

Universidade da Beira Interior

Faculdade de Ciências da Saúde



Universidade da Beira Interior
Covilhã | Portugal

“Contribuição do GDNF para a neuroprotecção exercida pelo estrogénio: estudo num modelo animal da doença de Parkinson”



Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina

Ana Paula da Silva Fonseca

Junho de 2010

Universidade da Beira Interior

Faculdade de Ciências da Saúde



Universidade da Beira Interior
Covilhã | Portugal



“Contribuição do GDNF para a neuroprotecção exercida pelo estrogénio: estudo num modelo animal da doença de Parkinson”

Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina

Por:

Ana Paula da Silva Fonseca

Orientado por:

Professora Graça Baltazar

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Medicina, realizada sob a orientação científica da Professora Graça Baltazar



RESUMO

A doença de Parkinson é a segunda doença neurodegenerativa mais comum, depois do Alzheimer, e caracteriza-se principalmente pela perda progressiva de neurónios dopaminérgicos na *Substantia Nigra*. Numerosos trabalhos reportaram a maior prevalência e incidência desta doença no sexo masculino, relativamente ao sexo feminino. Estudos envolvendo a reposição com estrogénios em ratos fêmea ovariectomizados, atribuíram esta diferença de incidências ao efeito neuroprotectivo do estrogénio. No entanto, o grau de protecção exercida por níveis fisiológicos desta hormona permanece desconhecido.

Os estrogénios também têm sido implicados na regulação da expressão de factores neurotróficos, o que pode estar na origem dos seus efeitos neuroprotectores. O factor neurotrófico derivado de uma linha de células da glia (GDNF) é um dos factores neurotróficos regulados pelo estrogénio, que foi implicado na neuroprotecção e regeneração na via nigroestriatal, actuando como um potente factor de sobrevivência para os neurónios dopaminérgicos, que são alvo de degeneração na doença de Parkinson.

De forma a esclarecer o papel dos níveis endógenos de estrogénio na protecção da via nigroestriatal, utilizámos como modelo da doença de Parkinson a 6-hidroxidopamina, e estudámos de que forma a remoção dos ovários em fêmeas férteis interferiu com a extensão da lesão dopaminérgica induzida pela toxina. As fêmeas Wistar foram ovariectomizadas e 3 semanas após a cirurgia os animais foram injectados estereotaxicamente, no estriado,



com 6-hidroxidopamina. A extensão da lesão foi avaliada através da contagem de células que expressavam o marcador dopaminérgico tirosina hidroxilase, por imunohistoquímica, assim como pelos níveis de expressão desta proteína, por western blot, tanto na *Substantia Nigra* como no estriado. Os níveis plasmáticos de estradiol também foram quantificados. De forma a determinar a existência de relação entre os níveis de estradiol, a expressão de GDNF e a extensão da lesão dopaminérgica, também foi estudada a expressão do factor neurotrófico GDNF.

Os nossos resultados sugerem fortemente que o estrogénio produzido endogenamente, assim como o GDNF, estão associados com níveis aumentados de tirosina hidroxilase estriatal, um marcador de sobrevivência da célula dopaminérgica.

Palavras chave: Estrogénios; GDNF; Doença de Parkinson; Neuroprotecção.



ABSTRACT

Parkinson's disease is the second most common neurodegenerative disorder after Alzheimer and is mainly characterized by a progressive and selective depletion of dopamine neurons in the *Substantia Nigra*. Numerous studies have reported a greater prevalence and incidence of PD in men than in women. Studies involving estrogen treatment of ovariectomised rodents attribute this largely to the neuroprotective effects of estrogen. However, a neuroprotective role for physiologic levels of circulating estrogen in females is less clear.

Estrogens have also been shown to regulate the expression of neurotrophic factors, like glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), which might mediate their neuroprotective effects. GDNF produces neuroprotective and regenerative effects in the nigrostriatal pathways, acting as a potent survival factor for dopaminergic neurons that degenerate in Parkinson's disease.

In order to clarify the role of endogenous levels of estrogens in protecting the nigrostriatal pathway, we used the 6-hydroxydopamine (6-OHDA) model of Parkinson's disease and tested how the removal of ovaries in fertile females interferes with extent of the dopaminergic lesion induced by 6-OHDA. Female Wistar rats were ovariectomised and 3 weeks after the surgery the animals were stereotaxically injected in the striatum with 6-OHDA. The extent of the lesion was assessed by counting the cells expressing the dopaminergic marker tyrosine hydroxylase by immunohistochemistry and also the expression levels of



this protein by Western blot in both the *Substantia Nigra* and the striatum. The plasma levels of estradiol were also quantified. To determine if there was a relationship between estradiol levels, the expression of GDNF and the extent of the dopaminergic lesion, we also studied the expression of the neurotrophic factor GDNF.

Our findings strongly suggest that endogenously produced estrogens and GDNF are associated with increased levels of striatal tyrosine hydroxylase, a marker of dopaminergic cell survival.

Keywords: Estrogens; GDNF; Parkinson's disease; Neuroprotection.



AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por me terem tornado naquilo que sou.

Às minhas irmãs, que foram sempre um exemplo para mim.

Ao Nuno, pela dedicação, apoio e companheirismo.

A todos os meus amigos, que tornaram estes seis anos maravilhosos.

À Filipa, Ana Clara e Sandra, pela paciência e disponibilidade.

Agradecimento especial à minha orientadora, Professora Graça Baltazar, pela disponibilidade, apoio e optimismo.



ÍNDICE

RESUMO	I
ABSTRACT	III
AGRADECIMENTOS	V
ÍNDICE	VI
ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS	X
1 – INTRODUÇÃO	1
2 – MÉTODOS	5
2.1 – Animais	5
2.2 – Ovariectomia	6
2.3 – Modelo da 6-OHDA na DP	6
2.4 – Western blot	7
2.5 – Imunohistoquímica	9
2.6 – Quantificação do estradiol no soro	10
2.7 – Análise dos dados e estatística	10
3 – RESULTADOS	11
3.1 – Efeito da 6-OHDA na lesão dopaminérgica	11
3.2 – Efeito da ovariectomia na lesão dopaminérgica induzida por 6-OHDA	14
3.3 – Níveis plasmáticos de estradiol e sua correlação com os níveis de expressão de células TH⁺	16
3.4 - Correlação entre a extensão da lesão e os níveis de GDNF	19



4 – DISCUSSÃO	20
4.1 – A injeção com 6-OHDA induziu lesão dopaminérgica na SN e no estriado	20
4.2 – Efeito da ovariectomia na lesão induzida por 6-OHDA	21
4.3 – Correlação entre os estrogénios e a extensão da lesão	22
4.4 – Correlação entre os níveis de TH e de GDNF	23
5 – CONCLUSÃO	24
6 – BIBLIOGRAFIA	25



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Cronograma temporal dos procedimentos laboratoriais.....	5
Figura 2 - Esquematização dos procedimentos laboratoriais efectuados.	7
Figura 3 - Efeito da lesão com 6-OHDA no número de células dopaminérgicas TH ⁺ na SN, usando o método de IHQ	12
Figura 4 - Efeito da injeção com 6-OHDA no nível de TH na SN, usando o método WB	12
Figura 5 - Efeito da injeção com 6-OHDA no nível de TH no estriado, usando o ensaio de WB.....	13
Figura 6 - Efeito da ovariectomia na lesão dopaminérgica induzida por 6-OHDA.....	15
Figura 7 - Efeito da ovariectomia nos níveis de expressão mesencefálica de TH em animais expostos a 6-OHDA.	15
Figura 8 - Efeito da ovariectomia nos níveis de expressão estriatal de TH em animais expostos a 6-OHDA.....	16



