

**Universidade de Lisboa
Faculdade de Ciências**

Departamento de Química e Bioquímica



**Influência dos receptores A_{2A} da
adenosina no efeito neuroprotector
do BDNF na morte neuronal induzida**

André Jerónimo Santos

Mestrado em Bioquímica

Especialização em Bioquímica Médica

Dissertação orientada pela Doutora Maria José Diógenes e
pelo Doutor Pedro Lima

2009

O trabalho experimental descrito nesta tese foi realizado no Instituto de Farmacologia e Neurociências da Faculdade de Medicina de Lisboa e Unidade de Neurociências do Instituto de Medicina Molecular, sob orientação da Doutora Maria José de Oliveira Diógenes e do Doutor Pedro Lima.

Índice:

Agradecimentos	vi
Lista de abreviaturas	viii
Resumo	x
Abstract	xii
Índice de Figuras	xiv
1. Introdução Teórica	1
1.1. Neurotrofinas	1
1.1.1. Síntese das Neurotrofinas	2
1.1.2. Receptores das Neurotrofinas	3
1.1.2.1. Receptores Trk	4
1.1.2.2. Receptores Trk - isoformas truncadas	5
1.1.2.3. Receptor p75NTR	6
1.2. Doença de Alzheimer	8
1.2.1. Neurotoxicidade mediada pelo péptido β -amilóide.	9
1.2.2. Neurotrofinas como terapêutica para Doença de Alzheimer.	9
1.3. Adenosina.....	12
1.3.1. Receptores da Adenosina.....	12
1.3.2. Interação entre a adenosina e neurotrofinas.....	13
2. Objectivos	15
3. Métodos	17
3.1. Reagentes, Fármacos e Anticorpos	17
3.1.1. Reagentes.....	17
3.1.2. Fármacos	17
3.1.3. Anticorpos	18
3.2. Culturas Primárias de Neurónios	18
3.3. Administração de fármacos.....	19
3.4. Preparação dos extractos proteicos.....	19
3.5. Quantificação de proteína.....	19
3.6. Preparação do péptido $A\beta_{25-35}$	20
3.7. <i>Western-blotting</i>	20
3.8. Detecção da apoptose.....	21
3.8.1. Análise morfológica.....	21
3.8.2. Formação da Caspase-3	21

3.8.3. Ensaio de actividade enzimática da Caspase-3	22
3.9 Imunocitoquímica	23
3.10 Análise de dados	23
4. Resultados e Discussão	25
4.1. Apoptose induzida pelo péptido A β ₂₅₋₃₅	25
4.1.1. Influência do suplemento B-27.	27
4.1.2. Papel da fosforilação de resíduos de tirosina.	29
4.1.3. Influência da síntese proteica.	31
4.1.4. Discussão:.....	32
4.2. Influência do BDNF na apoptose induzida pelo péptido A β ₂₅₋₃₅	36
4.2.1. Efeito protector do BDNF em culturas com 4 DIV.....	38
4.2.2. Efeito protector do BDNF em culturas com 10 DIV.....	40
4.2.3. Discussão:.....	42
4.3. Influência dos receptores A _{2A} da adenosina no efeito neuroprotector do BDNF.....	44
4.3.1. Papel de A _{2A} R na protecção do BDNF em culturas com 4DIV	44
4.3.2. Papel do receptor A _{2A} na protecção do BDNF em culturas com 10DIV	48
4.3.3 Discussão:.....	51
4.4. Alterações das densidades do receptor TrkB induzidas pelo péptido A β ₂₅₋₃₅	54
4.4.1. O péptido A β ₂₅₋₃₅ diminui a densidade do receptor TrkB-FL e aumenta a densidade do TrkB-Tc.....	54
4.4.2. O aumento na densidade do TrkB-Tc induzido pelo péptido A β é dependente da síntese proteica.	56
4.4.2. O aumento na densidade do TrkB-Tc induzido pelo péptido A β é bloqueado pelo BDNF	57
4.4.3. Discussão:.....	59
5. Conclusões	63
6. Perspectivas Futuras	65
7. Bibliografia	67
8. Anexos	73
8.1. Caracterização das culturas primárias de neurónios.	73

Agradecimentos

Em primeiro lugar gostaria de agradecer aos meus orientadores, Doutora Maria José Diógenes e Doutor Pedro Lima. À Doutora Maria José Diógenes por todos os valiosos ensinamentos e sugestões que me deu, pela sua enorme simpatia e boa disposição constante e também pela amizade e motivação que me transmitiu. Ao Doutor Pedro Lima pelas sugestões, disponibilidade e simpatia.

Gostaria também de mostrar o meu agradecimento à Professora Ana Sebastião e ao Professor Joaquim Alexandre Ribeiro pela receptividade e partilha de conhecimentos e pelas sugestões e discussão científica que me foram bastante úteis.

A todos os colegas do laboratório que me acolheram com afecto e amizade e que me transmitiram os seus conhecimentos e opiniões no decorrer do trabalho. Gostaria ainda de agradecer à Elvira, ao Sr. João, à Cristina e à Alexandra pelo apoio técnico e administrativo.

Uma palavra especial de agradecimento à Rita por toda a sua paciência, conselhos, carinho e apoio dado.

I also would like to thank Professor Lori and Kelsey for the sharing of knowledge in Flow Cytometry on neuronal cultures, and for good humour and friendship.

E finalmente, à minha família, em especial aos meus pais, pelo apoio incondicional e incentivo dado, nos bons e maus momentos.

Um agradecimento ao Instituto de Medicina Molecular pelo bom acolhimento e pela bolsa de investigação que me foi concebida (Ref.^a IMM/BI/27-2009) no âmbito do projecto “Receptores de membrana e mediadores envolvidos nas alterações plásticas induzidas por agressões neuronais: implicações para a neuroprotecção” (PTDC/SAU-FCF/68607/2006), financiado pela FCT.

Lista de abreviaturas

5-FU – *5-fluoracil* (5-fluoracilo)

A β – *amyloid-beta* (beta-Amilóide)

A_{2A}R – *adenosine A2 receptor* (receptor A2 da adenosina)

AD – *Alzheimer's disease* (doença de Alzheimer)

ADDLs – *A β -derived diffusible ligands* (ligandos solúveis derivados do A β)

ANOVA – *analysis of variance* (análise da variância)

APP – *amyloid precursor protein* (proteína precursora amilóide)

BAD – *Bcl2-associated death promoter* (promotor de morte associado a Bcl2)

BDNF – *brain-derived neurotrophic factor* (factor neurotrófico derivado do cérebro)

BrdU – *bromodeoxyuridine* (bromodeoxiuridina)

CamK – *Ca²⁺-calmodulin-regulated kinase* (cinases reguladas pela calmodulina/Ca²⁺)

cAMP – *cyclic adenosine monophosphate* (adenosina monofosfato ciclico)

CGS-21680 – *4-[2-[[6-Amino-9-(N-ethyl- β -D-ribofuranuroanamidosyl)-9H-purin-2yl]amino] - ethyl]benzenepropanoic acid*

CHX – *cycloheximide* (cicloheximida)

CREB – *cAMP response element binding protein* (proteína de ligação ao elemento de resposta do cAMP)

DAG – *diacylglycerol* (diacilglicerol)

DAPI – *4',6-diamidino-2-phenylindole* (4,6-diamidina-2-fenilindole)

DEVD-pNA – N-acetil-Asp-Glu-Val-Asp-p-nitroanilina

DIV – *days in-vitro* (dias em cultura)

DMSO – *dimethylsulphoxide* (Dimetilsulfóxido)

DTT – *1,4-dithiothreitol* (1,4 – Ditiotreitól)

EC – *enzyme classification* (classificação do enzima)

EDTA – *ethylenediaminetetraacetic acid* (ácido etilendiaminotetracético)

ER – *endoplasmatic reticulum* (retículo endoplasmático)

FasL – *Fas ligand* (ligando de Fas)

FBS – *fetal bovine serum* (soro fetal bovino)

Gab1/2 – *Grb-associated binding protein* (proteína de ligação associada a Grb)

GFAP – *glial fibrillary acidic protein* (proteína fibrilar ácida da glia)

Grb2 – *growth factor receptor-bound protein 2* (proteína de ligação a receptores de factores de crescimento)

HBSS – *Hank's balanced salt solution* (Solução salina e balanceada de Hank)

HRP – *horseradish peroxidase* (peroxidase de rábano)

IP₃ – *inositol 1,4,5 triphosphate* (1,4,5 trifosfato de inositol)

JNK – *c-jun N-terminal kinases* (cinases da região N-terminal de c-jun)

LTP – *long-term potentiation* (potenciação de longo termo)

MAP2 – *microtubule-associated protein 2* (proteína-2 associada ao microtubulo)

MAPK – *mitogen-activated protein kinase* (cinase de proteínas activada por mitogénios)

mRNA – *messenger ribonucleic acid* (ácido ribonucleico mensageiro)

NF-κB – *nuclear factor κB* (factor nuclear κB)

NGF – *nerve growth factor* (factor de crescimento do nervo)

NT – *neurotrophin* (neurotrofina)

p75NTR – *p75 Neurotrophin Receptor* (receptor p75 das neurotrofinas)

PBS – *phosphate buffered saline* (tampão salino de fosfatos)

PI3K – *phosphotylinositol-3-kinase* (Fosfotidilinositol-3 cinase)

PIP₂ – *phosphatidylinositol-4,5-bifosphate* (Fosfotidilinositol-4,5-bifosfato)

PKC – *protein kinase C* (cinase C de proteínas)

PLC – *phospholipase C* (fosfolipase C)

pNA – *p-nitroanilide* (p-nitroanilida)

SCH-58261 – *7-(2-phenylethyl)-5-amino-2-(2-furyl)-pyrazolo-[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c] pyrimidine*

SDS - PAGE – *sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide-gel electrophoresis* (electroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio)

TBS – *Tris-buffered saline* (tampão salino de Tris)

TGN – *trans-golgi network* (rede trans-Golgi)

TNF-α – *tumor necrosis factor-alpha* (factor de necrose tumoral-alfa)

Tris – *tris-hydroxymethyl-aminomethane* (tris-hidroximetil-aminometano)

Trk – *tropomyosin-related kinase* (cinase relacionada com a tropomiosina)

TrkB-Tc – *TrkB truncated* (isoforma truncada de TrkB)

TrkB-FL – *TrkB full-length* (isoforma completa de TrkB)

TUNEL – *TdT-mediated dUTP nick end labelling*

Resumo

O factor neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) é uma neurotrofina que promove sobrevivência neuronal através da activação do seu receptor TrkB.

Na doença de Alzheimer ocorre deposição do péptido A β (*amyloid-beta*) e conseqüente morte neuronal. Dado que os níveis de BDNF se encontram diminuídos nesta doença, a administração directa desta neurotrofina ao cérebro tem sido sugerida como terapêutica. Contudo esta abordagem revelou-se difícil de implementar pelo que são necessárias alternativas, como por exemplo, o uso de pequenas moléculas que potenciem os efeitos do BDNF endógeno no cérebro. É sabido que o receptor A_{2A} da adenosina pode trans-activar os receptores TrkB na ausência de BDNF. Do ponto de vista funcional, sabe-se que os efeitos desta neurotrofina na transmissão sináptica e plasticidade sináptica são dependentes da activação do receptor A_{2A}.

Assim, na presente dissertação, pretendeu-se avaliar a influência dos receptores A_{2A} no efeito neuroprotector do BDNF na morte neuronal induzida pelo péptido A β , e também, analisar o efeito deste péptido nos níveis dos receptores TrkB.

Os resultados mostram que o BDNF diminui a morte neuronal por apoptose induzida pelo péptido A β , e que essa protecção é superior em culturas primárias de neurónios com 10 DIV (*days in-vitro*) do que com 4 DIV.

Por outro lado, a activação do receptor A_{2A} da adenosina, em culturas com 4 DIV, bloqueou o efeito protector do BDNF. Contudo, em culturas com 10 DIV, o efeito protector do BDNF não é influenciado pela activação do receptor A_{2A}. Em ambas as culturas (4 e 10 DIV) a activação do receptor A_{2A}, por si só, não altera os níveis de apoptose induzida pelo A β .

Durante a presente dissertação também se observou que o péptido A β provoca uma diminuição na isoforma completa do receptor TrkB concomitante com um aumento na isoforma truncada do receptor. Este aumento na isoforma truncada é dependente da síntese proteica e é prevenido pela administração exógena de BDNF.

Em conclusão, os resultados sugerem que o péptido A β poderá reduzir a neuroprotecção endógena exercida pelo BDNF devido às alterações nas isoformas do receptor TrkB, e que a activação dos receptores A_{2A} de adenosina pode diminuir o efeito protector do BDNF na apoptose induzida pelo péptido A β .

Palavras-Chave: Adenosina, Apoptose, BDNF, culturas de neurónios, neuroprotecção, péptido β -amilóide, receptor A_{2A}, receptor TrkB.

Abstract

Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is a neurotrophin which promotes neuronal survival through activation of TrkB receptor.

In Alzheimer's disease (AD), the deposition of amyloid-beta peptide ($A\beta$) contributes to neuronal death. Since the levels of BDNF are reduced in this disorder, direct administration of this neurotrophin into the brain was considered a promising therapeutic approach. It is, however, not simple and therefore, new approaches, like the use of small molecules which can potentiate the endogenous BDNF effects in the brain, were proposed. It is known that adenosine A_{2A} receptors can trans-activate TrkB receptors even in the absence of BDNF. In a functional point of view, the effects of BDNF in synaptic plasticity and transmission are dependent of A_{2A} receptors activation.

