Astrocyte function and role in motor neuron disease: a future therapeutic target? *Glia*, 57(12), 1251-1264.

Blum, D., Torch, S., Lambeng, N., Nissou, M., Benabid, A., Sadoul, R. & Verna, J. (2001). Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Progress in Neurobiology*, 65(2), 135-172.

Bové J., Prou D., Perier C. & Przedborski S. (2005). Toxin-Induced Models of Parkinson's Disease. *NeuroRx: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 2(3), 484-494.

Bresjanac, M. & Antauer, G. (2000). Reactive astrocytes of the quinolinic acid-lesioned rat striatum express GFRalpha1 as well as GDNF in vivo. *Experimental Neurology*, 164(1), 53-59.

- Buffo, A., Rolando, C. & Ceruti, S. (2010). Astrocytes in the damaged brain: molecular and cellular insights into their reactive response and healing potential. *Biochemical Pharmacology*, 79(2), 77-89.
- Burke, R. (2004). Ontogenic cell death in the nigrostriatal system. *Cell and Tissue Research*, 318(1), 63-72.
- Cacciatore, I., Baldassarre, L., Fornasari, E., Mollica, A. & Pinnen, F. (2012). Recent Advances in the Treatment of Neurodegenerative Diseases Based on GSH Delivery Systems. *Oxidative Medicine and cellular Longevity*, 2012, 240146.
- Cao, J., Li, F., Zhu, Y., Yuan, H., Yu, Z. & Gao, D. (2010). Expressions and possible roles of GDNF receptors in the developing dopaminergic neurons. *Brain Research Bulletin*, 83(6), 321-330.
- Choi-Lundberg, D. & Bohn, M. (1995). Ontogeny and distribution of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) mRNA in rat. *Developmental Brain Research*, 85(1), 80-88.
- Connor, B. (2001). Adenoviral vector-mediated delivery of glial cell line-derived neurotrophic factor provides neuroprotection in the aged parkinsonian rat. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 28(11), 896-900.
- Cossette M., Bedard A. & Parent A. (2003) Dopaminergic Neurons in Human Striatum and Neurogenesis in Adult Monkey Striatum. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 991, 346-349.
- Dauer, W. & Przedborski, S. (2003). Parkinson's Disease : Mechanisms and Models. *Neuron*, 39(6), 889-909.
- Di Liberto, V., Mudò, G. & Belluardo, N. (2011). mGluR2/3 agonist LY379268, by enhancing the production of GDNF, induces a time-related phosphorylation of RET receptor and intracellular signaling Erk1/2 in mouse striatum. *Neuropharmacology*, 61(4), 638-645.
- Ding, Y., Jaumotte, J., Signore, A. & Zigmond, M. (2004). Effects of 6-hydroxydopamine on primary cultures of substantia nigra: specific damage to dopamine neurons and the impact of glial cell line-derived neurotrophic factor. *Journal of Neurochemistry*, 89(3), 776-787.
- Double, K. (2012). Neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *Parkinsonism and Related Disorders*, 18(1), 52-54.

- Du, Y., Li, X., Yang, D., Zhang, X., Chen, S., Huang, K. & Le, W. (2008). Multiple molecular pathways are involved in the neuroprotection of GDNF against proteasome inhibitor induced dopamine neuron degeneration in vivo. *Experimental Biology and Medicine*, 233(7), 881-890.
- Gaig, C. & Tolosa, E. (2009). When does Parkinson's disease begin? *Movement Disorders*, 24(2), 656-664.
- Gao, H. & Hong, J. (2008). Why neurodegenerative diseases are progressive: uncontrolled inflammation drives disease progression. *Trends in Immunology*, 29(8), 357-365.
- Garbayo, E., Montero-Menei, C., Ansorena, E., Lanciego, J., Aymerich, M. & Blanco-Prieto, M. (2009). Effective GDNF brain delivery using microspheres-A promising strategy for Parkinson's disease. *Journal of Controlled Release*, 135(2), 119-126.
- Gonzalez-Aparicio, R., Flores, J. & Fernandez-Espejo, E. (2010). Antiparkinsonian trophic action of glial cell line-derived neurotrophic factor and transforming growth factor β 1 is enhanced after co-infusion in rats. *Experimental Neurology*, 226(1), 136-147.
- Gouhier, C., Chalon, S., Aubert-Pouessel, A., Venier-Julienne, M., Jollivet, C., Benoit, J. & Guilloteau, D. (2002). Protection of dopaminergic nigrostriatal afferents by GDNF delivered by microspheres in a rodent model of Parkinson's disease. *Synapse*, 44(3), 124-131.
- Hastings, T. (2009). The role of dopamine oxidation in mitochondrial dysfunction: implications for Parkinson's disease. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 41(6), 469-472.
- Hong, Z., Liu, J., Xia, L., Pan, J., Xiao, Q., Lu, G., Liang, L. & Chen, S. (2009). Identification of glial-cell-line-derived neurotrophic factor-regulated proteins of striatum in mouse model of Parkinson disease. *Proteomics, Clinical Applications*, 3(9), 1072-1083.
- Hurelbrink, C. & Barker, R. (2004). The potential of GDNF as a treatment for Parkinson's disease. *Experimental Neurology*, 185(1), 1-6.
- Kirik D., Rosenblad C. & Björklund A. (2000). Preservation of a functional nigrostriatal dopamine pathway by GDNF in the intrastriatal 6-OHDA lesion model depends on the site of administration of the trophic factor. *The European Journal of Neuroscience*, 12(11), 3871-3882.
- Kirik, D., Georgievska, B. & Björklund, A. (2004). Localized striatal delivery of GDNF as a treatment for Parkinson disease. *Nature Neuroscience*, 7(2), 105-110.