Figura 9 - Níveis de estradiol (E2) plasmático em animais OVT e não OVT....17

Figura 10 - Níveis médios de estradiol (E2) em fêmeas OVT e não OVT18

Figura 11 - Correlação entre os níveis plasmáticos de estradiol (E2) e a extensão da lesão na SN..18

Figura 42 - Correlação entre os níveis estriatais de TH e de GDNF19



LISTA DE ABREVIATURAS

6-OHDA: 6-hidroxidopamina

IHQ: Imunohistoquímica

Células TH⁺: células que
expressam tirosina hidroxilase

OVT: ovariectomizados(as)

DA: dopamina

SN: *Substantia Nigra*

DP: doença de Parkinson

TH: tirosina hidroxilase

GDNF: glial cell line-derived
neurotrophic factor, factor
neurotrófico derivado de uma linha
de células da glia

WB: western blot



1 – INTRODUÇÃO

A doença de Parkinson (DP) é a segunda doença neurodegenerativa mais prevalente (1), afectando cerca de 3% dos indivíduos acima dos 65 anos (2). Os fenómenos neurodegenerativos ocorrem primordialmente na via nigroestriatal e caracterizam-se pela perda progressiva de neurónios dopaminérgicos na *Substantia Nigra (SN)* e seus terminais nervosos no estriado dorsal, com a consequente redução dos níveis de dopamina (DA) (2). Estas alterações resultam em tremor, rigidez, bradicinésia e desequilíbrio (sintomas primários), assim como depressão, demência, dificuldade em engolir e falar (sintomas secundários) (3).

As abordagens terapêuticas actuais baseiam-se maioritariamente na reposição da DA ou na administração de agonistas dopaminérgicos (4, 5). Apesar destas abordagens serem eficazes nos estágios iniciais da doença, fenómenos de tolerância e efeitos secundários debilitantes vão-se intensificando ao longo do tempo (6). Estas limitações, juntamente com o facto de actuarem apenas a nível sintomático, e não etiológico, realçam a necessidade de novas terapias, que modifiquem o curso degenerativo da doença.

A etiologia da DP é desconhecida, tendo sido atribuídos factores ambientais e genéticos à sua origem (2). As formas familiares, que colectivamente constituem uma pequena porção dos casos, foram associadas a mutações em diversos genes (PINK1, Parkin, UCHL-L1 e LRRK2) (7).



Juntamente com a idade, um dos factores de risco mais frequentemente associados à doença é o sexo masculino, sendo este género duas vezes mais afectado, em qualquer idade (7, 8). Esta diferença deve-se, sobretudo, às hormonas sexuais, nomeadamente ao estrogénio, hormona sexual identificada em vários estudos como sendo neuroprotectora (1, 3, 9). Resultados que mostram um agravamento da sintomatologia parkinsónica aquando a interrupção da terapia de reposição hormonal na menopausa, assim como em fases do ciclo menstrual com níveis mais baixos desta hormona (3, 10), apoiam esta hipótese.

Apesar dos mecanismos pelos quais o estrogénio induz protecção serem desconhecidos, sabe-se que este exerce vários efeitos relacionados com o seu potencial neuroprotector: redução do stress oxidativo (11, 12), inibição dos mecanismos apoptóticos (13, 14), modulação da actividade das células da glia (15) e regulação da expressão de factores neurotróficos (16, 17).

O GDNF é um dos factores neurotróficos mais potentes (18) e um poderoso protector dos neurónios dopaminérgicos (19, 20). Vários estudos demonstraram que o tecido nervoso reage a vários tipos de lesão aumentando a produção de factores neurotróficos, como o GDNF (21-23). O GDNF previne a apoptose induzida pelo stress oxidativo, aumentando a produção de proteínas anti-apoptóticas (24, 25).

Foi sugerido que a protecção exercida pelos estrogénios está relacionada com a sua acção reguladora na expressão de factores neurotróficos como o GDNF (26). No entanto, desconhecem-se os seus efeitos em níveis fisiológicos, assim como se a neuroprotecção induzida pelo



estrogénio é mediada *per se* ou pelo aumento de factores neurotróficos por ele provocado.

Para além da acção neuroprotectora exercida pelos estrogénios nas fêmeas, a hormona masculina, testosterona, parece também contribuir para acentuar as diferenças manifestadas por homens e mulheres na doença. Estudos feitos em modelos animais da DP, em que se procedeu à injeccção com 6-OHDA (6-hidroxidopamina), uma toxina indutora dos fenómenos típicos da doença, mostraram que machos gonadectomizados apresentavam uma redução da extensão da lesão na via nigroestriatal, relativamente aos animais não gonadectomizados. No entanto, quando foram administrados estrogénios aos machos gonadectomizados, o grau de lesão foi semelhante entre os dois grupos (3, 9). Estes dimorfismos sexuais são apenas evidentes com doses submáximas de 6-OHDA, sugerindo que a neuroprotecção intrínseca induzida pela presença de estrogénio é limitado a lesões parciais (9).

Tem sido demonstrado que a administração exógena de estrogénios pode diminuir a extensão da lesão por 6-OHDA em fêmeas ovariectomizadas (OVT) (9), no entanto desconhecem-se os efeitos dos níveis endógenos desta hormona na toxicidade induzida pela 6-OHDA.

Com o objectivo de determinar a importância dos níveis endógenos de estrogénio num modelo animal da DP, fêmeas Wistar OVT ou não (controlo), foram injectadas estereotaxicamente, no estriado, com 6-OHDA. Este modelo apresenta níveis aumentados de stress oxidativo, perda dopaminérgica progressiva, neuroinflamação e excitotoxicidade, que resultam na degeneração da via nigroestriatal (3) e no desenvolvimento de características semelhantes às apresentadas na DP.



A extensão da lesão foi avaliada por contagem do número de células que expressam o marcador dopaminérgico tirosina hidroxilase (TH) - células TH positivas (células TH⁺) -, por imunohistoquímica (IHQ), e ainda pelo estudo dos níveis de expressão desta enzima usando a técnica de western Blot (WB). O estrogénio plasmático e o GDNF foram quantificados, de forma a permitir a sua associação com o grau de lesão.

2 – MÉTODOS

2.1 – Animais

A amostra inicial consistiu em 40 fêmeas Wistar, com 3 meses de idade. Todos os animais foram manipulados de acordo com os requisitos éticos para a pesquisa animal e com a European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes. Os animais foram alojados em gaiolas próprias, sobre condições controladas de temperatura e luz, com água e comida disponíveis *ad libitum*.

Foram feitos todos os esforços para minimizar o sofrimento animal, assim como o número de animais necessários para a produção deste trabalho.

O cronograma temporal das experiências está representado na figura 1.



Figura 1. Cronograma temporal dos procedimentos laboratoriais. Após terem sido submetidas a ovariectomia, as fêmeas Wistar recuperaram durante 3 semanas até à injeção estereotáxica da solução veículo ou da toxina. Sucedeu-se, por fim, o sacrifício dos animais, 5 dias após a injeção.