The objective in this work was to evaluate the influence of A_{2A} receptors upon BDNF neuroprotective effect against neuronal death induced by $A\beta$ peptide, and also, to analyse the effect of this peptide in the levels of TrkB receptor.

The results obtained show that BDNF reduces neuronal apoptotic death induced by $A\beta$, and that this neuroprotection is more pronounced in 10 days *in-vitro* primary neuronal cultures (10DIV) than in 4 DIV cultures.

On the other hand, in 4 DIV cells, A_{2A} receptors activation blocked the protective effect of BDNF. However, in 10 DIV cultures, A_{2A} receptors activation did not influence the BDNF-induced neuroprotection. In both cultures (4 and 10 DIV), the activation of A_{2A} receptors did not changed the apoptosis levels induced by $A\beta$ peptide.

In the present work it was also observed that $A\beta$ peptide administration produced a decrease in the full length isoform of TrkB receptor concomitantly with an increase in the truncated isoform of TrkB receptor. This increase in truncated receptor is dependent on protein synthesis and was prevented if BDNF was added to the cultures.

In conclusion, these results suggest that $A\beta$ peptide can reduce neuroprotection caused by endogenous BDNF because it induces TrkB isoform changes, and that the BDNF-induced protection against neuronal death can be diminished by activation of adenosine A_{2A} receptor.

Key words: Adenosine, Apoptosis, BDNF, neuronal cultures, neuroprotection, amyloid- β peptide, A_{2A} receptor, TrkB receptor.

Índice de Figuras

Figura 1	O percurso do BDNF desde a síntese à secreção.	2
Figura 2	Receptores das neurotrofinas.	3
Figura 3	Vias de sinalização mediadas pelo receptor TrkB.	6
Figura 4	Vias de sinalização mediadas pela activação do receptor p75NTR.	7
Figura 5	Diagrama da APP e seus principais derivados metabólicos.	8
Figura 6	Formação de A β fibrilhar e potenciais mecanismos de neurotoxicidade.	10
Figura 7	Administração directa do NGF no cérebro.	11
Figura 8	Estrutura química da adenosina.	12
Figura 9	Transactivação dos receptores Trk pelo receptor A _{2A} da adenosina.	14
Figura 10	Porcentagem de núcleos apoptóticos induzidos pelo péptido A β .	25
Figura 11	Activação da Caspase-3 induzida pelo péptido A β .	26
Figura 12	Efeito do B-27 na apoptose induzida pelo péptido A β (25 μ M)	28
Figura 13	Efeito do fármaco K252a na apoptose induzida pelo péptido A β .	30
Figura 14	Efeito da cicloheximida (CHX) na apoptose induzida pelo péptido A β .	31
Figura 15	Esquema de um possível mecanismo para a apoptose induzida pelo péptido A β	35
Figura 16	Diagrama exemplificativo do plano de incubações.	36
Figura 17	Efeito do BDNF em diferentes tempos de incubação na apoptose induzida pelo A β .	37
Figura 18	Efeito do BDNF na apoptose induzida pelo péptido A β em culturas 4DIV.	39
Figura 19	Níveis do receptor TrkB-FL para culturas com 4DIV e 10DIV.	40
Figura 20	Efeito do BDNF na apoptose induzida pelo péptido A β em culturas 10DIV.	41
Figura 21	Análise dos fármacos utilizados na indução de apoptose.	45
Figura 22	Influência da activação do receptor A _{2A} no efeito protector do BDNF em culturas 4DIV.	46
Figura 23	Influência do bloqueio do receptor A _{2A} no efeito protector do BDNF em culturas 4DIV.	47
Figura 24	Efeito do bloqueio do receptor A _{2A} com uso ao novo antagonista SCH442,416.	47
Figura 25	Activação do receptor A _{2A} não altera efeito protector do BDNF em culturas 10DIV.	49
Figura 26	Bloqueio do receptor A _{2A} não influencia o efeito protector do BDNF em culturas 10DIV	50
Figura 27	Densidades do receptor TrkB na presença do péptido A β 25-35 em culturas 4DIV.	55
Figura 28	Efeito na inibição da síntese proteica no aumento no TrkB-Tc induzido pelo péptido A β	56
Figura 29	Efeito do BDNF no aumento do TrkB-Tc induzido pelo péptido A β	57
Figura 30	Representação esquemática de um futuro projecto de investigação.	66
Figura 31	Caracterização das culturas de neurónio com 4 DIV.	74
Figura 32	Caracterização das culturas de neurónio com 10 DIV.	74

1. Introdução Teórica

1.1. Neurotrofinas

As neurotrofinas são factores de crescimento envolvidos em diversas funções no sistema nervoso. A história das neurotrofinas começou em 1949 quando Rita Levi-Montalcini, após transplantar um fragmento de um tumor maligno de ratinho em embriões de galinha, observou que o tecido cancerígeno estimulava o crescimento e a diferenciação de neurónios em desenvolvimento. A hipótese colocada foi a de que o tumor libertava um factor solúvel capaz de estimular o crescimento neuronal. Mais tarde, com a colaboração de Stanley Cohen, isolou e purificou o factor solúvel em questão, o NGF (*nerve growth factor*) (Levi-Montalcini e Cohen, 1956). Esta importante descoberta foi premiada anos mais tarde com o prémio Nobel da medicina e fisiologia em 1986.

Posteriormente, foram identificadas outras neurotrofinas em mamíferos, como o BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) (Barde *et al.*, 1982), a NT-3 (*neurotrophin-3*) (Hohn *et al.*, 1990) e a NT-4 (*neurotrophin-4*) (Hallböök *et al.*, 1991).

Durante muito tempo as neurotrofinas foram consideradas apenas como factores de crescimento específicos para neurónios mas, na verdade, estas moléculas têm um papel de destaque no sistema nervoso, na medida em que são mediadoras de diversas funções incluindo a regulação do crescimento axonal, modulação da actividade sináptica, diferenciação, mielinização, promoção de sobrevivência e regulação de morte neuronal (revisto em Arévalo e Wu, 2006).

Para além da importância na manutenção da homeostasia do sistema nervoso central, alterações na sinalização mediada pelas neurotrofinas estão muitas vezes presentes em patologias neurodegenerativas, como na doença de Parkinson e de Alzheimer, e também em alguns cancros do sistema nervoso central (revisto em Roux e Barker, 2002). Assim, o conhecimento dos mecanismos celulares e moleculares desencadeados pelas neurotrofinas, bem como as alterações das mesmas em situações de patologias, é fundamental para o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos.

1.1.1. Síntese das Neurotrofinas

Todas as neurotrofinas são sintetizadas primeiramente na forma de pré-pró-neurotrofinas. O mRNA (*messenger ribonucleic acid*) das neurotrofinas direcciona a síntese da proteína nascente para o retículo endoplasmático, através da sequência sinal, para que esta siga a via secretora. A sequência sinal é clivada no retículo endoplasmático dando origem às pró-neurotrofinas, que espontaneamente formam dímeros através de ligações não covalentes. Estes dímeros na forma de pró-neurotrofinas podem ser clivados intracelularmente (antes de serem secretados) ou extracelularmente (depois de terem sido secretados) ou podem mesmo nunca virem a ser clivados (revisto em Lessmann *et al.*, 2003). A clivagem das pró-neurotrofinas origina neurotrofinas designadas de maduras. Tanto as pró-neurotrofinas como as formas maduras das neurotrofinas actuam como moléculas sinalizadoras, contudo, com propriedades de sinalização distintas (Lee *et al.*, 2001).

A secreção de BDNF e das restantes neurotrofinas pode ocorrer de duas formas: 1) via constitutiva, no qual as vesículas contendo as neurotrofinas fundem-se espontaneamente com a membrana plasmática libertando assim o seu conteúdo ou 2) via regulada, onde as neurotrofinas são libertadas em resposta a determinados estímulos, como pelo aumento prolongado dos níveis intracelulares de cálcio ou pela actividade eléctrica neuronal (Figura 1) (Lessman *et al.*, 2003).

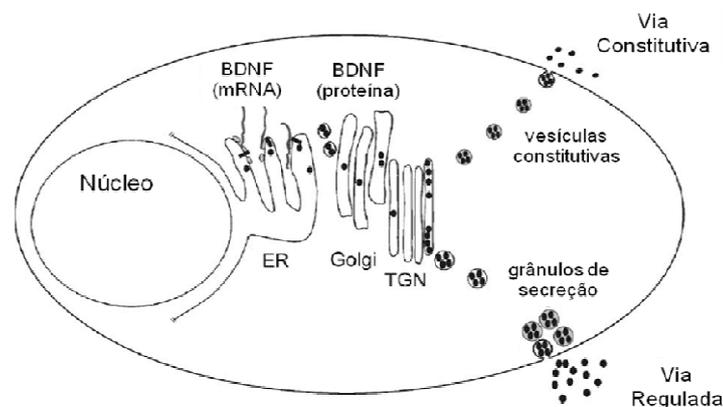


Figura 1 – O percurso do BDNF desde a síntese à secreção. O mRNA do BDNF é traduzido pelos ribossomos directamente para o ER (*endoplasmatic reticulum*). A proteína nascente pré-pró-BDNF é sequestrada no ER e a sequência sinal é clivada dando origem ao pró-BDNF. Através do transporte mediado por vesículas, o pró-BDNF segue para o complexo de Golgi e para o TGN (*trans-Golgi network*). Nestas estruturas, as convertases residentes clivam o pró-BDNF e originam a forma madura de BDNF. Neste ponto o BDNF pode ser libertado para o exterior da célula pelas vesículas constitutivas ou alternativamente, pode ser armazenado em grânulos de secreção junto à membrana plasmática que serão libertados de forma regulada e dependente do ião cálcio intracelular (Ca^{2+}) (adaptado de Lessmann *et al.*, 2003).

1.1.2. Receptores das Neurotrofinas

As funções das neurotrofinas resultam da activação de distintos receptores de membrana: o receptor p75^{NTR} (*p75 neurotrophin receptor*) e os receptores com actividade de cinase de tirosina da família Trk (*tropomyosin-related kinases*). Dentro dos receptores Trk, incluem-se os receptores TrkA, TrkB e TrkC. Ao contrário do receptor p75^{NTR} ao qual se ligam todas as neurotrofinas com baixa afinidade, os receptores da família Trk têm maior afinidade e são selectivos para as diferentes neurotrofinas, sendo o TrkA o receptor de alta afinidade para o NGF, o TrkB para o BDNF e NT-4 e o TrkC para a NT-3 (Figura 2) (Klein *et al.*, 1990; Soppet *et al.*, 1991; Lamballe *et al.*, 1991).

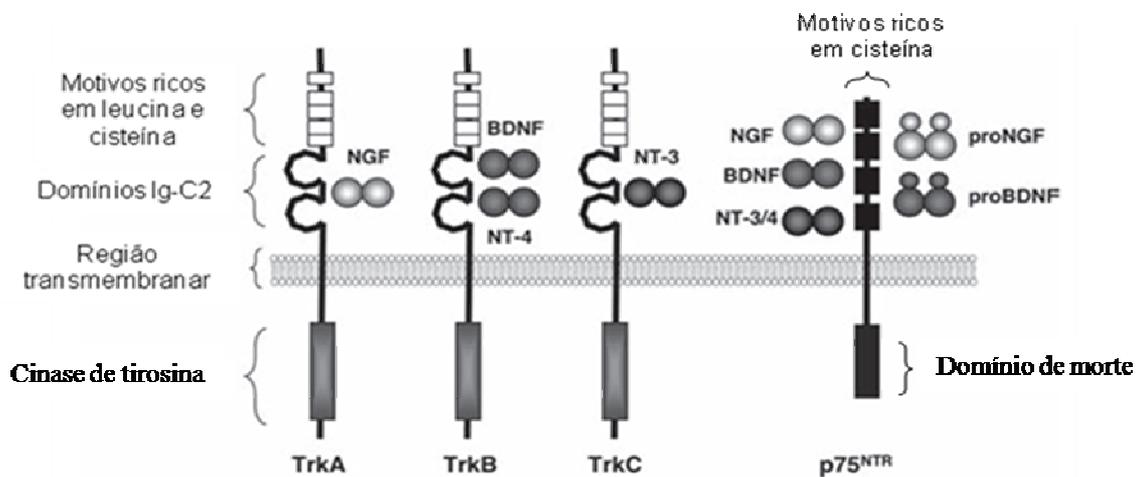


Figura 2 – Receptores das neurotrofinas. Receptores Trk e p75^{NTR}. As neurotrofinas são dímeros com igual afinidade de ligação para o receptor p75^{NTR} e com alta afinidade para o receptor Trk específico. As neurotrofinas são sintetizadas inicialmente na forma de pró-proteínas, as quais se ligam exclusivamente ao receptor p75^{NTR}. Os receptores Trk são receptores cinase de tirosina que após a ligação da neurotrofina dimerizam e ficam activos. O receptor p75^{NTR} pertence à super-família do TNF- α (*tumor necrosis factor-alpha*) e possui um domínio de morte na sua região intracelular (adaptado de Arévalo e Wu, 2006).