Kordower J., Emborg M., Bloch J., Ma S., Chu Y., Leventhal L., McBride J., Chen E., Palfi S., Roitberg B., Brown W., Holden J., Pyzalski R., Taylor M., Carvey P., Ling Z., Trono D., Hantraye P., Déglon N. & Aebischer P. (2000). Neurodegeneration prevented by lentiviral vector delivery of GDNF in primate models of Parkinson's disease. *Science*, 290(5492), 767-773.

Kramer, E., Aron, L., Ramakers, G., Seitz, S., Zhuang, X., Beyer, K., Smidt, M. & Klein, R. (2007). Absence of Ret signaling in mice causes progressive and late degeneration of the nigrostriatal system. *PLoS Biology*, 5(3), 616-628.

Li, X., Peng, C., Li, L., Ming, M., Yang, D. & Le, W. (2007). Glial cell-derived neurotrophic factor protects against proteasome inhibition-induced dopamine neuron degeneration by suppression of endoplasmic reticulum stress and caspase-3 activation. *The Journals of Gerontology: Biological Sciences*, 62(9), 943-950.

Liedhegner E., Steller K. & Mielay J. (2011). Levodopa activates apoptosis signaling kinase 1 (ASK1) and promotes apoptosis in a neuronal model: implications for the treatment of Parkinson's disease, *Chemical Research in Toxicology*, 24(10), 1644-1652.

Löhle, M. & Reichmann, H. (2010). Clinical neuroprotection in Parkinson's disease - still waiting for the breakthrough. *Journal of the Neurological Sciences*, 289(1-2), 104-114.

Long-Smith, C., Sullivan, A. & Nolan, Y. (2009). The influence of microglia on the pathogenesis of Parkinson's disease. *Progress in Neurobiology*, 89(3), 277-287.

Lotharius, J. & Brundin, P. (2002). Pathogenesis of Parkinson's disease: dopamine, vesicles and α -synuclein. *Nature Reviews. Neuroscience*, 3(12), 932-942.

Mattson, M. & Magnus, T. (2006). Ageing and neuronal vulnerability. *Nature reviews. Neuroscience*, 7(4), 278-294.

Mertens, B., Massie, A., Michotte, Y. & Sarre, S. (2009). Effect of nigrostriatal damage induced by 6-hydroxydopamine on the expression of glial cell line-derived neurotrophic factor in the striatum of the rat. *Neuroscience*, 162(1), 148-154.

Mosley, R., Benner, E., Kadiu, I., Thomas, M., Boska, M., Hasan, K., Laurie, C. & Gendelman H. (2006). Neuroinflammation, Oxidative Stress and the Pathogenesis of Parkinson's Disease. *Clinical Neuroscience Research*, 6(5), 261-281.

Mura A., Jackson D., Manley M., Young S. & Groves P. (1995). Aromatic L-amino acid decarboxylase immunoreactive cells in the rat striatum: a possible site for the conversion of exogenous L-DOPA to dopamine. *Brain Research*, 704(1), 51-60.