2.2 – Ovariectomia

Metade da amostra, 20 fêmeas Wistar, foi submetida a ovariectomia bilateral sob anestesia com Quetamina (87,5mg/Kg) e Xilazina (12,5mg/Kg).

2.3 – Modelo da 6-OHDA na DP

Três semanas após a ovariectomia, metade da amostra OVT, e metade da amostra não OVT, foi injectada com 6-OHDA. A restante amostra foi injectada com o mesmo volume de veículo.

Após a anestesia com Quetamina (87,5mg/Kg) e Xilazina (12,5mg/Kg), os animais foram colocados numa mesa estereotáxica para injeção unilateral de 6-OHDA (4 µl de uma solução salina de 5 µg/µl em ácido ascórbico 0.2%), a uma velocidade de 0.4 µl/min no estriado, usando como coordenadas: 1,3 mm posterior; 3,0 mm lateral; 4,5 mm ventral, relativamente ao bregma e de acordo com o atlas estereotáxico de Paxinos e Watson (1982).

A solução de 6-OHDA foi sempre mantida em gelo e protegida da luz. Todas as injeções foram administradas com a seringa Hamilton de 10 µl, controlada por um nanoinjector. Após a injeção, a cânula foi mantida na mesma posição durante 5 min antes de ser lentamente retirada.

Cinco dias após a cirurgia, um grupo de animais foi profundamente anestesiado e sujeito a transfusão cardíaca de 10 min com tampão fosfato salino (PBS) contendo heparina (500U/L), seguido de uma perfusão com paraformaldeído (4% PFA em PBS) durante 10 min. O cérebro foi depois removido cirurgicamente para análise por IHQ. O outro grupo de animais foi

sacrificado sob anestesia, sendo o estriado e a SN dissecados e congelados a -80°C para posterior análise em WB.

A figura 2 descreve sinteticamente os procedimentos laboratoriais efectuados.

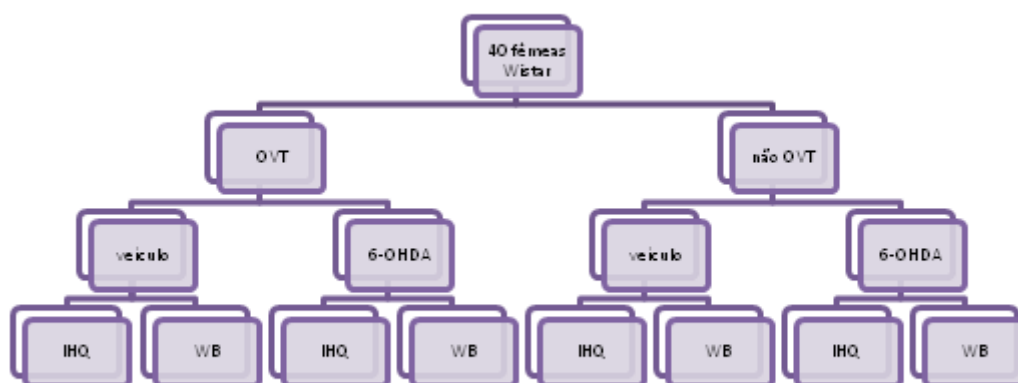


Figura 2. Esquemática dos procedimentos laboratoriais efectuados. A amostra inicial foi dividida em fêmeas OVT e não OVT. Metade da população OVT e metade da população não OVT foi injectada com veículo, e a outra metade, injectada com 6-OHDA. Posteriormente, recolheram-se amostras de metade das fêmeas de cada grupo - OVT injectadas com veículo ou 6-OHDA e não OVT injectadas com veículo ou 6-OHDA – para serem analisadas por WB. As amostras das restantes fêmeas foram recolhidas para análise por IHQ.

2.4 – Western blot

Os níveis proteicos de GDNF e de TH foram determinados por análise de tecidos homogeneizados numa solução de lise contendo Tris 25 mM, EDTA 2,5 mM, EGTA 2,3 mM, Triton X-100 0,2%, DTT 1mM, PMSF 1mM e leupeptina 25,57 μM . As amostras homogeneizadas foram centrifugadas a 14.000xg durante 20 min a 4°C , sendo o sobrenadante recolhido. A quantidade de proteína total presente na amostra foi determinada usando o método de Bradford e a albumina sérica de bovino como padrão. As amostras foram desnaturadas por adição de um tampão contendo – Tris 100mM, glicina



100mM, SDS 4%, ureia 8M e de Azul de Bromofenol 0,01% - seguida de aquecimento a 100°C durante 5 min. Para cada amostra foram aplicados no gel entre 4-25 µg de proteína total. As proteínas na amostra foram separadas por SDS-PAGE num gel com 12% de acrilamida.

Após a electroforese, as proteínas foram transferidas do gel para a membrana de difluoreto de polivinildieno (PVDF-Amersham Life Sciences), previamente activada por imersão em metanol durante 5 seg, seguida de uma incubação de 5 min em água, e finalmente em tampão de electrotransferência durante 15 min. Seguiu-se o bloqueio das ligações não específicas por incubação da membrana numa solução com 5% de leite magro em TBS-T (Tween 20 0,1% em Tris 20 mM e NaCl 137 mM), durante 60 min à temperatura ambiente.

Após o bloqueio, as membranas foram incubadas durante a noite a 4°C com os anticorpos primários diluídos em TBS-T: anti-GDNF de coelho (1:1000; Santa Cruz Biotechnology) ou anti-TH de rato (1:5000; Transduction Laboratories).

Após 4 lavagens com TBS-T, as membranas foram incubadas durante 60 min, à temperatura ambiente, com anticorpos secundários: imunoglobulinas de cabra dirigidas a imunoglobulinas de coelho ou de rato e conjugadas a fosfatase alcalina (Amersham Biosciences), diluídos em TBS-T.

As membranas foram incubadas com o substrato da fosfatase alcalina, ECF (ECF Western Blotting Reagent Packs, Amersham) durante 3 min. As bandas foram detectadas através do Molecular Imager FX system (Biorad) e quantificadas por análise densitométrica usando o software Quantity One (Biorad).



2.5 – Imunohistoquímica

Os cérebros foram fixados em 4% de PFA, durante 24h a 4°C, e criopreservados por imersão em 30% de sucrose em PBS com 0,02% azida de sódio, a 4°C. Após 2-3 dias de imersão nesta solução foram congelados a -80°C.

Após revestimento com o polímero OTC (Tissues-Tek), os cérebros foram seccionados num crióstato em secções coronais de 35 µm. As fatias obtidas foram recolhidas e processadas para IHQ.

Na detecção da TH foi usada uma técnica cromogénica. As fatias foram incubadas durante 60 min em PBS com 10% de soro fetal bovino (FCS) contendo 0,1% de Triton X-100, de modo a minimizar as ligações não específicas dos anticorpos primários. A este passo seguiu-se uma incubação numa solução com H₂O₂ a 1% que teve como objectivo bloquear a actividade das peroxidases endógenas. As fatias foram posteriormente incubadas com anticorpo de murganho anti-TH (1:1000; Transduction Laboratories), diluídas em PBS com FCS 1%, durante a noite, a 4°C. Seguiu-se uma nova incubação com um anticorpo secundário - anti-imunoglobulina de rato biotinilado (1:200; Vector Laboratories) - diluído em PBS com FCS 1%, durante 1h, à temperatura ambiente. Por fim, procedeu-se a uma incubação com avidina conjugada a peroxidases (Vectastain, Elite ABC Kit, Vector Laboratories), diluída em PBS (1:1000) durante 50 min, à temperatura ambiente.