1.1.2.1. Receptores Trk

Os receptores Trk constituem uma família de receptores de cinase de tirosina, e foram inicialmente identificados devido às suas propriedades oncogénicas. O primeiro receptor desta família a ser descoberto foi o TrkA cujo ligando se identificou como sendo o NGF (Klein *et al.*, 1990). Por razões de homologia, mais tarde identificaram-se mais dois receptores desta família, o TrkB e o TrkC, tendo o TrkB afinidade para o BDNF e para a NT-4 e o TrkC para a NT-3 (Soppet *et al.*, 1991; Lamballe *et al.*, 1991).

Os receptores Trk são activados apenas pelas neurotrofinas maduras e não pelas pró-neurotrofinas (Lee *et al.*, 2001). Após a ligação das neurotrofinas aos receptores Trk específicos, ocorre uma dimerização no receptor e há auto-fosforilação em determinados resíduos de tirosina no domínio intracelular do mesmo. Esses resíduos de fosfo-tirosina induzem o recrutamento de diversas proteínas adaptadoras e de enzimas formando-se grandes complexos proteicos que activam várias vias de sinalização intracelulares. Apesar de serem eventos comuns a vários receptores tirosina cinase, a combinação única de proteínas adaptadoras, de enzimas activados e da própria regulação do tráfego do receptor Trk, resulta em respostas específicas para as neurotrofinas. Como referido, após a activação e fosforilação dos receptores Trk ocorre a activação de diversas cascatas de sinalização em poucos minutos, como: 1) via PI3K/Akt; 2) via Ras/MAPK e 3) via PLC γ (Figura 3) (revisto em: Segal e Greenberg, 1996; Arévalo e Wu, 2006; Blum e Konnerth, 2005).

Via PI3K/Akt:

A via de sinalização PI3K-Akt é crucial para a promoção de sobrevivência em várias populações neuronais (Crowder *et al.*, 1998). Quando activos, os receptores Trk, recrutam diversas proteínas adaptadoras, sendo a Shc (*Src homology 2 domain containing*) uma das principais, à qual se associa a Grb2 (*Growth factor receptor-bound protein 2*) e a Gab1/2 (*Grb-associated binding protein*), culminando com a activação da PI3K e conseqüentemente da Akt (Figura 3). Na forma activa, a cinase Akt fosforila e controla diversas proteínas importantes na modulação da sobrevivência celular.

Dos vários substratos da Akt, destaca-se o promotor de morte BAD (*Bcl2-associated death promoter*) pertencente à família de proteínas pró-apoptóticas Bcl2 (*B-cell lymphoma 2*). Ao inibir o BAD através de fosforilação, a Akt desempenha um papel anti-apoptótico (Datta *et al.*, 1997). Akt também promove sobrevivência através da inactivação do factor de transcrição FKHRL1 (*Forkhead 1*) que é responsável pelo controlo da expressão de genes que promovem a apoptose, como o caso do FasL (*Fas ligand*) (Brunet *et al.* 1999).

Finalmente, a proteína Akt também pode suprimir a activação da cascata de sinalização JNK (*c-Jun N-terminal Kinase*), uma via com especial relevância na indução da apoptose neuronal (Kim *et al.*, 2001).

Via Ras/MAPK:

Através dos receptores Trk, as neurotrofinas activam a GTPase Ras levando à activação da cascata de cinases MAPK (*mitogen-activated protein kinases*). A fosforilação das MAPK resulta na activação de várias proteínas mediadoras e de factores de transcrição, como o CREB (*cAMP response element binding*). Este factor controla e regula a transcrição de diversos genes envolvidos na promoção da sobrevivência, crescimento axonal e diferenciação neuronal (Finkbeiner *et al.*, 1997; Lonze *et al.*, 2002).

Deste modo a via Ras/MAPK, controla uma grande diversidade de funções tais como proliferação, diferenciação e crescimento celular, bem como promoção de sobrevivência (Grewal *et al.*, 1999). Relativamente à sobrevivência neuronal, a via MAPK aparenta ser importante na protecção das células contra a apoptose induzida por determinados insultos tóxicos (Anderson *et al.*, 1999).

Via PLCγ:

Para além das vias MAPK e PI3K-Akt, os receptores Trk activam a PLCγ (*phospholipase C gamma*) que hidrolisa PIP₂ (*phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*) e origina IP₃ (*inositol 1,4,5-triphosphate*) e DAG (*diacylglycerol*). O IP₃ promove a libertação de Ca²⁺ de compartimentos intracelulares resultando na activação de CamK (*Ca²⁺-calmodulin-regulated kinases*) e de isoformas da PKC (*protein kinase C*) reguladas por Ca²⁺. O DAG por sua vez pode activar as isoformas da PKC reguladas pelo próprio DAG (revisto em Segal e Greenberg, 1996).

Esta via de sinalização tem sido implicada nos efeitos mediados pelo BDNF tanto na plasticidade sináptica como na transmissão sináptica, no hipocampo.

1.1.2.2. Receptores Trk - isoformas truncadas

Alguns receptores Trk, como o TrkB, através de um mecanismo de *splicing* alternativo podem apresentar isoformas truncadas, isto é, isoformas onde o domínio intracelular de cinase de tirosina não está presente. Sem este domínio, os receptores truncados não activam as vias de sinalização clássicas das neurotrofinas (Middlemas *et al.*, 1991). Contudo, há evidências de que as isoformas truncadas também promovem sinalização celular. Nomeadamente, em astrócitos em cultura, está descrito que o BDNF através do TrkB-T1 (isoforma truncada do receptor TrkB) activa proteínas G que por sua vez estimulam a cinase PLC, culminando, assim, num aumento nos níveis de cálcio intracelular (Rose *et al.*, 2003).

Por outro lado, o aumento da expressão das isoformas truncadas do TrkB contribui para a diminuição da sobrevivência celular promovida pelo BDNF (Ninkina *et al.*, 1996; Dorsey *et al.*, 2006). Esta observação poderá ser explicada pelo facto de que as isoformas truncadas do TrkB podem sequestrar o BDNF libertado (Beck *et al.*, 1993) e actuar como inibidores dominantes das isoformas completas (Eide *et al.*, 1996).

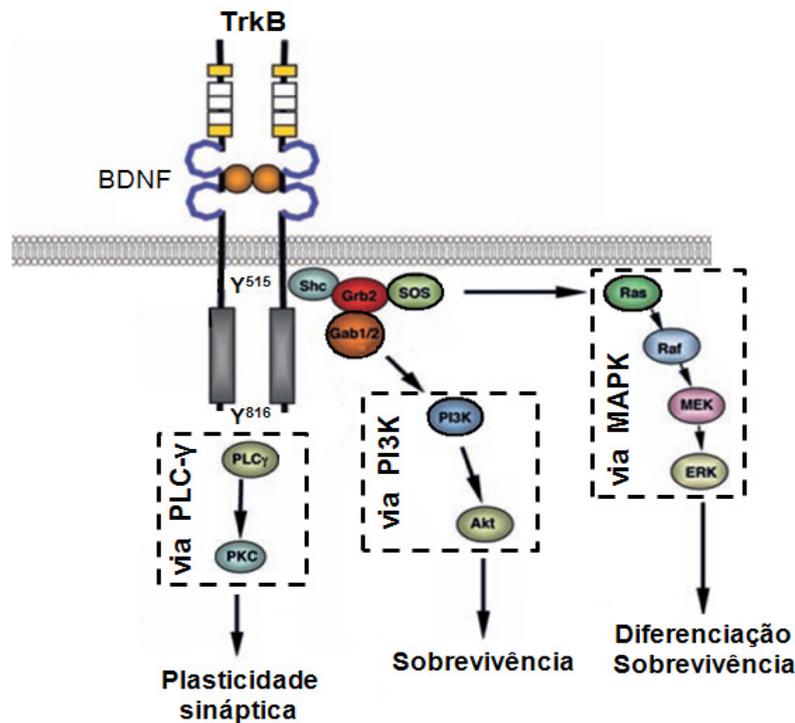


Figura 3 – Vias de sinalização mediadas pelo receptor TrkB. A ligação do BDNF ao receptor TrkB leva à sua ativação e ao recrutamento de diversas proteínas que se associam a determinados resíduos de tirosina (Y) fosforilados, no domínio intracelular do receptor. A fosforilação na tirosina Y⁵¹⁵ dos receptores TrkB cria um local de ligação para a proteína adaptadora Shc (*Src homology 2 domain containing*), formando-se assim um complexo de várias proteínas (Shc/Grb2/SOS) que vai activar a via Ras/MAPK e a via PI3K/Akt. Por outro lado, a fosforilação em Y816 cria outro local de adaptação que vai activar a PLC- γ . Como resultado da activação das várias vias ocorre, modulação na expressão de genes, promoção de sobrevivência, diferenciação celular, crescimento de neurites e alterações na plasticidade sináptica (adaptado de Arévalo e Wu, 2006; Blum e Konnerth, 2005).

1.1.2.3. Receptor p75NTR

Enquanto os receptores Trk são responsáveis pela maioria dos efeitos clássicos de sobrevivência e de crescimento que são atribuídos às neurotrofinas, as acções do p75NTR não estão ainda bem clarificadas. Contudo, os dados apontam para que o p75NTR possa: 1) Activar autonomamente diversas vias de transdução de sinal, levando na maioria dos casos à indução de apoptose ou, em algumas circunstâncias, à promoção de sobrevivência; 2) Actuar como um co-receptor dos receptores Trk (através de associação física) podendo, deste modo, facilitar ou suprimir os efeitos das neurotrofinas mediados pelos Trk (revisto em: Huang e Reihardt, 2003;

Roux e Barker, 2002). Os efeitos paradoxais do p75NTR não se encontram totalmente esclarecidos e podem ainda estar relacionados com a capacidade que o p75NTR tem de se associar a outros diferentes receptores (Wang *et al.*, 2002).

Uma vez que as neurotrofinas activam quer os receptores Trk quer o p75NTR, existe uma competição entre sinais de sobrevivência e de morte, na qual, a sinalização do Trk é capaz de silenciar os sinais de morte iniciados pelo p75NTR. Por exemplo, em oligodendrócitos maduros a ligação do NGF ao p75NTR activa a via JNK levando à morte celular por apoptose, efeito este que é contrariado pela presença do receptor TrkA (Yoon *et al.*, 1998).

Está ainda documentado que, para além das neurotrofinas, os péptidos beta-amilóides (A β), que se acumulam no cérebro na doença de Alzheimer (AD), têm afinidade na ordem do nanomolar, para o receptor p75NTR (Yaar *et al.*, 1997). Esta descoberta levantou a hipótese de que o p75NTR possa ser um dos responsáveis pela neurotoxicidade dos péptidos A β (Figura 4) (revisto em Coulson, 2006).

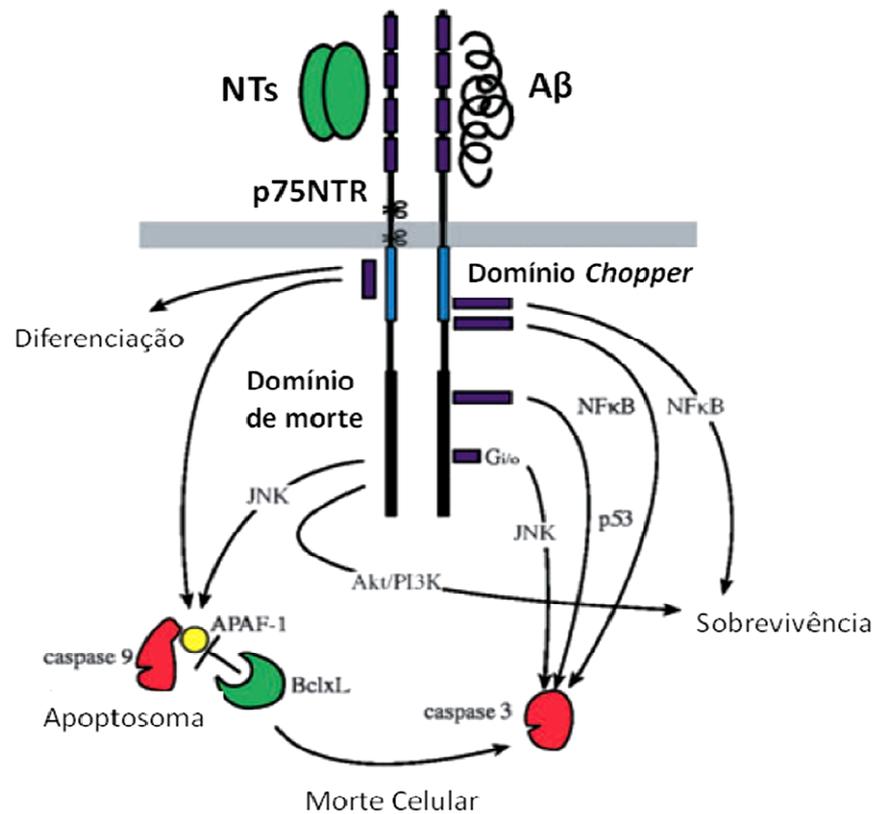


Figura 4 – Vias de sinalização mediadas pela activação do receptor p75NTR.

Após ligação de NTs (neurotrofinas), o receptor p75NTR promove morte celular através da activação da via JNK pelo domínio de morte e pela activação de NF- κ B (*Nuclear Factor κ B*) pelo domínio *Chopper*. Em algumas circunstâncias a ligação das neurotrofinas ao p75NTR pode promover a diferenciação e sobrevivência. A ligação do péptido A β ao p75NTR activa o NF- κ B e a cascata das cinases JNK levando à morte celular por apoptose (adaptado de Coulson, 2006).