- Nagatsu, T. & Sawada, M. (2009). L-dopa therapy for Parkinson's disease: past, present, and future. *Parkinsonism & Related Disorders*, 15(1), 3-8.
- Nakagawa, T. & Schwartz, J. (2004). Gene expression profiles of reactive astrocytes in dopamine-depleted striatum. *Brain Pathology*, 14(3), 275-280.
- Nakajima, K., Hida, H., Shimano, Y., Fujimoto, I., Hashitani, T., Kumazaki, M., Sakurai, T. & Nishino, H. (2001). GDNF is a major component of trophic activity in DA-depleted striatum for survival and neurite extension of DAergic neurons. *Brain Research*, 916(1-2), 76-84.
- National Institutes of Health - Department of Health and Human Services (2001). Stem cells: Scientific Progress and Future Research Directions.
<http://stemcells.nih.gov/info/2001report/chapter8.asp> (Consultado em 12/06/12).
- Oo, T., Kholodilov, N. & Burke, R. (2003). Regulation of natural cell death in dopaminergic neurons of the substantia nigra by striatal glial cell line-derived neurotrophic factor in vivo. *The Journal of Neuroscience*, 23(12), 5141-5148.
- Oo, T., Ries, V., Cho, J., Kholodilov, N. & Burke, R. (2005). Anatomical Basis of Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor Expression in the Striatum and Related Basal Ganglia during Postnatal Development of the Rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 484(1), 57-67.
- Paratcha, G., Ledda, F. & Ibáñez, C. (2003). The neural cell adhesion molecule NCAM is an alternative signaling receptor for GDNF family ligands. *Cell*, 113(7), 867-879.
- Pardo, B., Mena, M., Casarejos, M., Paíno, C. & De Yébenes, J. (1995). Toxic effects of L-DOPA on mesencephalic cell cultures: protection with antioxidants. *Brain Research*, 682(1-2), 133-143.
- Pedrosa, R. & Soares-da-Silva, P. (2002). Oxidative and non-oxidative mechanisms of neuronal cell death and apoptosis by L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) and dopamine. *British Journal of Pharmacology*, 137(8), 1305-13.
- Peterson, A. & Nutt, J. (2008). Treatment of Parkinson's Disease with Trophic Factors. *Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 5(2), 270-280.
- Peterson, L. & Flood, P. (2012). Oxidative stress and microglial cells in Parkinson's disease. *Mediators of Inflammation*, 2012, 401264.

- Poewe, W., Antonini, A., Zijlmans, J., Burkhard, P. & Vingerhoets, F. (2010). Levodopa in the treatment of Parkinson's disease: an old drug still going strong. *Clinical Interventions in Aging*, 5, 229-238.
- Porritt M., Batchelor P., Hughes A., Kalnins N., Donnan G. & Howells D. (2000). New dopaminergic neurons in Parkinson's disease striatum. *The Lancet*, 356(9223), 44-45.
- Rappold, P. & Tieu, K. (2010). Astrocytes and Therapeutics for Parkinson's Disease. *Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 7(4), 413-423.
- Rocha, S., Cristovão, A., Campos, F., Fonseca, C. & Baltazar, G. (2012). Astrocyte-derived GDNF is a potent inhibitor of microglial activation. *Neurobiology of Disease*. In press.
- Rosenblad, C., Kirik, D. & Björklund, A. (2000). Sequential administration of GDNF into the substantia nigra and striatum promotes dopamine neuron survival and axonal sprouting but not striatal reinnervation or functional recovery in the partial 6-OHDA lesion model. *Experimental Neurology*, 161(2), 503-516.
- Saavedra, A., Baltazar, G., Carvalho, C. & Duarte, E. (2005). GDNF modulates HO-1 expression in substantia nigra postnatal cell cultures. *Free Radical Biology & Medicine*, 39(12), 1611-1619.
- Saavedra, A., Baltazar, G., Santos, P., Carvalho, C. & Duarte, E. (2006). Selective injury to dopaminergic neurons up-regulates GDNF in substantia nigra postnatal cell cultures: role of neuron-glia crosstalk. *Neurobiology of Disease*, 23(3), 533-542.
- Saavedra, A., Baltazar, G. & Duarte, E. (2007). Interleukin-1 β mediates GDNF up-regulation upon dopaminergic injury in ventral midbrain cell cultures. *Neurobiology of Disease*, 25(1), 92-104.
- Saavedra, A., Baltazar, G. & Duarte, E. (2008). Driving GDNF expression: the green and the red traffic lights. *Progress in Neurobiology*, 86(3), 186-215.
- Sajadi, A., Bensadoun, J., Schneider, B., Lo Bianco, C. & Aebischer, P. (2006). Transient striatal delivery of GDNF via encapsulated cells leads to sustained behavioral improvement in a bilateral model of Parkinson disease. *Neurobiology of Disease*, 22(1), 119-129.
- Sanchez, B., Relova, J., Gallego, R., Ben-Batalla, I. & Perez-Fernandez, R. (2009). 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ administration to 6-hydroxydopamine-lesioned rats increases glial cell line-derived neurotrophic factor and partially restores tyrosine hydroxylase expression in substantia nigra and striatum. *Journal of Neuroscience Research*, 87(3), 723-732.