A acção das peroxidases sobre uma solução de diaminobenzidina (DAB, Sigma) preparada numa solução salina tris (TBS) com H₂O₂ 0,024%, deu origem a um composto de cor acastanhada facilmente detectável.



O tempo de incubação e de exposição usados foi mantido constantemente em todos os cortes histológicos.

Finalmente, os cortes histológicos foram montados em lâminas revestidas com poli-L-lisina (PolysineTM, Menzel-Glaser), desidratados e cobertos com meio de montagem (Entellan-Rapid mounting media for microscopy-Merck).

2.6 – Quantificação do estradiol no soro

Aproximadamente 1 ml de sangue foi recolhido a partir do ventrículo esquerdo aquando o sacrifício dos animais. O soro foi obtido por centrifugação do sangue a 14.000xg durante 30 min, a 4°C. As amostras foram mantidas a -20°C até à altura da análise. O estradiol no soro foi determinado por um método quimioluminescente usando o kit Advia Centaur (SIEMENS Healthcare Diagnostics).

2.7 – Análise dos dados e estatística

Os dados foram expressos como percentagens de valores obtidos nos controlos e são representados como média \pm desvio padrão da média para pelo menos três animais. A análise estatística foi elaborada usando o t-teste e o modelo de regressão linear. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. Toda a análise estatística foi feita usando o GraphPad Prism v. 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA).



3 – RESULTADOS

3.1 – Efeito da 6-OHDA na lesão dopaminérgica

Com o objectivo de analisar a lesão induzida pela injeção com a toxina 6-OHDA, foi quantificado o número de células dopaminérgicas presentes na SN por IHQ, sendo ainda determinados os níveis de expressão do marcador dopaminérgico TH por WB na SN e no estriado.

- *Substantia Nigra*

Os resultados obtidos mostraram que a injeção com 6-OHDA promoveu uma redução significativa ($p= 0,007$) do número de células dopaminérgicas de $100,5 \pm 2,4$ para $75,3 \pm 4,2$ (figura 3).

Contrariamente, a análise dos níveis de expressão da TH por WB não permitiu observar diferenças estatisticamente significativas entre o lado ipsilateral ($96,4 \pm 31,5$), lado injectado com a toxina, e o lado contralateral ($134,1 \pm 25$), lado oposto à lesão ($p=0,4$; figura 4).

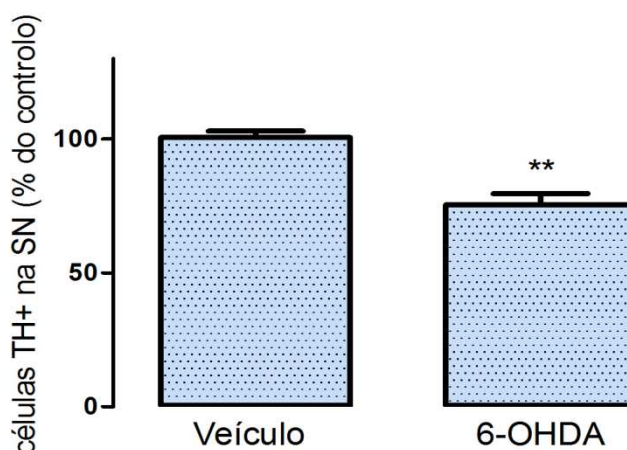


Figura 3. Efeito da lesão com 6-OHDA no número de células dopaminérgicas TH⁺ na SN, usando o método de IHQ. A percentagem de células sobreviventes é menor no grupo lesionado com 6-OHDA ($p=0,007$), comprovando a eficácia da lesão induzida por esta toxina. A percentagem de células TH⁺ sobreviventes no lado ipsilateral foi calculada relativamente ao lado contralateral (controlo) de cada animal, em cada secção. A média das percentagens de células TH⁺ foi calculada para cada animal (fazendo a média das secções) e para cada grupo (fazendo a média dos animais), obtendo assim dois grupos: o injectado com solução veículo e o lesionado com 6-OHDA. Os resultados são expressos, para cada grupo, como média \pm desvio padrão da percentagem de células sobreviventes no lado injectado relativamente ao lado contralateral. A análise estatística foi processada usando o t-test. ** $p < 0,01$.

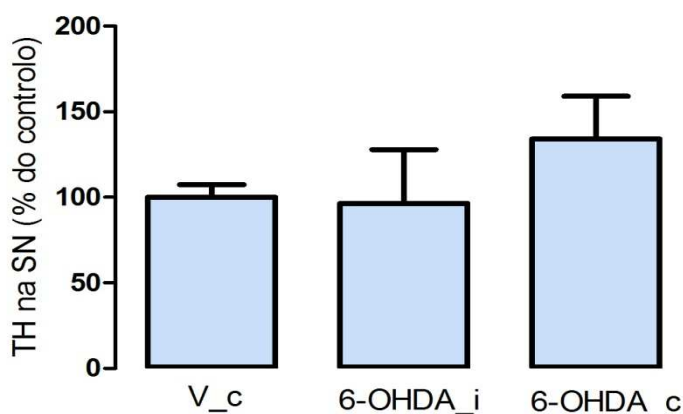


Figura 4. Efeito da injeção com 6-OHDA no nível de TH na SN, usando o método WB. Para cada grupo, foi calculada a média \pm desvio padrão da percentagem de TH remanescente, relativamente à média do grupo controlo que, neste caso, é o grupo V_C. A análise estatística foi processada usando o t-test. V_c, injectado com veículo, contralateral; 6-OHDA_i, injectado com 6-OHDA ipsilateral; 6-OHDA_c, injectado com 6-OHDA contralateral.

- Estriado

Dada a dificuldade em quantificar o número de terminais nervosos dopaminérgicos, a avaliação da lesão dopaminérgica a nível estriatal por IHQ fornece apenas dados qualitativos. Por esta razão, a avaliação da extensão da lesão no estriado foi feita recorrendo apenas à técnica de WB.

Os resultados obtidos mostraram que a injeção com 6-OHDA promoveu uma redução significativa ($p=0,003$) dos níveis de TH de $105,9 \pm 2,5$ (lado contralateral) para $61,5 \pm 2,8$ (lado ipsilateral), comprovando a eficiência do processo usado para induzir a lesão (figura 5).

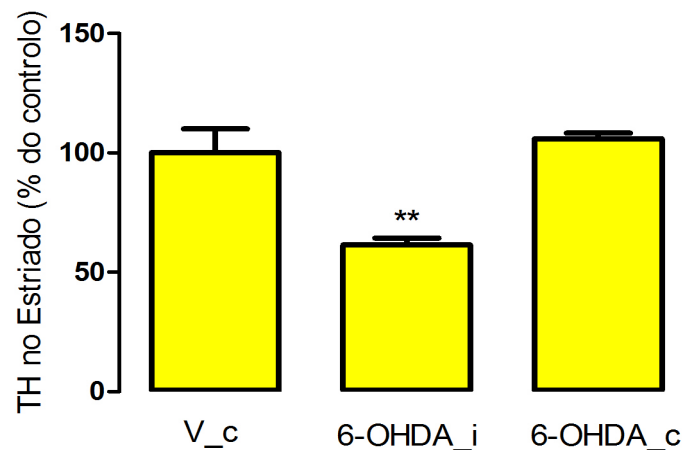


Figura 5. Efeito da injeção com 6-OHDA no nível de TH no estriado, usando o ensaio de WB. Para cada grupo, foi calculada a média \pm desvio padrão da percentagem de TH remanescente, relativamente à média do grupo controlo que, neste caso, é a o grupo V_C (injectado com veículo, contralateral). A análise estatística foi feita usando o t-test. ** $P < 0,01$; 6-OHDA_i, injectado com 6-OHDA ipsilateral; 6-OHDA_c, injectado com 6-OHDA contralateral.