1.2. Doença de Alzheimer

A doença de Alzheimer (AD) é uma doença neurodegenerativa caracterizada pela formação de placas senis, emaranhados neurofibrilares intra-neuronais ricos em proteína Tau hiperfosforilada, e morte neuronal. Uma das características moleculares mais estudadas na AD é a presença de agregados tóxicos de péptidos β -amilóides ($A\beta$) nas placas senis. Estes péptidos derivam do processamento proteolítico alternativo na proteína APP (*amyloid precursor protein*) pela protease β -secretase (Figura 5). Mutações em genes envolvidos na AD familiar levam à produção de péptidos $A\beta$ mais amiloidogénicos, com capacidade para formarem agregados espontaneamente, originando alterações profundas nos neurónios e nas células da glia, assim como uma perda sináptica e demência (revisto em Selkoe, 1999).

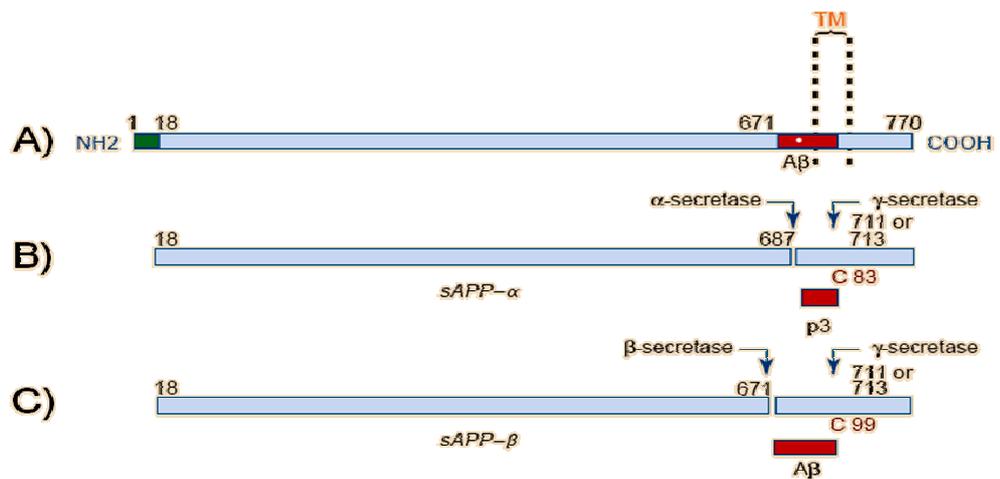


Figura 5 – Diagrama da APP e seus principais derivados metabólicos. **A)** Diagrama da proteína APP, com 770 resíduos de aminoácidos constituintes, e com uma sequência sinal de 17 resíduos no N-terminal. Esta proteína contém uma região transmembranar (TM) na posição 700-723, indicada pelas linhas verticais a tracejado. **B)** Representação da clivagem constitutiva da APP pela protease α -secretase. A seta da esquerda indica o local da clivagem pela α -secretase (após o resíduo 687). Esta clivagem resulta na libertação de um grande fragmento solúvel (sAPP- α) para o meio e a retenção de um fragmento C-terminal de 83 resíduos (C83) na membrana. Este fragmento pode ser posteriormente clivado pela γ -secretase libertando o péptido p3. **C)** Representação da clivagem alternativa da APP pela β -secretase. A seta da esquerda indica o local de clivagem pela β -secretase (após resíduo 671). Esta clivagem leva à libertação da molécula sAPP- β e à retenção na membrana do fragmento C99. Este fragmento pode sofrer nova clivagem pela γ -secretase na posição 711 ou 713 libertando os péptidos amiloidogénicos $A\beta_{40}$ ou $A\beta_{42}$, presentes na doença de Alzheimer (adaptado de Selkoe, 1999).

1.2.1. Neurotoxicidade mediada pelo péptido β -amilóide.

A neurotoxicidade mediada pelos péptidos A β é dependente do seu estado de agregação (Pike *et al.*, 1991, 1993), sendo a forma fibrilar do A β , e não a solúvel, especificamente tóxica para neurónios em cultura (Yankner, 1996) induzindo morte neuronal por apoptose (Estus *et al.*, 1997). Estas observações são consistentes com estudos patológicos em cérebros com AD, onde a neurodegeneração ocorre em redor de placas compactas compostas por fibrilhas amilóides (Yamazaki *et al.*, 1992). Contudo, observações mais recentes indicam que os oligómeros solúveis de A β (ADDLs – *A β -derived diffusible ligands*) também participam fortemente na toxicidade mediada pelos péptidos amilóides (Lambert *et al.*, 1998; Gong *et al.*, 2003). Assim, começa a surgir a necessidade de explorar o contributo das várias estruturas formadas pelos péptidos A β na patologia da AD (ver para revisão: Klein, 2006).

Vários estudos sugerem que, tanto o stress oxidativo, como alterações na homeostase do cálcio intracelular (Pike *et al.*, 1996; Yankner, 1996) possam estar envolvidos na apoptose induzida pelo A β (Figura 6). Contudo, até ao momento, o mecanismo específico pelo qual os péptidos A β induzem morte neuronal continua por ser esclarecido.

Todavia, sabe-se que em neurónios em cultura, a presença de péptidos A β resulta numa activação robusta das cinases JNK que, por sua vez, activam o factor de transcrição c-Jun, estimulando assim, a expressão de vários genes, incluindo o do indutor de morte FasL (ligando de Fas) (Morishima *et al.*, 2001). As JNKs são cinases fortemente activadas em diversas situações de stress, incluindo exposição a radiações ionizantes, citocinas inflamatórias, ceramidas, remoção de factores de crescimento e em alguns casos na presença de agonistas de receptores acoplados à proteína G (Ichijo, 1999). A importância das JNK na morte celular em situações de stress para a célula parece evidente e animais *knock-out* para cinases dessa família são mais resistentes a determinados estímulos tóxicos (Yang *et al.*, 1997).

1.2.2. Neurotrofinas como terapêutica para Doença de Alzheimer.

Partindo do pressuposto de que as neurotrofinas promovem sobrevivência neuronal, foi sugerido o uso destas proteínas para fins terapêuticos. Consequentemente, em 1993, foi desenvolvido um método para administrar a neurotrofina NGF directamente no cérebro de pacientes com AD (Seiger *et al.*, 1993). Este método consistia na inserção de um cateter no ventrículo lateral, ligado a uma bomba de infusão de modo a administrar uma solução com NGF (Figura 7). Todavia, este método é complexo e implica neurocirurgia, pelo que, a sua prática foi abandonada. Após a descoberta dos restantes membros da família das neurotrofinas, em particular do BDNF, surgiram diversos estudos correlacionando a patologia da AD com alterações nas acções

1. Introdução Teórica

desta neurotrofina. Nomeadamente: 1) polimorfismos no gene do BDNF (Ventriglia *et al.*, 2002); 2) diminuição nos níveis de mRNA do BDNF (Phillips *et al.*, 2001) e nos níveis da própria proteína do BDNF (Ferrer *et al.*, 1999); 3) aumento das densidades da isoforma truncada e concomitante diminuição da isoforma completa, do receptor TrkB (Ferrer *et al.*, 1999).

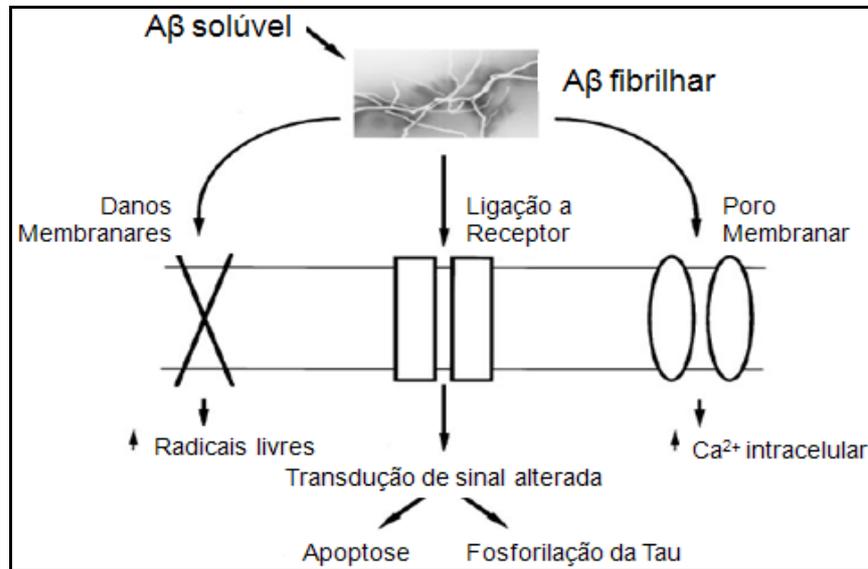


Figura 6 – Formação de Aβ fibrilhar e potenciais mecanismos de neurotoxicidade. Factores relacionados com a idade ou mutações associadas à AD induzem a formação de fibrilhas amilóides que podem levar à degeneração neuronal. Ainda não se conhecem os mecanismos associados à toxicidade dos péptidos Aβ, ou se esta toxicidade resulta da contribuição de vários mecanismos. Contudo, há pelo menos três modelos possíveis para explicar a neurotoxicidade mediada pelo Aβ: 1) As fibrilhas amilóides podem induzir neurotoxicidade através de um aumento dos níveis de cálcio intracelular. Contudo há evidências de que quelantes ou bloqueadores de canais de cálcio não reduzem essa toxicidade. 2) O potencial redox mitocondrial pode ser afectado pelos péptidos Aβ levando à geração de radicais livres contribuindo para a toxicidade. Contudo, no que diz respeito a anti-oxidantes existe alguma controvérsia, havendo estudos que mostram uma diminuição da toxicidade enquanto outros não observam esse efeito usando os mesmos antioxidantes. 3) Os péptidos Aβ podem interagir com receptores de membrana resultando numa activação aberrante da sinalização intracelular (adaptado de Yankner, 1996).

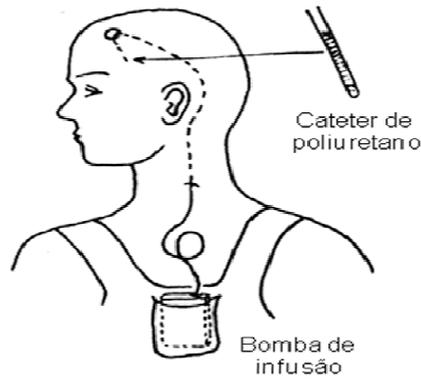


Figura 7 – Administração directa do NGF no cérebro. NGF administrado directamente através de um cateter no ventrículo lateral, ligado a uma bomba de infusão (adaptado de Sieger *et al.*, 1993).

Com base nas evidências de que a sinalização mediada pelo BDNF se encontra diminuída em doentes com AD, começaram a surgir novas estratégias para se administrar esta neurotrofina na tentativa de repor os níveis fisiológicos.

Porém, a administração de fármacos destinados a exercerem efeitos no cérebro têm de ter a capacidade de atravessar a barreira hemato-encefálica. Para ultrapassar este obstáculo, têm-se vindo a desenvolver modificações moleculares complexas no BDNF de modo a aumentar a eficácia de transporte pela barreira hemato-encefálica (Pardridge *et al.*, 1998).

As neurotrofinas por interferirem com múltiplas funções do sistema nervoso, podem provocar efeitos secundários tais como actividade epiléptica (Binder *et al.*, 2001), assim, a sua administração indiscriminada no cérebro começa a ser um conceito terapêutico obsoleto. Por isso, neste momento, começam a aparecer novos conceitos terapêuticos que envolvem o uso de pequenas moléculas, que penetrando a barreira hemato-encefálica possam estimular a síntese e/ou potenciar os efeitos das neurotrofinas endógenas. De particular relevância, encontra-se a adenosina, uma vez que a activação dos seus receptores A_{2A} pode induzir a fosforilação, e conseqüente activação, dos receptores TrkB mesmo na ausência do BDNF (Lee e Chao, 2001).

1.3. Adenosina

A adenosina (Figura 8) é um nucleósido ubíquo, libertado aparentemente por todas as células, incluindo neurónios e células da glia, nas quais actua como molécula sinalizadora extracelular. A adenosina libertada modula a actividade do sistema nervoso ao nível: 1) pré-sináptico, através da inibição ou facilitação da libertação de neurotransmissores; 2) pós-sináptico, pela hiperpolarização ou despolarização dos neurónios e/ou 3) extra-sináptico, por exemplo actuando em células da glia. Por a adenosina não ser libertada em vesículas exocitóticas mas através de transportadores específicos, é considerada como um neuromodulador e não como um neurotransmissor (revisto em Ribeiro *et al.*, 2003).

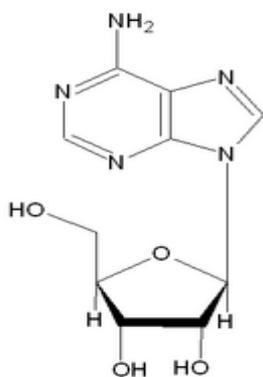


Figura 8 – Estrutura química da adenosina. A adenosina é um nucleósido formado pela adenina (uma purina) ligada à ribose (glícido), através de uma ligação glicosídica.

1.3.1. Receptores da Adenosina

A adenosina exerce as suas funções através da activação de receptores acoplados à proteína G (GPCR; A_1 , A_{2A} , A_{2B} , A_3), podendo inibir (A_1) ou potenciar (A_2) a comunicação neuronal. Todos os receptores da adenosina possuem sete segmentos transmembranares, são receptores acoplados a proteínas G, e têm ligação com uma variedade de mecanismos de transdução de sinal (Dunwiddie e Masino, 2001).