- Sandhu, J., Gardaneh, M., Iwasio, R., Lanthier, P., Gangaraju, S., Ribocco-Lutkiewicz, M., Tremblay, R., Kiuchi, K. & Sikorska, M. (2009). Astrocyte-secreted GDNF and glutathione antioxidant system protect neurons against 6OHDA cytotoxicity. *Neurobiology of Disease*, 33(3), 405-414.
- Sarabi, A., Hoffer, B., Olson, L. & Morales, M. (2001). GFRalpha-1 mRNA in dopaminergic and nondopaminergic neurons in the substantia nigra and ventral tegmental area. *The Journal of Comparative Neurology*, 441(2), 106-117.
- Sariola, H. & Saarma, M. (2003). Novel functions and signalling pathways for GDNF. *Journal of Cell Science*, 116(19), 3855-3862.
- Shingo, T., Date, I., Yoshida, H. & Ohmoto, T. (2002). Neuroprotective and restorative effects of intrastriatal grafting of encapsulated GDNF-producing cells in a rat model of Parkinson's disease. *The Journal of Neuroscience*, 69(6), 946-954.
- Siegel, G. & Chauhan, N. (2000). Neurotrophic factors in Alzheimer's and Parkinson's disease brain. *Brain Research Reviews*, 33(2-3), 199-227.
- Smith, M. & Cass, W. (2008). GDNF Reduces Oxidative Stress in a 6-Hydroxydopamine Model of Parkinson's Disease. *Neuroscience Letters*, 412(3), 259-263.
- Tokugawa K., Yamamoto K., Nishiguchi M., Sekine T., Sakai M., Ueki T., Chaki S. & Okuyama S. (2003). XIB4035, a novel nonpeptidyl small molecule agonist for GFRalpha-1. *Neurochemistry International*, 42(1), 81-86.
- Tomac, A., Widenfalk, J., Lin, L., Kohno, T., Ebendal, T., Hoffer, B. & Olson, L. (1995). Retrograde axonal transport of glial cell line-derived neurotrophic factor in the adult nigrostriatal system suggests a trophic role in the adult. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(18), 8274-8278.
- Tsang, A. & Chung, K. (2009). Oxidative and nitrosative stress in Parkinson's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1792(7), 643-650.
- Uttara, B., Singh, A., Zamboni, P. & Mahajan, R. (2009). Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Current Neuropharmacology*, 7(1), 65-74.
- Visanji N., Orsi A., Johnston T., Howson P. A., Dixon K., Callizot N., Brotchie J. & Rees D. (2008). PYM50028, a novel, orally active, nonpeptide neurotrophic factor inducer, prevents and reverses neuronal damage induced by MPP⁺ in mesencephalic neurons and by MPTP in a mouse model of Parkinson's disease. *The FASEB Journal*, 22(7), 2488-2497.

Wakeman, D., Dodiya, H. & Kordower, J. (2011). Cell Transplantation and Gene Therapy in Parkinson's Disease. *Mount Sinai Journal of Medicine*, 78(1), 126-158.

Wu, X., Chen, P., Dallas, S., Wilson, B., Block, M., Wang, C., Kinyamu, H., Lu, N., Gao, X., Leng, Y., Chuang, D., Zhang, W., Lu, R. & Hong J. (2008). Histone deacetylase inhibitors up-regulate astrocyte GDNF and BDNF gene transcription and protect dopaminergic neurons. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 11(8), 1123-1134.

Xing, B., Xin, T., Zhao, L., Hunter, R., Chen, Y. & Bing, G. (2010). Glial cell line-derived neurotrophic factor protects midbrain dopaminergic neurons against lipopolysaccharide neurotoxicity. *Journal of Neuroimmunology*, 225(1-2), 43-51.

Xu, G., Xiong, Z., Yong, Y., Wang, Z., Ke, Z., Xia, Z. & Hu, Y. (2010). Catalpol attenuates MPTP induced neuronal degeneration of nigral-striatal dopaminergic pathway in mice through elevating glial cell derived neurotrophic factor in striatum. *Neuroscience*, 167(1), 174-184.

Yan, H., Ma, X., Chen, X., Li, Y., Shao, L. & Dixon, C. (2007). Delayed increase of tyrosine hydroxylase expression in rat nigrostriatal system after traumatic brain injury. *Brain Research*, 1134(1), 171-179.

Yang, X., Lehtonen, E., Vercammen, L., Bockstael, O., Chtarto, A., Levivier, M., Brotchi, J., Michotte, Y., Baekelandt, V., Sarre, S. & Tenenbaum, L. (2009). Reversible neurochemical changes mediated by delayed intrastriatal glial cell line-derived neurotrophic factor gene delivery in a partial Parkinson's disease rat model. *The Journal of Gene Medicine*, 11(10), 899-912.

Zhu, Z., Yang, R., Fu, X., Wang, Y. & Wu, G. (2006). Astrocyte-conditioned medium protecting hippocampal neurons in primary cultures against corticosterone-induced damages via PI3-K/Akt signal pathway. *Brain Research*, 1114(1), 1-10.