3.2 – Efeito da ovariectomia na lesão dopaminérgica induzida por 6-OHDA

Após se ter confirmado a eficiência da técnica usada para induzir a lesão dopaminérgica, avaliámos de que forma a remoção dos ovários a fêmeas Wistar em idade fértil (3 meses) afectava ou não a extensão da lesão atingida.

- *Substantia Nigra*

Os resultados obtidos mostraram que o número de células dopaminérgicas na SN dos animais sujeitos a ovariectomia não sofreu alterações significativas ($p=0,2$), quando comparados ambos os grupos veículo ($96,0 \pm 19,1$) e lesionado ($56,8 \pm 16,9$). O mesmo não se passou entre ambos os grupos não OVT, em que a injeccção com 6-OHDA alterou significativamente ($p= 0,007$) o número de células TH⁺ relativamente ao grupo injectado com a solução veículo ($100,5 \pm 2,4$ veículo não OVT; $75,3 \pm 4,2$ 6-OHDA não OVT; figura 6).

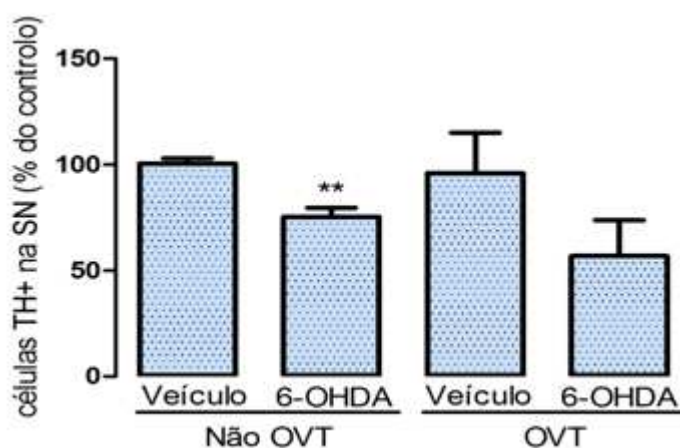


Figura 6. Efeito da ovariectomia na lesão dopaminérgica induzida por 6-OHDA. O número de células TH⁺ diminui significativamente no grupo não OVT sujeito a lesão ($p= 0,007$), enquanto que no grupo OVT sujeito a lesão, a diminuição de células TH⁺ não foi significativa ($p=0,2$). A percentagem de células TH⁺ no lado ipsilateral foi calculada relativamente ao lado contralateral (controlo) de cada animal, em cada secção. A média das percentagens de células TH⁺ sobreviventes foi calculada para cada animal (fazendo a média das secções) e para cada grupo (fazendo a média dos animais), obtendo assim quatro grupos: veículo não OVT, 6-OHDA não OVT, veículo OVT e 6-OHDA OVT. A análise estatística foi processada usando t-test. ** $P<0,01$.

Quando analisada a expressão da TH na SN, os resultados obtidos não mostraram efeitos significativos da injeção da toxina nos níveis de expressão desta enzima, quer em animais controlo quer em animais sujeitos à ovariectomia (figura 7).

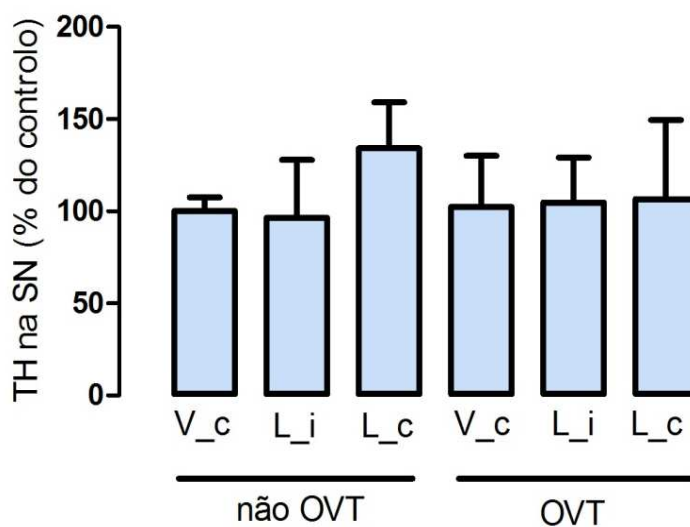


Figura 7. Efeito da ovariectomia nos níveis de expressão mesencefálica de TH em animais expostos a 6-OHDA. Os resultados obtidos não mostraram efeitos significativos da injeção da toxina nos níveis de expressão da TH, quer em animais sujeitos à ovariectomia ($p=0,4$), quer em animais não OVT ($p=1$). Para cada grupo, foi calculada a média \pm desvio padrão da percentagem de TH remanescente, relativamente à média do grupo controlo que, neste caso, é o grupo não OVT, injectado com veículo, contralateral. A análise estatística foi processada usando o t-test. V_c, veículo contralateral; L_i, lesionado ipsilateral; L_c, lesionado contralateral.

- **Estriado**

A análise da expressão da TH a nível estriatal, por WB, permitiu observar reduções significativas dos níveis de TH por acção da 6-OHDA ($61,5 \pm 2,8$) apenas em animais controlo, não sujeitos a ovariectomia. Em animais OVT, a injeção da 6-OHDA não induziu qualquer redução nos níveis da TH. Este resultado sugere que a lesão promovida pela 6-OHDA é mais extensa em animais não OVT (figura 8).

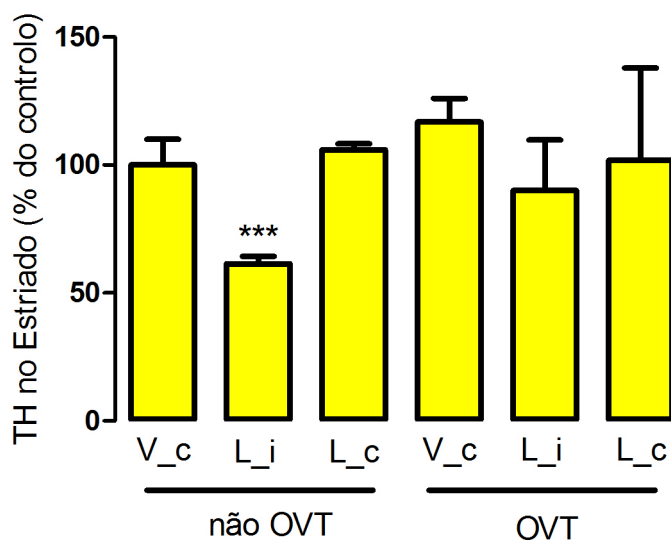


Figura 8. Efeito da ovariectomia nos níveis de expressão estriatal de TH em animais expostos a 6-OHDA. Os resultados obtidos mostraram efeitos significativos da injeção da toxina nos níveis de expressão da TH em animais não sujeitos a ovariectomia ($p=0,0003$), mas não em animais OVT ($p=0,7903$). Para cada grupo, foi calculada a média \pm desvio padrão da percentagem de TH remanescente, relativamente à média do grupo controlo que, neste caso, é o grupo não OVT, injectado com veículo. A análise estatística foi processada usando o t-test. *** $P<0,001$; V_c, veículo contralateral; L_i, lesionado ipsilateral; L_c, lesionado contralateral.