Os receptores A_1 de adenosina são abundantes no cérebro, estando altamente expressos no córtex, cerebelo, hipocampo, e também na espinal medula. Estes receptores acoplam-se a proteínas G inibitórias (G_i/G_0) que levam à inibição da actividade do enzima adenilato ciclase (Linden, 2001).

Os receptores A_{2A} de adenosina são expressos maioritariamente no estriado mas também estão presentes no hipocampo e córtex cerebral em menor quantidade (Rosin *et al.* 1998). Os receptores A_{2A} associam-se a proteínas G estimuladoras (G_s), cuja activação traduz-se num aumento da actividade do enzima adenilato ciclase, elevando assim os níveis de cAMP (*cyclic adenosine monophosphate*) intracelular (Linden, 2001).

Ao contrário dos receptores A₁ e A_{2A} que são de elevada afinidade para a adenosina, os receptores A_{2B} são de baixa afinidade e são pouco expressos no cérebro. O receptor A₃ apesar de ter níveis de expressão baixo no cérebro, em humanos é um receptor de alta afinidade para a adenosina (revisto em Ribeiro *et al.*, 2003).

1.3.2. Interação entre a adenosina e neurotrofinas

Para além dos efeitos directos pré- ou pós-sinápticos em neurónios, a adenosina possui mecanismos capazes de modular e de controlar a função de outras moléculas, como neurotransmissores, neuromoduladores ou ainda as neurotrofinas (revisto em Ribeiro *et al.*, 2003).

No contexto da interacção com as neurotrofinas, observou-se que a administração da adenosina, ou agonistas dos receptores A_{2A}, resulta numa activação (fosforilação) do receptor TrkB em culturas de neurónios do hipocampo, e na activação do receptor TrkA em células PC12, mesmo na ausência de neurotrofinas (Lee e Chao, 2001; Rajagopal *et al.*, 2004). Este processo de trans-activação dos receptores Trk, pelos receptores A_{2A} da adenosina, ocorre mesmo na ausência de neurotrofinas, e produz efeitos tróficos havendo activação das principais vias de sinalização mediadas pelos Trk (Lee e Chao, 2001) (Figura 9).

Do ponto de vista funcional sabe-se que a activação do receptor A_{2A} é um pré-requisito essencial para os efeitos excitatórios do BDNF na transmissão sináptica (Diógenes *et al.*, 2004, 2007; Tebano *et al.*, 2008).

Ao contrário do conceito terapêutico que envolve a administração directa de neurotrofinas no cérebro, a activação dos receptores A_{2A} da adenosina abre novas possibilidades para estimular apenas os receptores TrkB em subpopulações de neurónios que co-expressam os receptores TrkB e A_{2A}R, como no hipocampo e córtex cerebral (Lee e Chao, 2001; Thoenen H. e Sendtner, 2002), regiões estas que são afectadas na AD.

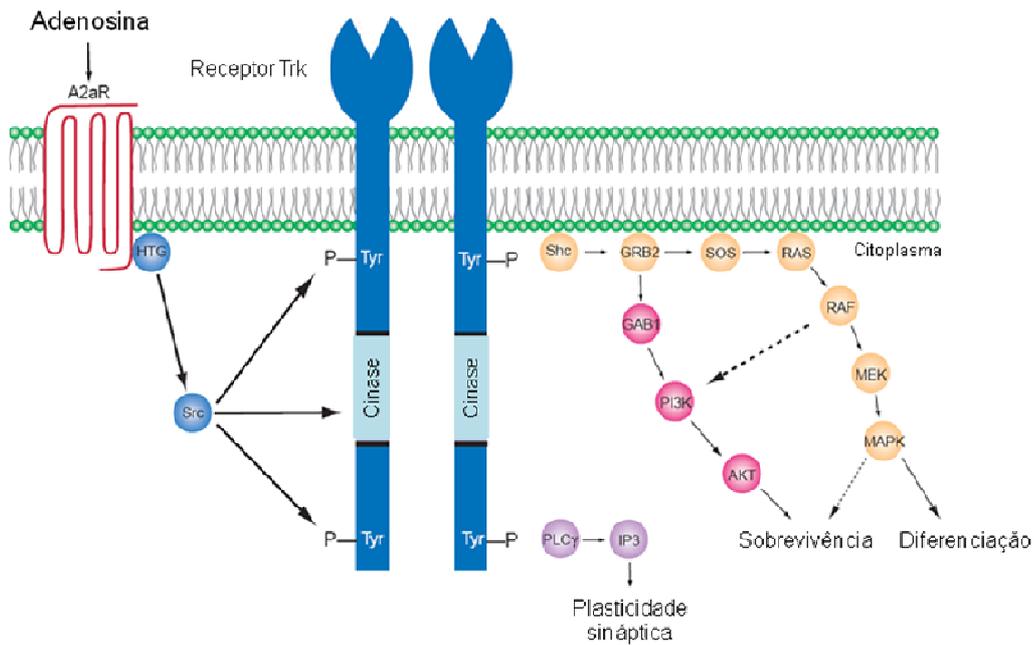


Figura 9 – Trans-ativação dos receptores Trk pelo receptor A_{2A} da adenosina. Os receptores Trk podem ser activados na ausência dos seus ligandos específicos (neurotrofinas) através de um mecanismo de trans-ativação via receptor A_{2A} da adenosina. Não se conhece exactamente os mecanismos associados a esta trans-ativação mas sabe-se que é dependente de cinases da família Src. A transactivação do TrkB pelo receptor A_{2A} culmina na activação da via PI3K-Akt mas com um perfil temporal diferente quando comparado com a activação induzida pelas neurotrofinas (Lee e Chao, 2001). Adaptado de Thoenen e Sendtner, 2002.

2. Objectivos

A adenosina é um modulador de moduladores; assim a activação dos seus receptores controla a acção de outras moléculas interferindo com várias funções biológicas. Em particular, a activação do receptor A_{2A} da adenosina induz a fosforilação dos receptores TrkB (Lee e Chao, 2001) e potencia os efeitos sinápticos do BDNF (Diógenes *et al.*, 2004, 2007; Tebano *et al.*, 2008).

Sabendo que, em doenças neurodegenerativas, tais como a AD, a sinalização mediada pelo BDNF se encontra diminuída (Ferrer *et al.*, 1999), a activação do receptor A_{2A} poderá ser uma boa estratégia para potenciar e restabelecer os efeitos do BDNF.

Assim, neste trabalho, pretendeu-se avaliar a influência da activação dos receptores A_{2A} da adenosina no efeito protector do BDNF na apoptose induzida pelo péptido $A\beta$ e também explorar as alterações provocadas por este péptido na isoforma completa e truncada do receptor TrkB.

Em suma, culturas primárias de neurónios foram usadas para:

- 1- Induzir apoptose pelo péptido $A\beta_{25-35}$
- 2- Analisar a influência do BDNF na apoptose induzida pelo péptido $A\beta_{25-35}$
- 3- Investigar a influência dos receptores A_{2A} da adenosina no efeito neuroprotector do BDNF
- 4- Avaliar as alterações nas densidades dos receptores TrkB induzidas pelo péptido $A\beta_{25-35}$

2. Objetivos

3. Métodos

3.1. Reagentes, Fármacos e Anticorpos

Os reagentes utilizados neste trabalho, salvo indicação em contrário, foram fornecidos pela *Invitrogen*.

3.1.1. Reagentes

Tabela 3- Alguns dos reagentes utilizados no trabalho experimental e respectivas funções.

Reagente	Função / Descrição
Suplemento B-27	Suplemento sem soro desenvolvido para aumentar a viabilidade e crescimento de neurónios em cultura. Permite obter culturas de neurónios quase puras com percentagens inferiores a 5% de células da glia (Brewer <i>et al.</i> , 1993).
Meio Neurobasal™	Meio especialmente formulado para culturas de células neuronais.
Ácido L-glutâmico	O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório no cérebro, e a baixas concentrações (como foi usado) promove a viabilidade dos neurónios em cultura.
Glutamina	Aminoácido essencial quimicamente instável em meio líquido e a pH fisiológico. É necessária a sua suplementação no meio de cultura, no próprio dia.
Tripsina	Enzima proteolítica usado para dissociar as células do tecido.
FBS	O soro fetal bovino inibe a tripsina devido à presença da proteína α 1-antitripsina.
Nonidet P40 (Fluka ®)	Detergente não iónico e não desnaturante (importante para os ensaios de actividade enzimática da Caspase-3). Permite lisar as células e solubilizar as proteínas de membrana (como os receptores de membrana TrkB).

3.1.2. Fármacos

Tabela 1- Fármacos usados no trabalho experimental e respectivas funções e concentrações.

Fármacos	Função/Descrição	Concentração final utilizada	Fornecedor
A β 25-35	Péptido beta amilóide 25-35	25 μ M	Bachem
BDNF	Factor neurotrófico / neurotrofina	20 ng/ml	Regeneron
CGS 21680	Agonista do receptor A _{2A} da adenosina	10 nM	Tocris
K252a	Inibidor da fosforilação dos receptores Trk	200 nM	Calbiochem
SCH 58261	Antagonista do receptor A _{2A} da adenosina	100 nM	Tocris
SCH 442,416	Potente antagonista do receptor A _{2A} da adenosina	100 nM	Tocris
Cicloheximida	Inibidor da elongação da tradução proteica	5 μ M	Sigma

3.1.3. Anticorpos

Tabela 2- Anticorpos usados no trabalho experimental e respectivas diluições.

Anticorpos Primários	Fornecedor	Diluição	Técnica
Anticorpo monoclonal de ratinho anti-TrkB	<i>BD transduction</i>	1:1000	<i>Western Blotting</i>
Anticorpo policlonal de coelho anti- α -tubulina	<i>Abcam</i>	1:5000	<i>Western Blotting</i>
Anticorpo policlonal de coelho anti-GFAP	<i>Abcam</i>	1:500	Imunofluorescência
Anticorpo monoclonal de ratinho anti-MAP2	<i>Chemicon</i>	1:500	Imunofluorescência
Anticorpo policlonal de coelho anti-caspase-3	<i>Santa Cruz</i>	1:1000	<i>Western Blotting</i>

Anticorpos Secundários	Fornecedor	Diluição	Técnica
Anti-IgG de ratinho - HRP	<i>Santa Cruz</i>	1:5000	<i>Western Blotting</i>
Anti-IgG de coelho - HRP	<i>Santa Cruz</i>	1:5000	<i>Western Blotting</i>
Anti-IgG de coelho - AlexaF488	<i>Invitrogen</i>	1:400	Imunofluorescência
Anti-IgG de ratinho - AlexaF568	<i>Invitrogen</i>	1:400	Imunofluorescência

3.2. Culturas Primárias de Neurónios

As culturas primárias de neurónios corticais foram preparadas a partir de fetos de ratos Sprague-Dawley com 18 a 19 dias de gestação. As ratas grávidas foram sacrificadas após anestesia com 30% de isoflurano em propilenoglicol. Os fetos foram rapidamente removidos e decapitados em solução salina HBSS-I (*Hanks' balanced salt solution*). Após a dissecação do cérebro e a remoção da matéria branca e das meninges, o córtex cerebral foi colocado numa solução HBSS sem ião cálcio (Ca^{2+}) e sem ião magnésio (Mg^{2+}) (HBSS-II). Os córtex foram fragmentados mecanicamente e transferidos para uma solução HBSS-II contendo 0,025% de tripsina e incubados durante 15 minutos a 37°C. Após a digestão com tripsina, as células foram precipitadas por centrifugação a baixa velocidade (200g), removeu-se o sobrenadante e adicionou-se HBSS-2 com 10% de FBS (*Fetal Bovine Serum*). Este processo de lavagem foi repetido de modo a garantir a neutralização da tripsina. De seguida, as células foram novamente precipitadas e posteriormente ressuspendidas em meio Neurobasal™ suplementado com 0,5mM de L-glutamina, 25 μ M de ácido L-glutâmico, 2% do suplemento B-27 e antibiótico Pen/Strep. Filtrou-se a suspensão de células com um filtro de nylon (BD Falcon™ Cell Strainer 70 μ M) de modo a obter uma suspensão de células mais uniforme, sem aglomerados celulares ou fragmentos de tecido. As células foram plaqueadas em caixas de cultura (700 células/mm²) previamente revestidas com PLL (*poly-D-lysine*) e mantidas em estufa a 37°C numa atmosfera humificada com 5% de CO₂.

Com base neste procedimento, obtiveram-se culturas de neurónios com cerca de 20% e 50% de células gliais para 4 e 10 DIV (*days in-vitro*), respectivamente (ver Anexos).

3.3. Administração de fármacos

Nas experiências onde se utilizaram culturas de neurónios com 4 DIV, o meio de cultura foi substituído (em 2 DIV) por novo meio sem suplemento B-27. Nas experiências onde se estudou o efeito do B-27 na morte induzida pelo péptido A β (subcapítulo 4.1.1), o meio foi igualmente substituído em 2 DIV mas por um novo meio com suplemento B-27. No 3 DIV, procederam-se às incubações com os fármacos. Nas condições onde se administrou o péptido A β , os restantes fármacos foram sempre adicionados 3 horas após, à excepção do K252a e da cicloheximida. O K252a foi então adicionado simultaneamente com o péptido A β e a cicloheximida foi adicionada 1 hora antes da adição de A β . As experiências foram terminadas em 4 DIV, 24 horas após a administração do péptido A β .

Nas experiências onde se utilizaram culturas de neurónios com 10 DIV, ao 4º dia o meio foi substituído por novo meio suplementado com B-27 e sem ácido glutâmico. No 8º dia substituiu-se novamente o meio, mas sem suplemento B-27. Os fármacos foram administrados aos neurónios com 9 DIV, 3 horas após a adição do péptido A β . Após 24 horas da aplicação do péptido A β (10 DIV), terminou-se a experiência através da preparação dos extractos celulares.

3.4. Preparação dos extractos proteicos

Aspirou-se o meio de cultura dos neurónios, e lavaram-se as células duas vezes com tampão PBS gelado (*Phosphate Buffered Saline*) (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 1,5 mM KH₂PO₄ e 8 mM Na₂HPO₄·2H₂O). As caixas de Petri contendo as células em cultura foram raspadas manualmente em 4 μ l/cm² de tampão de lise gelado (1% de Nonidet[®] P40 substitute (*nonyl phenoxy polyethoxy ethanol*, FLUKA[®]); 150mM de cloreto de sódio (NaCl); 50mM de Tris-base; 5mM de EDTA (Ethylenediamine Tetraacetic Acid); inibidores de proteases (*Complete, EDTA-free Protease Inhibitor cocktail tablets*, Roche[®]); 5mM de DTT (*1,4-dithiothreitol*), pH 8.0). Após 20 minutos em gelo, as células foram centrifugadas a 16.000g durante 10 minutos a 4°C. Recolheu-se o sobrenadante composto por proteínas totais e o *pellet* foi desprezado (debrítos celulares, núcleos e células intactas).

3.5. Quantificação de proteína

A concentração proteica das amostras foi determinada pelo método de Peterson segundo as instruções de um kit comercial (*Bio-Rad DC Protein Assay*), lendo a absorvência a 620nm (Leitor de placas *Anthos Lit 3*). Para efectuar a recta de calibração usou-se a BSA (*bovine serum albumin*).

3.6. Preparação do péptido A β ₂₅₋₃₅

O péptido A β ₂₅₋₃₅ liofilizado (*Bachem*[®]) foi dissolvido em água destilada e estéril numa concentração *stock* de 1mM e guardado a -20°C. Após descongelamento, o péptido A β ₂₅₋₃₅ foi administrado nas culturas neuronais numa concentração final de 25 μ M durante 24 horas a 37°C. Nas culturas onde se adicionou o péptido A β ₂₅₋₃₅ foi possível detectar a presença de fibrilhas amilóides, através de microscopia óptica.

A razão pelo qual se utilizou exclusivamente o fragmento amilóide 25-35 durante o presente trabalho, e não o péptido completo (A β ₁₋₄₂), surgiu do facto do péptido A β ₂₅₋₃₅ ser mais tóxico e possuir a vantagem de se agregar espontaneamente sem ser necessário proceder ao processo de “envelhecimento” dos péptidos a 37°C durante vários dias (Pike *et al.*, 1991,1993). Além do mais, está descrito que o domínio biologicamente activo do péptido A β , para os efeitos neurotóxicos, está localizado na região 25-35 (Pike *et al.*, 1995).

Apesar das placas senis na doença de Alzheimer serem essencialmente compostas por péptidos A β ₁₋₄₂, recentemente também se tem vindo a detectar e a valorizar a presença do fragmento 25-35 nestas placas (Kubo *et al.*, 2002; Gruden *et al.*, 2007).

3.7. Western-blotting

Usou-se a técnica de SDS-PAGE (*Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*) para avaliar os níveis do receptor TrkB e da Caspase-3. Após desnaturação térmica da amostra na presença do detergente SDS, aplicaram-se 15 μ g de proteína total por cada poço em géis de poliacrilamida a 12%. Posteriormente à separação das proteínas por electroforese em sistema vertical descontínuo, estas foram transferidas para membranas de nitrocelulose através do sistema de transferência “molhada”. De seguida, procedeu-se ao bloqueio das membranas com uma solução de 5% de leite magro (à temperatura ambiente), para evitar ligações inespecíficas dos anticorpos à membrana. Após o bloqueio, incubaram-se as membranas (durante a noite a 4°C) com os anticorpos primários contra a respectiva proteína de interesse. De seguida, procedeu-se à lavagem das membranas com uma solução de TBS-Tween 1%. Por fim, as membranas foram incubadas com o respectivo anticorpo secundário conjugado com a HRP (peroxidase de rábano - EC 1.11.1.7) durante 1 hora à temperatura ambiente. Após novas lavagens, procedeu-se à detecção da proteína de interesse usando reagentes luminescentes (*GE Healthcare, Amersham - ECL Plus Western Blotting Detection Reagents*).

Em todas as membranas procedeu-se à detecção da α -tubulina (55kDa) com o respectivo anticorpo de modo a possuir um controlo da quantidade de proteína aplicada por poço.

Os filmes obtidos no revelador (*Curix 60 processor*) foram digitalizados e a intensidade das bandas medida através do *software* “ImageJ”. Todas as intensidades das bandas respectivas às proteínas de interesse foram divididas pela intensidade das bandas da α -tubulina.

3.8. Detecção da apoptose

Para induzir apoptose nos neurónios em cultura administraram-se o fragmento 25-35 do péptido A β (A β_{25-35}), numa concentração final de 25 μ M. Após 24h de incubação com A β lisaram-se as células e prepararam-se os extractos proteicos, os quais serviram para proceder à análise da actividade enzimática da Caspase-3 e à detecção da formação de Caspase-3 através de *western-blotting*. Nos casos onde se procedeu à análise morfológica com o marcador fluorescente DAPI, as células foram tratadas como descrito em 3.7.1.

3.8.1. Análise morfológica

A análise morfológica dos núcleos das células foi realizada como descrito em Xu *et al.* 2009. Após remoção do meio de cultura, as células foram fixadas com 4% de paraformaldeído em PBS (pH 7.4) durante 10 minutos à temperatura ambiente, e incubadas com DAPI (*4',6-diamidino-2-phenylindole, Sigma*) durante 5 minutos numa diluição 1:15000. Por se intercalar no DNA, o DAPI permite visualizar os núcleos das células por microscopia de fluorescência.

Após lavagens com PBS, procedeu-se à montagem das lamelas, contendo as células, usando uma solução de Mowiol (*Sigma*). A fluorescência foi visualizada através do microscópio de fluorescência invertido Axiovert 135 TV (*Zeiss*), numa ampliação de 400x.

Para obter a percentagem de células apoptóticas contou-se os núcleos com características apoptóticas e dividiu-se pelo número total de núcleos. As características apoptóticas tidas em consideração foram a condensação da cromatina e a fragmentação dessa cromatina condensada. Os núcleos com cromatina não condensada e dispersa pelo núcleo foram considerados como núcleos “normais” sem características apoptóticas.

Para cada condição efectuou-se a média da percentagem de células apoptóticas contadas em 5 campos de visualização diferentes e escolhidos aleatoriamente.

3.8.2. Formação da Caspase-3

Para determinar os níveis da caspase-3 (proteína mediadora do processo de morte celular por apoptose), separaram-se as proteínas totais por SDS-PAGE num gel de poliacrilamida de 12%. Após transferência para uma membrana de nitrocelulose, estas foram incubadas com um anticorpo policlonal de coelho específico para a caspase-3 (*Santa Cruz Biotechnology*) numa diluição de 1:1000. Após lavagens com TBS-Tween, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase de rábano numa diluição de 1:5000. Finalmente,

quantificou-se a banda correspondente à Caspase-3 (17kDa) por densitometria, à qual se dividiu pela intensidade da banda da α -tubulina (55kDa) a fim de normalizar os valores à quantidade de proteína aplicada.

De referir que a Caspase-3 é um enzima (EC 3.4.22.56), que na sua forma inactiva de procaspase-3 tem uma massa de 32kDa (que também foi detectada no presente trabalho), e que após a clivagem dá origem à forma activa caspase-3 p17 com 17 kDa (Cohen, 1997).

3.8.3. Ensaio de actividade enzimática da Caspase-3

Para complementar os resultados dos níveis da caspase-3 obtidos *western-blotting*, efectuaram-se ainda ensaios espectrofotométricos para avaliar a actividade enzimática da caspase-3 através do substrato específico DEVD-pNA (N-acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-p-nitroanilina). Este substrato é susceptível à clivagem proteolítica por parte da caspase-3, libertando o cromóforo p-nitroanilina (pNA) que tem uma absorvência máxima a 405nm. Deste modo é possível medir a quantidade de produto formado através de espectrofotometria.

Para a reacção, usaram-se 40 μ g de proteína dos extractos proteicos e perfez-se o volume da mistura reaccional com tampão de lise para 100 μ l. A concentração final do substrato DEVD-pNA foi de 50 μ M. Após incubação a 37°C durante 1 hora, a absorvência foi medida a 405nm num leitor de placas de 96 poços (*Anthos Lit-3*), à qual se subtraiu o valor de absorvência do tempo zero (branco). Estes valores foram normalizados em relação ao valor da condição controlo.

De referir que a caspase-3 é uma protease e que durante a preparação dos extractos proteicos foi utilizado um *kit* de inibidores de proteases, pelo que este ensaio foi realizado na presença ou na ausência dos inibidores, não se tendo observado diferenças significativas entre os resultados obtidos por estes dois procedimentos. Assim sendo, utilizou-se sempre o kit de inibidores de proteases durante a preparação dos extractos.

3.9 Imunocitoquímica

A técnica de imunocitoquímica foi utilizada para caracterizar as culturas primárias de neurónios em relação a percentagem de células da glia nelas presente. Assim, após remoção do meio de cultura fixou-se as células com 4% de paraformaldeído em PBS (pH 7,4) durante 10 minutos à temperatura ambiente.

Após lavagens com PBS, adicionou-se uma solução de bloqueio durante 5 minutos (0.1% Triton X-100 com 0,1% gelatina em PBS). Após novas lavagens com PBS, procedeu-se à incubação durante 1 hora (temperatura ambiente) com anticorpo primário diluído numa solução de 0,1% de gelatina em PBS. Para detectar especificamente os neurónios utilizou-se um anticorpo primário de rato anti-MAP-2 (diluição 1:500). Para detectar astrócitos (células da glia) utilizou-se um anticorpo de coelho anti-GFAP (diluição 1:500). Contudo o GFAP também é expresso em neurónios mais imaturos, como os utilizados em culturas com 4 dias, pelo que no presente trabalho apenas se mostrou a marcação com MAP-2 para estas culturas.

Após novas lavagens com 0,05% Tween-20 em PBS, incubaram-se as células com anticorpos secundários durante 1 hora (anti-IgG de coelho-AlexaF488 e anti-IgG de rato-AlexaF568). Após a adição do marcador fluorescente DAPI e posteriores lavagens, procedeu-se à montagem das lamelas, usando uma solução de Mowiol (*Sigma*). A fluorescência foi visualizada através do microscópio de fluorescência invertido Axiovert 135 TV (*Zeiss*), numa ampliação de 400x. Os neurónios (MAP-2) ficaram marcados a vermelho, as células da glia (GFAP) ficaram marcadas a verde e os núcleos celulares ficaram a azul. Apenas foram considerados como neurónios as células nas quais se observou marcação para MAP-2 (ver Anexos).

3.10 Análise de dados

Os valores estão apresentados como a média \pm erro padrão para um número “n” de experiências independentes. Consideraram-se como experiências independentes, as observações efectuadas em diferentes culturas primárias de neurónios, preparadas a partir de embriões de diferentes ratas grávidas. Para testar a significância entre duas condições realizou-se um teste estatístico T de *Student* (*Student's t-test*). Quando se efectuaram múltiplas comparações entre três ou mais condições foi feita uma análise de variância simples (*one way ANOVA - analysis of variance*) seguida de um teste de *Dunnnett* quando comparadas ao controlo, ou de um teste de *Bonferroni* quando comparadas entre si. Valores de *p-value* < 0,05 foram considerados como estatisticamente significativos (**p* < 0,05; ***p* < 0,01; ****p* < 0,001).

4. Resultados e Discussão

4.1. Apoptose induzida pelo péptido A β ₂₅₋₃₅

Resultados:

Células neuronais com 4 dias *in-vitro* (4 DIV) foram incubadas com o péptido A β ₂₅₋₃₅ (25 μ M) durante 24 horas e a morte celular por apoptose foi avaliada usando os métodos anteriormente descritos. O suplemento B-27 foi removido do meio destas culturas 24 horas antes da administração com o péptido A β .

Como esperado, a avaliação morfológica dos núcleos permitiu detectar poucas células com características apoptóticas nas culturas controlo (18 \pm 3%, n=3, Figura 10). Pelo contrário, na presença do péptido A β ₂₅₋₃₅ (25 μ M) durante 24 horas, observou-se um aumento significativo da percentagem de núcleos apoptóticos para 37 \pm 5% quando comparado com a situação controlo (n=3, p<0,05, Figura 10).

Sabendo que a caspase-3 é uma proteína efectora da apoptose, os resultados obtidos por *western-blotting* indicam que o péptido A β ₂₅₋₃₅ (25 μ M) eleva os níveis da caspase-3 em cerca de 6,7 \pm 0,3 vezes, quando comparado com o controlo (n=8, p<0,001, Figura 11.a). Pelo ensaio espectrofotométrico, observou-se ainda que o A β induz um aumento de 3,3 \pm 0,2 vezes na actividade enzimática da caspase-3, relativamente ao controlo (n=8, p<0,001, Figura 11.b).