3.3 – Níveis plasmáticos de estradiol e sua correlação com os níveis de expressão de células TH⁺

De modo a podermos confirmar se as diferenças obtidas na extensão da lesão dopaminérgica em animais OVT e animais controlo poderiam ser correlacionadas com os níveis de estradiol plasmático, procedeu-se à quantificação desta hormona no plasma.

Os níveis de estradiol analisados foram muito variáveis, com um grande intervalo de valores em ambos os grupos, não se observando, contrariamente ao esperado, níveis constantemente baixos de estradiol nas fêmeas OVT (figura 9). No entanto, os valores médios de estradiol revelaram que existe uma diferença significativamente estatística ($p=0.01$) entre ambos os grupos, com



menores níveis médios de estradiol em OVT ($22,3 \pm 2,0$) relativamente aos não OVT ($30,9 \pm 2,5$; figura 10).

Quando se relacionaram os níveis de estradiol, medidos em cada animal, com o número de células TH⁺ correspondente, verificámos que os animais com níveis de estradiol plasmático mais elevado apresentaram maior número de células TH⁺ ($R^2 = 0,56$; figura 11).

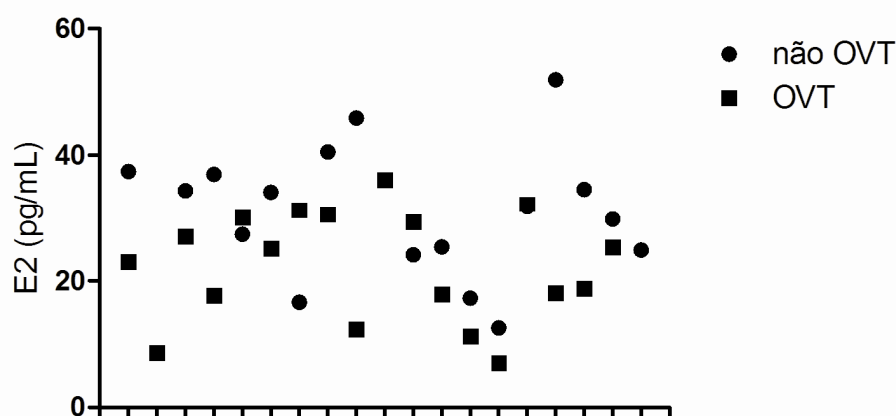


Figura 9. Nível de estradiol (E2) plasmático em fêmeas OVT e não OVT. Observa-se uma grande variabilidade nos valores de estradiol, com um grande intervalo de valores em ambos os grupos, não se observando, contrariamente ao esperado, níveis constantemente menores de estradiol nas fêmeas OVT.

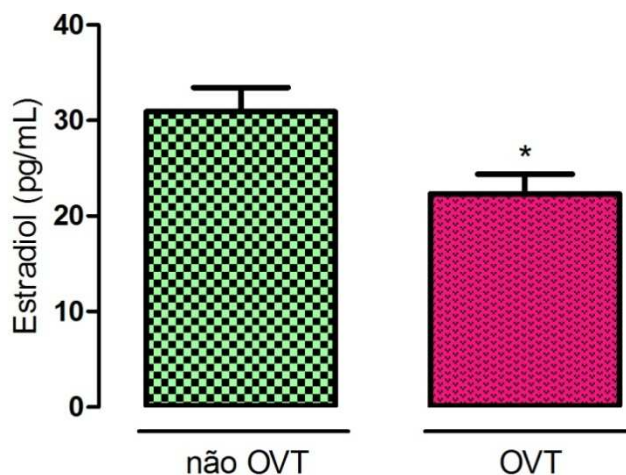


Figura 10. Níveis médios de estradiol (E2) em fêmeas OVT e não OVT. Apesar da grande variabilidade dos níveis desta hormona, observa-se uma diferença significativa entre ambos os grupos ($p=0.01$), com níveis médios de E2 mais baixos em fêmeas OVT. A análise estatística foi processada usando o t-test. * $p<0,05$.

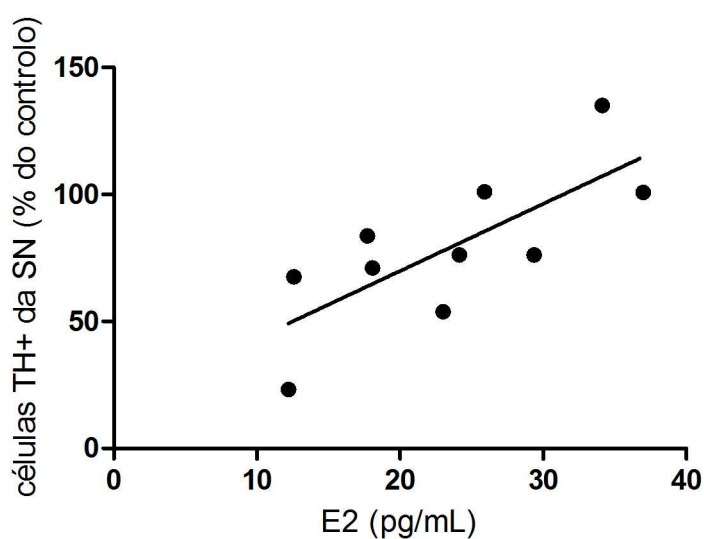


Figura 11. Correlação entre os níveis plasmáticos de Estradiol (E2) e a extensão da lesão na SN. Independentemente da condição em que o animal se situa (OVT ou não, injectado com solução veículo ou 6-OHDA), verifica-se uma correlação entre a percentagem de células TH⁺ na SN e o nível de E2 plasmático ($R^2=0,56$). Os níveis de estradiol foram determinados por método quimioluminescente. Os níveis de células TH⁺ foram determinados por IHQ. A percentagem de células TH⁺ no lado injectado (ipsilateral) foi calculada relativamente ao lado contralateral (controlo) de cada animal, em cada secção. A média das percentagens de células TH⁺ sobreviventes foi calculada para cada animal fazendo a média das secções. A análise estatística foi processada usando o modelo de regressão linear.

3.4 - Correlação entre a extensão da lesão e os níveis de GDNF

Resultados obtidos pelo nosso grupo em machos Wistar expostos a estradiol, mostraram que o 17- β estradiol promovia a expressão de GDNF, sendo essa expressão responsável pela protecção dopaminérgica promovida pela hormona. Tendo em conta estes dados, fomos no presente estudo tentar relacionar os níveis de TH estriatais com os níveis de GDNF, também no estriado.

Os resultados obtidos mostraram uma correlação ($R^2 = 0,81$) entre níveis mais elevados de GDNF e níveis também mais elevados de TH (figura 12).