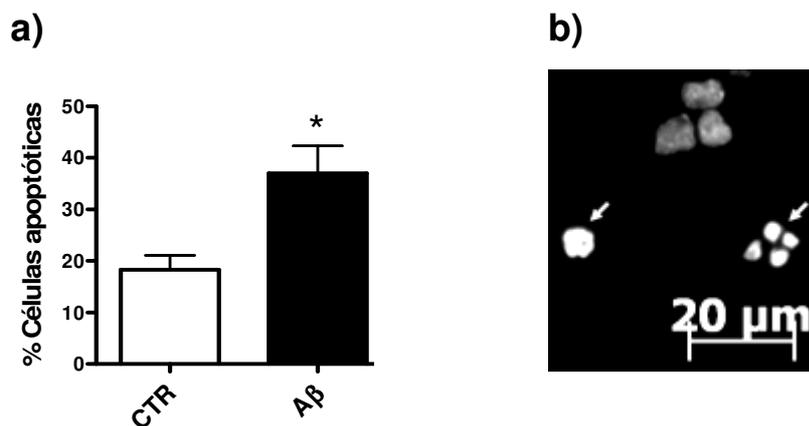


Figura 10 – Percentagem de núcleos apoptóticos na presença e ausência do péptido A β (25 μ M), em culturas 4 DIV. a) Resultados obtidos para a contagem de núcleos apoptóticos usando o marcador fluorescente DAPI b) Imagem obtida por microscopia de fluorescência dos neurónios em cultura com a sonda DAPI. As setas apontam para os núcleos apoptóticos onde é visível a condensação e a fragmentação da cromatina condensada (seta da esquerda e direita, respectivamente). *p<0,05 (*t-test*, n=3).

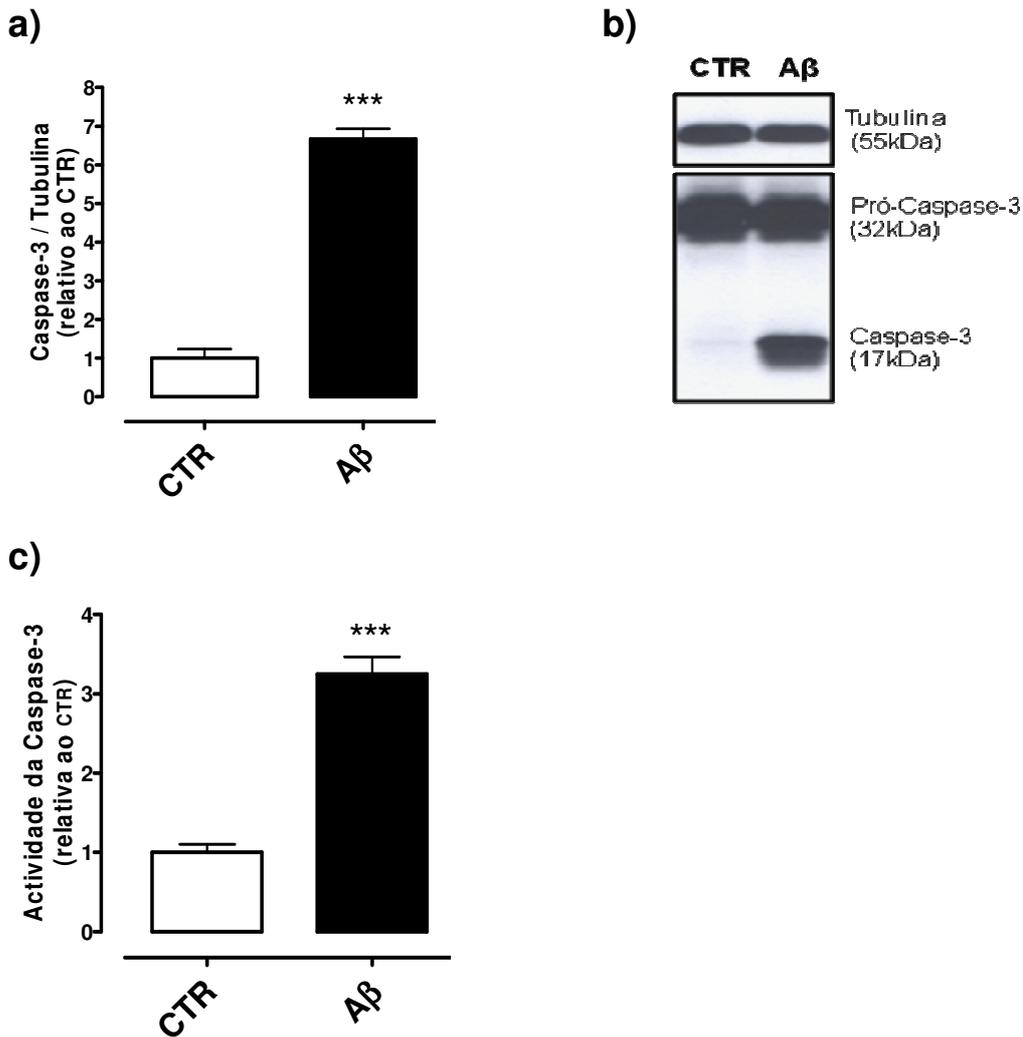


Figura 11- Avaliação da formação e actividade de Caspase-3 induzida pelo péptido A β (25 μ M), em culturas 4 DIV. **a)** Resultados da quantificação dos níveis da caspase-3, obtidos por *western-blotting*. **b)** Exemplo representativo de um filme obtido por *western-blotting* para a detecção da pró-caspase-3 (32kDa) e caspase-3 (17kDa). **c)** Resultados obtidos pelo ensaio da actividade enzimática da caspase-3. ***p<0,001 (*t-test*, n=8)

4.1.1. Influência do suplemento B-27.

Resultados:

Para estimular o crescimento e aumentar a viabilidade dos neurónios em cultura foi utilizado um suplemento formulado artificialmente denominado de B-27. A composição exacta deste produto comercial não é conhecida, no entanto, sabe-se que contém ácidos gordos essenciais, hormonas, vitaminas e anti-oxidantes que protegem os neurónios ao mesmo tempo que previnem a proliferação das células da glia enriquecendo assim as culturas em neurónios (Brewer *et al.* 1993).

No decorrer deste trabalho foi utilizado o péptido A β como um agente indutor de morte neuronal por apoptose. Apesar de, em estudos anteriores, se ter observado que a presença do suplemento B-27, no meio de cultura, fornecia protecção às células da toxicidade pelo péptido A β (Puttfarcken *et al.*, 1996; Arancibia *et al.*, 2008) pareceu-nos interessante avaliar qual o efeito da presença deste suplemento na apoptose induzida pelo péptido A β , nas condições experimentais do presente trabalho.

Utilizando culturas de neurónios com 4 DIV, observou-se que na situação controlo, tanto a actividade como os níveis da caspase-3 estão muito reduzidos (quando comparado com a situação em que o A β está presente), quer em culturas com o suplemento B-27 presente no meio, quer em culturas onde o suplemento foi removido 48 horas antes do fim da experiência (Figura 12).

Como anteriormente descrito, a presença do péptido A β (25 μ M) em culturas primárias de neurónios, eleva significativamente os níveis e a actividade da caspase-3. Contudo, na presença do suplemento B-27, foram obtidos valores idênticos quer para os níveis da caspase-3, quer para a sua actividade enzimática, comparativamente com a situação na qual se removeu o B-27 (n=3, Figura 12).

Apesar de não se ter observado um efeito protector por parte do B-27, optou-se sempre por remover este suplemento 24 horas antes da adição dos fármacos, durante todo o trabalho experimental, como anteriormente descrito (Behbahani *et al.*, 2005; Arancibia *et al.*, 2008)

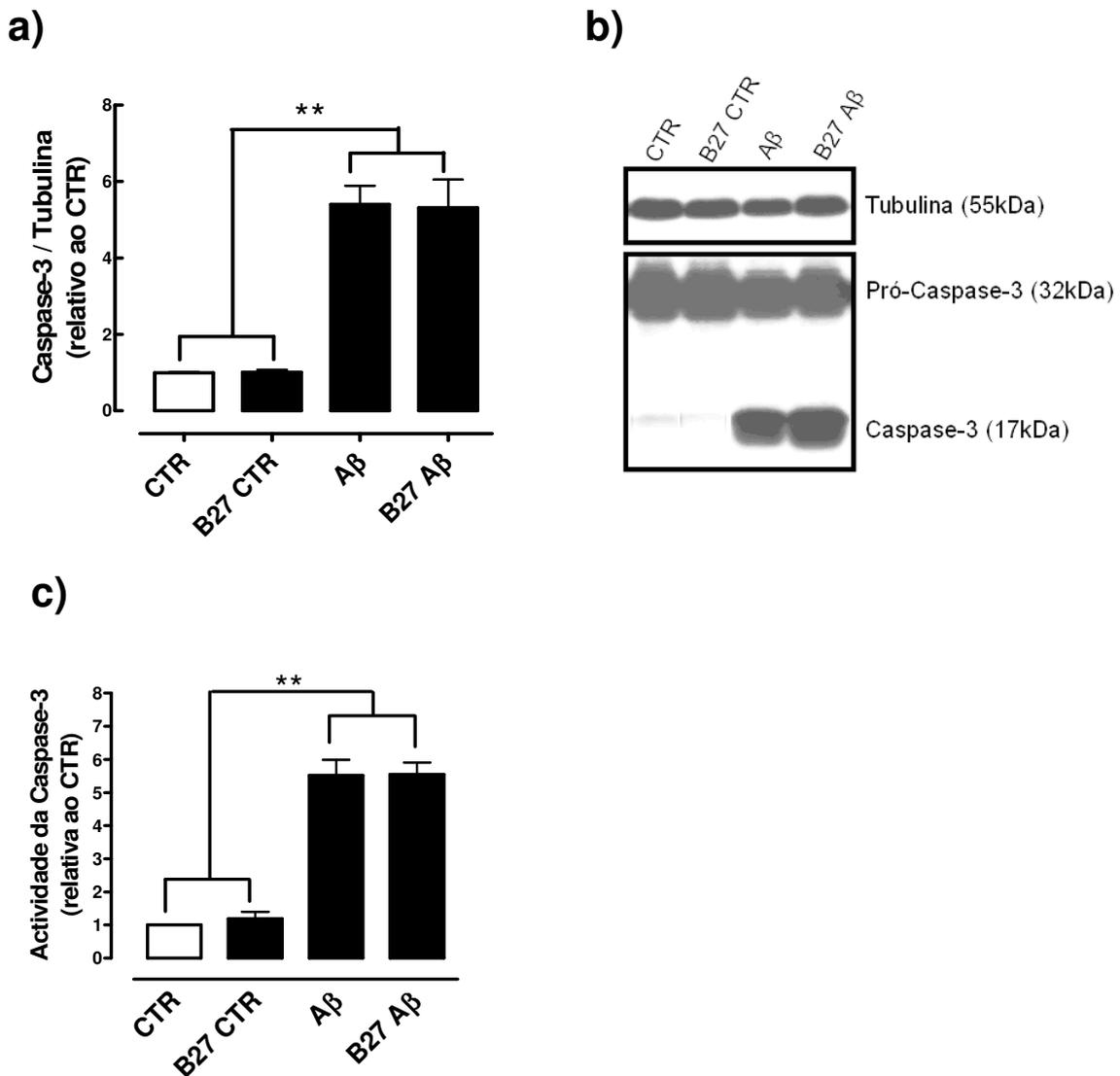


Figura 12 – Efeito do suplemento B-27 na activação da caspase-3 induzida pelo péptido A β (25 μ M), em culturas 4 DIV. a) Resultados da quantificação dos níveis da caspase-3, obtidos por *western-blotting*. b) Exemplo representativo de um filme obtido por *western-blotting* para a detecção da pró-caspase-3 (32kDa) e caspase-3 (17kDa). c) Resultados obtidos pelo ensaio da actividade enzimática da caspase-3. **P<0,01 (ANOVA com correcção de *Bonferroni*, n=3)

4.1.2. Papel da fosforilação de resíduos de tirosina.

Resultados:

As neurotrofinas exercem as suas funções através da activação de duas famílias de receptores distintos, os receptores de cinase de tirosina Trk e o receptor p75NTR, o qual não possui actividade de cinase de tirosina. Assim, utilizou-se um inibidor da fosforilação de resíduos de tirosina, o K252a, que ao inibir a activação dos receptores Trk, permite avaliar o efeito da activação exclusiva do receptor p75NTR. Deste modo, ao inibir os receptores Trk era esperado observar um aumento dos níveis de apoptose induzida pelo péptido A β .

O K252a (200nM) foi adicionado em simultâneo ao péptido A β ₂₅₋₃₅ (25 μ M) e permaneceu no meio de cultura durante 24 horas.

Na ausência de péptido A β , o K252a (200nM), não alterou os níveis e a actividade da caspase-3, comparando com o controlo (n=3, Figura 21).

Surpreendentemente, a detecção da fragmentação da pro-caspase-3 por *western-blotting* revelou que o fármaco K252a reverte, na totalidade, a formação da caspase-3 induzida pelo péptido A β , para valores semelhantes aos do controlo (p<0,001, n=5, Figura 13.a,b). Concomitantemente, o K252a também bloqueou o aumento na actividade enzimática da caspase-3 induzida pelo péptido A β (p<0,001, n=5, Figura 13.c).