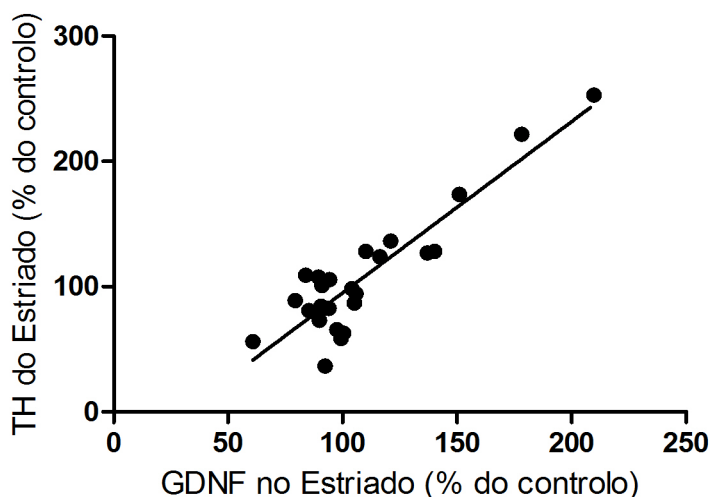


Figura 12. Correlação entre os níveis estriatais de TH e de GDNF. Independentemente da condição em que o animal se situa (OVT ou não, injectado com solução veículo ou 6-OHDA), verifica-se uma correlação entre os níveis da enzima TH e os níveis de GDNF ($R^2 = 0,81$), em que níveis mais altos desta enzima estão associados a níveis elevados de GDNF. Ambos os níveis de GDNF e TH foram medidos por western blot e, para cada grupo, foi calculada a média \pm desvio padrão da percentagem de TH e GDNF, relativamente à média do grupo controlo que, neste caso, é o grupo não OVT, injectado com veículo, contralateral. A análise estatística foi porcessada usando o modelo de regressão linear.



4 – DISCUSSÃO

Este estudo usou como modelo da DP fêmeas Wistar injectadas com 6-OHDA no estriado. A dose injectada, segundo a literatura, produz lesão parcial no estriado, que se propaga retrogradamente para a SN. O grau de lesão foi determinado pela contagem de células TH⁺ na SN, por IHQ, e por quantificação da proteína TH, por WB, na SN e estriado.

4.1 – A injeção com 6-OHDA induziu lesão dopaminérgica na SN e no estriado

A determinação do grau de lesão na SN, por contagem do número de células TH⁺ na SN, revelou que o grupo injectado com 6-OHDA, em relação ao injectado com veículo, apresentou uma menor percentagem de células TH⁺, revelador da ocorrência de lesão. Os dados de WB foram contraditórios, uma vez que o maior número de células TH⁺ nos animais injectados com veículo, relativamente aos injectados com 6-OHDA, observado nas análises de IHQ, não teve paralelo em maiores níveis da TH, analisados por WB. Este facto levanta questões quanto à sensibilidade da quantificação da TH como marcador da sobrevivência dos neurónios dopaminérgicos. Alguns neurónios da SN pars compacta, mesmo quando em apoptose, ainda expressam o seu marcador de fenótipo TH (27). Tendo sido também descritos efeitos de compensação após a lesão nigroestriatal, com aumento da actividade e da expressão da TH nos neurónios dopaminérgicos remanescentes, com consequente aumento dos níveis de DA (2), com sobre-expressão de TH,



enzima que mede a actividade da célula dopaminérgica. Esses aumentos compensatórios são atribuídos, em grande parte, ao aumento de factores neurotróficos despoletado pela lesão (21-23), que conduzem à recuperação da expressão de TH nas células remanescentes. No entanto, os dados existentes sugerem que o grau de protecção exercida pelos factores neurotróficos é dependente da extensão da lesão (28, 29).

No estriado, a toxina exerceu efeitos deletérios nos terminais nervosos, com diminuição acentuada da TH, fundamentada pela grande diferença nos níveis de TH no lado ipsilateral relativamente ao contralateral.

4.2 – Efeito da ovariectomia na lesão induzida por 6-OHDA

Os resultados da IHQ em animais OVT foram inesperados, uma vez que a lesão dopaminérgica foi mais significativa nos animais não OVT que nos animais OVT. Nos animais OVT a injeção com 6-OHDA não induziu diminuições significativas dos marcadores dopaminérgicos (nº de células DA na SN e níveis de TH na SN e no estriado). Estes resultados foram inesperados, uma vez que dados da literatura (1, 3, 9) indicam uma acção neuroprotectora do estrogénio na via nigroestriatal. No entanto, analisando o gráfico da figura 9 levantam-se dúvidas quanto à eficácia da ovariectomia na redução dos níveis plasmáticos de estrogénio, uma vez que animais OVT e animais controlo apresentaram valores próximos de estradiol plasmático; e, apesar de através do gráfico da figura 10 verificarmos que existem diferenças entre as médias de estradiol nos OVT e não OVT, estas diferenças são inferiores às esperadas.

A não observação de maior lesão nos animais OVT, contrariamente ao que era esperado, pode dever-se a um número insuficiente de animais



analisados, associado a alguma variabilidade nos resultados entre os animais de cada grupo, assim como a níveis de lesão relativamente reduzidos e que podem desencadear efeitos protectores compensatórios. Por outro lado é ainda possível que o tempo que decorreu entre a ovariectomia bilateral e a injeção dos animais não tenha sido suficiente para fazer baixar os níveis de estrogénios nos animais operados, hipótese fundamentada pelas reduzidas diferenças nos níveis plasmáticos de estradiol entre animais OVT e controlos. Além disso, a não sincronização dos ciclos reprodutivos das fêmeas também pode ter originado esta variabilidade de valores

Os resultados podem ainda estar associados à protecção exercida pelos níveis de estrogénio encefálico, produzido localmente em resposta a lesão, e cujos níveis podem ser até seis vezes maiores do que os níveis plasmáticos (2).

4.3 – Correlação entre os estrogénios e a extensão da lesão

Apesar de a comparação da lesão com 6-OHDA nos grupos OVT e controlo não ter indicado nenhuma protecção por acção do estradiol endógeno, os resultados apresentados no gráfico da figura 11 indicam que maiores níveis da hormona corresponderam a um maior número de células dopaminérgicas após a lesão. Este resultado está de acordo com a hipótese inicial do trabalho de que níveis mais elevados de estrogénio poderiam estar associados a lesões dopaminérgicas menos extensas.



4.4 – Correlação entre os níveis de TH e de GDNF

Este estudo verificou ainda uma associação entre o factor neurófico GDNF e a perda dopaminérgica, fundamentando dados da literatura que comprovaram o seu efeito protector na via nigroestriatal em resposta a várias lesões dopaminérgicas (21-23) e apoiando anteriores resultados do nosso grupo obtidos com machos Wistar, em que se demonstrou que a exposição a estradiol protege a via nigroestriatal da lesão por 6-OHDA via indução da expressão do GDNF.



CONCLUSÃO

A injeção estriatal de 6-OHDA em fêmeas Wistar adultas promoveu a redução da expressão da enzima TH e do número de células dopaminérgicas, demonstrando que a lesão foi induzida com sucesso embora pouco extensa.

As diferenças nos níveis de estradiol plasmático entre animais OVT e animais controlo foram inferiores às esperadas, provavelmente em resultado da não sincronização do estrogénio entre as fêmeas.

Contrariamente ao que era esperado, a ovariectomia não acentuou a lesão induzida pela 6-OHDA, o que se pode ter devido às pequenas diferenças nos níveis de estradiol observadas entre animais OVT e animais controlo. Apesar disso, este estudo demonstrou uma associação entre os níveis endógenos de estradiol em fêmeas Wistar e a sobrevivência das células dopaminérgicas após exposição à toxina 6-OHDA, em que níveis mais elevados de estradiol corresponderam a uma maior sobrevivência dopaminérgica.

Neste estudo observou-se ainda uma associação entre a expressão do factor neurófico GDNF e a perda dopaminérgica, fundamentando dados da literatura que comprovaram o seu efeito protector na via nigroestriatal em resposta a várias lesões dopaminérgicas.



BIBLIOGRAFIA

1. Bourque M, Dluzen DE, Di Paolo T. Neuroprotective actions of sex steroids in Parkinson's disease. *Front Neuroendocrinol* 2009 Jul;30(2):142-57.
2. Gillies GE, McArthur S. Independent influences of sex steroids of systemic and central origin in a rat model of Parkinson's disease: A contribution to sex-specific neuroprotection by estrogens. *Horm Behav* Jan;57(1):23-34.
3. Gillies GE, Murray HE, Dexter D, McArthur S. Sex dimorphisms in the neuroprotective effects of estrogen in an animal model of Parkinson's disease. *Pharmacol Biochem Behav* 2004 Jul;78(3):513-22.
4. Johnston TH, Brotchie JM. Drugs in development for Parkinson's disease. *Curr Opin Investig Drugs* 2004 Jul;5(7):720-6.
5. Dunnett SB, Bjorklund A. Prospects for new restorative and neuroprotective treatments in Parkinson's disease. *Nature* 1999 Jun 24;399(6738 Suppl):A32-9.
6. Nutt JG, Carter JH, Lea ES, Sexton GJ. Evolution of the response to levodopa during the first 4 years of therapy. *Ann Neurol* 2002 Jun;51(6):686-93.
7. Cantuti-Castelvetri I, Keller-McGandy C, Bouzou B, Asteris G, Clark TW, Frosch MP, et al. Effects of gender on nigral gene expression and parkinson disease. *Neurobiol Dis* 2007 Jun;26(3):606-14.
8. Baldereschi M, Di Carlo A, Rocca WA, Vanni P, Maggi S, Perissinotto E, et al. Parkinson's disease and parkinsonism in a longitudinal study: two-fold higher incidence in men. ILSA Working Group. Italian Longitudinal Study on Aging. *Neurology* 2000 Nov 14;55(9):1358-63.



9. Murray HE, Pillai AV, McArthur SR, Razvi N, Datla KP, Dexter DT, et al. Dose- and sex-dependent effects of the neurotoxin 6-hydroxydopamine on the nigrostriatal dopaminergic pathway of adult rats: differential actions of estrogen in males and females. *Neuroscience*2003;116(1):213-22.
10. Quinn N, Marsden C. Menstrual-related fluctuations in Parkinson's disease. *Mov Disord*1986;1:85-7.
11. Sawada H, Ibi M, Kihara T, Urushitani M, Akaike A, Shimohama S. Estradiol protects mesencephalic dopaminergic neurons from oxidative stress-induced neuronal death. *J Neurosci Res*1998 Dec 1;54(5):707-19.
12. Behl C, Skutella T, Lezoualc'h F, Post A, Widmann M, Newton CJ, et al. Neuroprotection against oxidative stress by estrogens: structure-activity relationship. *Mol Pharmacol*1997 Apr;51(4):535-41.
13. Harms C, Lautenschlager M, Bergk A, Katchanov J, Freyer D, Kapinya K, et al. Differential mechanisms of neuroprotection by 17 beta-estradiol in apoptotic versus necrotic neurodegeneration. *J Neurosci*2001 Apr 15;21(8):2600-9.
14. Sawada H, Ibi M, Kihara T, Urushitani M, Honda K, Nakanishi M, et al. Mechanisms of antiapoptotic effects of estrogens in nigral dopaminergic neurons. *FASEB J*2000 Jun;14(9):1202-14.
15. Sortino MA, Chisari M, Merlo S, Vancheri C, Caruso M, Nicoletti F, et al. Glia mediates the neuroprotective action of estradiol on beta-amyloid-induced neuronal death. *Endocrinology*2004 Nov;145(11):5080-6.
16. Ivanova T, Karolczak M, Beyer C. Estradiol stimulates GDNF expression in developing hypothalamic neurons. *Endocrinology*2002 Aug;143(8):3175-8.



17. Gibbs RB. Treatment with estrogen and progesterone affects relative levels of brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein in different regions of the adult rat brain. *Brain Res*1999 Oct 9;844(1-2):20-7.
18. Lin LF, Doherty DH, Lile JD, Bektesh S, Collins F. GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science*1993 May 21;260(5111):1130-2.
19. Kearns CM, Gash DM. GDNF protects nigral dopamine neurons against 6-hydroxydopamine in vivo. *Brain Res*1995 Feb 20;672(1-2):104-11.
20. Sauer H, Rosenblad C, Bjorklund A. Glial cell line-derived neurotrophic factor but not transforming growth factor beta 3 prevents delayed degeneration of nigral dopaminergic neurons following striatal 6-hydroxydopamine lesion. *Proc Natl Acad Sci U S A*1995 Sep 12;92(19):8935-9.
21. Batchelor PE, Liberatore GT, Wong JY, Porritt MJ, Frerichs F, Donnan GA, et al. Activated macrophages and microglia induce dopaminergic sprouting in the injured striatum and express brain-derived neurotrophic factor and glial cell line-derived neurotrophic factor. *J Neurosci*1999 Mar 1;19(5):1708-16.
22. Liberatore GT, Wong JY, Porritt MJ, Donnan GA, Howells DW. Expression of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) mRNA following mechanical injury to mouse striatum. *Neuroreport*1997 Sep 29;8(14):3097-101.
23. Mertens B, Massie A, Michotte Y, Sarre S. 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*2009 Aug 4;162(1):148-54.



24. Burke RE, Antonelli M, Sulzer D. Glial cell line-derived neurotrophic growth factor inhibits apoptotic death of postnatal substantia nigra dopamine neurons in primary culture. *J Neurochem*1998 Aug;71(2):517-25.
25. Clarkson ED, Zawada WM, Freed CR. GDNF improves survival and reduces apoptosis in human embryonic dopaminergic neurons in vitro. *Cell Tissue Res*1997 Aug;289(2):207-10.
26. Morale MC, Serra PA, L'Episcopo F, Tirolo C, Caniglia S, Testa N, et al. Estrogen, neuroinflammation and neuroprotection in Parkinson's disease: glia dictates resistance versus vulnerability to neurodegeneration. *Neuroscience*2006;138(3):869-78.
27. Jackson-Lewis V, Vila M, Djaldetti R, Guegan C, Liberatore G, Liu J, et al. Developmental cell death in dopaminergic neurons of the substantia nigra of mice. *J Comp Neurol*2000 Aug 28;424(3):476-88.
28. Brizard M, Carcenac C, Bemelmans AP, Feuerstein C, Mallet J, Savasta M. Functional reinnervation from remaining DA terminals induced by GDNF lentivirus in a rat model of early Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*2006 Jan;21(1):90-101.
29. Stanic D, Tripanichkul W, Drago J, Finkelstein DI, Horne MK. Glial responses associated with dopaminergic striatal reinnervation following lesions of the rat substantia nigra. *Brain Res*2004 Oct 8;1023(1):83-91.