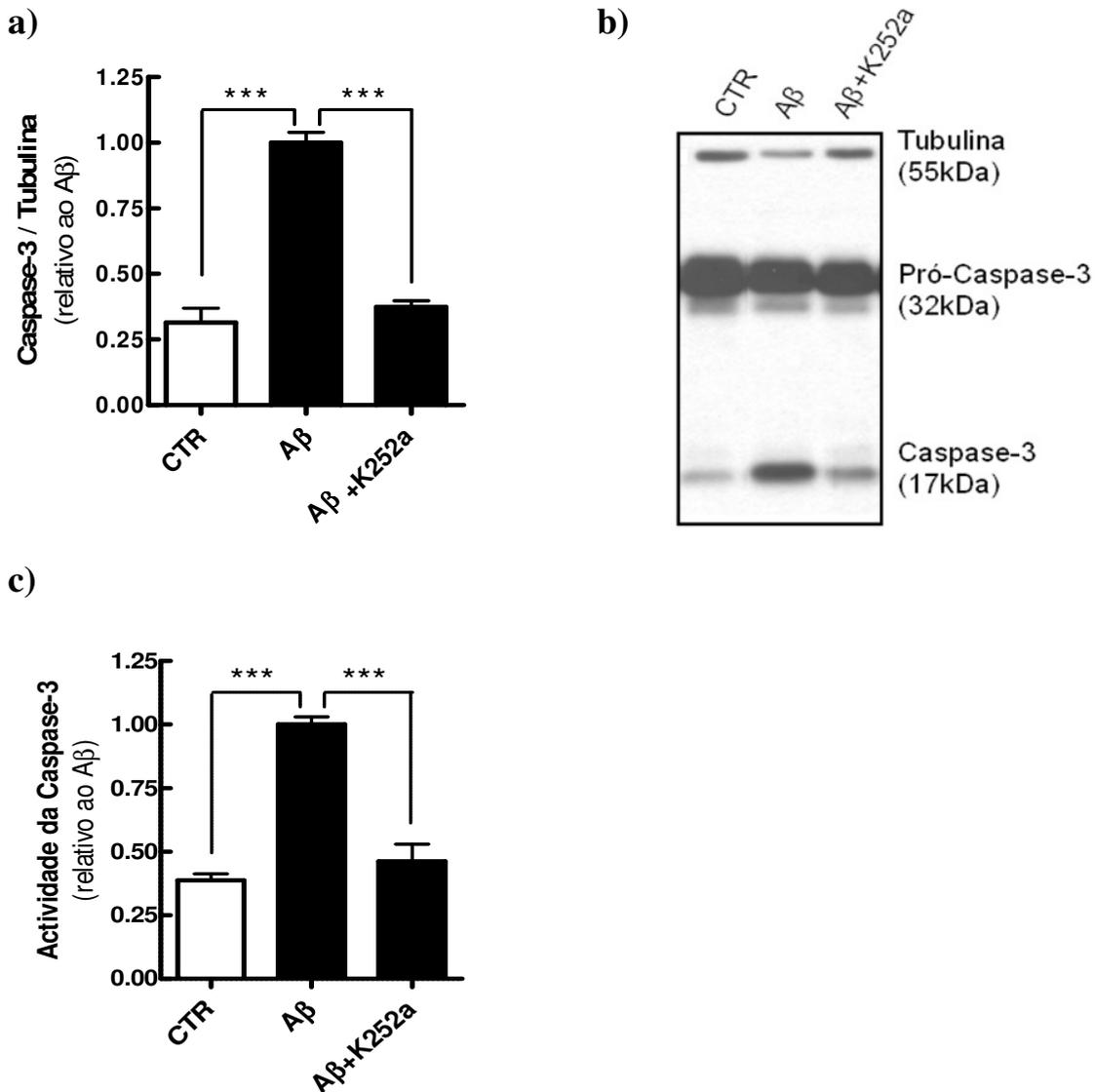


Figura 13 – Efeito do fármaco K252a(200nM) na fragmentação da pró-caspase-3 em caspase3 induzida pelo péptido Aβ(25μM), em culturas 4 DIV. a) Resultados da quantificação dos níveis da caspase-3, obtidos por *western-blotting*. **b)** Exemplo representativo de um filme obtido por *western-blotting* para a detecção da pró-caspase-3 (32kDa) e caspase-3 (17kDa). **c)** Resultados obtidos pelo ensaio da actividade enzimática da caspase-3. *** $p < 0,001$ (ANOVA com correcção de *Dunnet*, $n=5$). Os efeitos do K252a na ausência de péptido Aβ encontram-se representados na Figura 21.

4.1.3. Influência da síntese proteica.

Resultados:

A toxicidade induzida pelo péptido A β tem sido apontada como sendo dependente da síntese proteica (Pike *et al.*, 1996). Para confirmar se a morte celular por apoptose observada no presente trabalho era dependente de síntese proteica, usou-se um inibidor da síntese proteica, a cicloheximida (CHX). Para garantir que a síntese proteica já se encontrava inibida no momento em que o péptido A β foi adicionado, a CHX (5 μ M) foi administrada às culturas 1 hora antes da administração do péptido. Os resultados obtidos indicam que a CHX diminui a formação e a actividade enzimática da caspase-3 induzida pelo péptido A β , para níveis semelhantes à situação controlo (n=2, Figura 14).

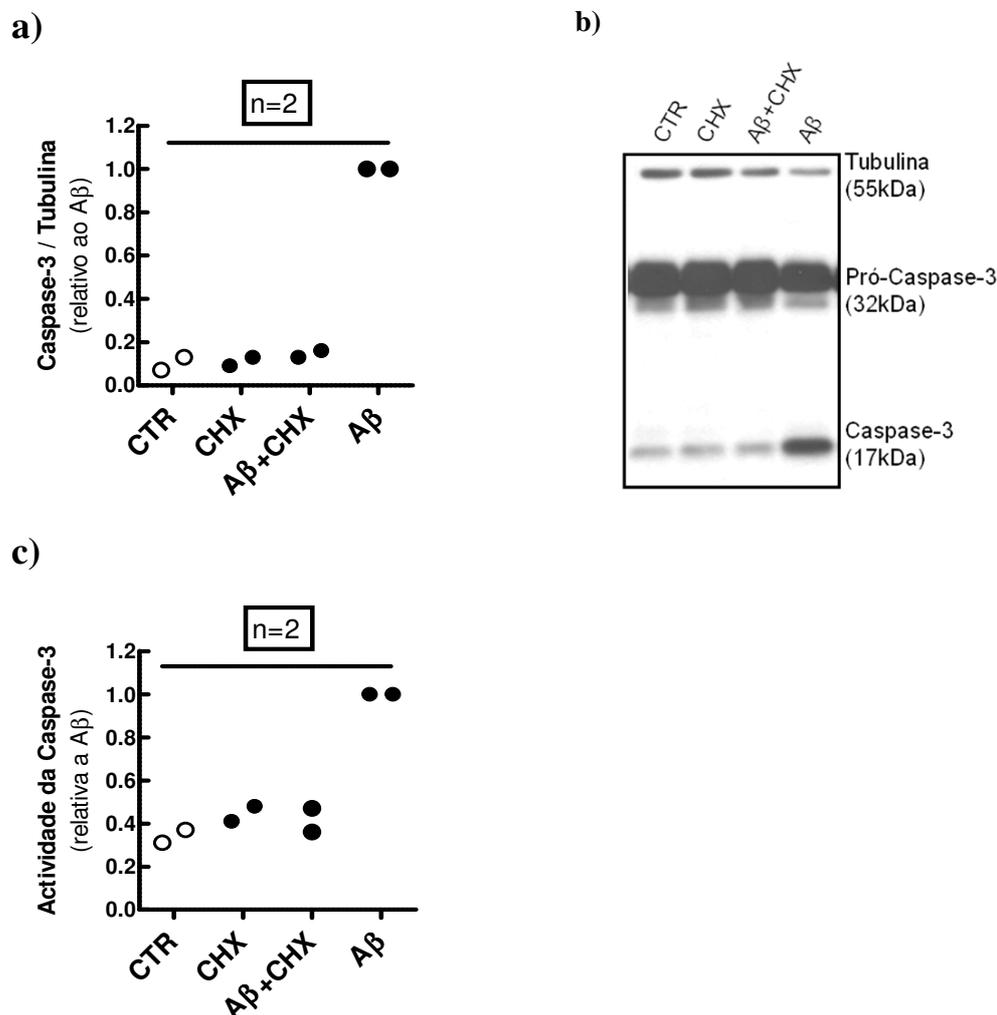


Figura 14 – Efeito da cicloheximida (CHX, 5 μ M) na fragmentação da pró-caspase-3 em caspase-3 induzida pelo péptido A β (25 μ M), em culturas 4 DIV. a) Resultados da quantificação dos níveis da caspase-3, obtidos por *western-blotting* (n=2). b) Exemplo representativo de um filme obtido por *western-blotting* para a detecção da pró-caspase-3 (32kDa) e caspase-3 (17kDa). c) Resultados obtidos pelo ensaio da actividade enzimática da caspase-3 (n=2).

4.1.4. Discussão:

Os resultados mostram que o péptido A β_{25-35} (25 μ M) quando aplicado a culturas primárias de neurónios induz um aumento significativo do número de células com características apoptóticas bem como um aumento marcado da formação da caspase-3 e da sua actividade.

Observou-se ainda que a toxicidade induzida pelo A β_{25-35} (25 μ M) não é modificada pela remoção do suplemento B-27 24 horas antes da adição do péptido. Por outro lado, verificou-se que a formação da caspase-3 induzida pelo péptido A β é bloqueada pelo inibidor da fosforilação dos receptores Trk, K252a, e que é dependente da síntese proteica uma vez que na presença de um inibidor da síntese proteica os níveis de caspase-3 foram reduzidos para valores semelhantes aos do controlo.

Os resultados obtidos através da análise morfológica com uso do marcador fluorescente DAPI mostram que há um aumento no número dos núcleos apoptóticos aquando da administração de péptido A β_{25-35} (25 μ M) comparando com o controlo. Numa fase tardia do processo de apoptose, ocorrem alterações irreversíveis na morfologia nuclear, havendo condensação da cromatina (fase denominado de *pyknosis*) e posterior fragmentação da mesma cromatina (*karyorrhexis*) (Kroemer *et al.* 2009). Devido à condensação da cromatina, e ao aumento da permeabilidade das membranas celulares durante a morte celular por apoptose, os núcleos das células apoptóticas apresentam um sinal mais intenso quando marcados com o DAPI do que os núcleos das células viáveis.

Todavia, o método de análise morfológica possui algumas desvantagens nomeadamente a possibilidade de erro humano aquando da avaliação e contagem dos núcleos com características apoptóticas. Por outro lado, o DAPI não é um marcador específico para a apoptose, pelo que apenas se pode inferir sobre o estado apoptótico da célula através da análise das alterações morfológicas nucleares características. Além do mais, essas alterações correspondem a estados apoptóticos muito avançados, pelo que não é possível identificar células em fase inicial da apoptose. De salientar que, para tornar a análise morfológica mais correcta, os neurónios em cultura deveriam ser marcados com um marcador específico (como o neurofilamento ou MAP-2), de modo a poder excluir os núcleos apoptóticos da população de células da glia presentes na cultura. Um método complementar à análise morfológica por DAPI, seria o método de TUNEL (*TdT-mediated dUTP nick end labelling*), onde se detectaria especificamente a fragmentação do DNA poucas horas após o início do processo apoptótico (Gavrieli *et al.*, 1992).

Para complementar o estudo da detecção de apoptose, para além da análise morfológica, quantificou-se ainda os níveis e a actividade enzimática da caspase-3, que é uma proteína efectora do processo de apoptose.

A fim de se testar se o suplemento B-27, utilizado no meio de cultura para favorecer o crescimento de neurónios em detrimento das células da glia, poderia influenciar a viabilidade

celular, avaliou-se a formação de caspase-3 em culturas de células às quais foi retirado o B-27 ou mantido até ao fim da experiência. Curiosamente, a remoção do suplemento B-27 (48 horas antes do fim da experiência) não alterou nem os níveis nem a actividade da caspase-3 quando comparados aos valores do controlo (células com B-27). Apesar de estar descrito, que em culturas com mais de 4 dias *in-vitro* (4 DIV) este suplemento aumenta a viabilidade celular (Brewer *et al.*, 1993), os resultados aqui obtidos indicam que as culturas com 4 DIV se mantêm viáveis e com níveis e actividade da caspase-3 muito reduzidos, tanto na presença como na ausência de suplemento B-27. Verificou-se ainda que, na ausência, ou presença do suplemento B-27, não existem diferenças significativas na apoptose induzida pelo péptido A β . Estas observações diferem de alguns resultados publicados anteriormente nos quais se observou, que o suplemento B-27 protege os neurónios da morte induzida pelo péptido A β (Puttfarcken *et al.*, 1996). Estas diferenças poderão ser explicadas pelas recentes modificações na formulação do suplemento B-27, motivo este que é apontado como causa da diminuição da viabilidade das culturas e da reprodutibilidade de resultados em vários grupos (Chen *et al.*, 2008).

Uma vez que os resultados foram idênticos quer na presença quer na ausência do suplemento B-27, em todas as experiências realizadas optou-se por remover o suplemento 24 horas como anteriormente descrito (Behbahani *et al.*, 2005; Arancibia *et al.*, 2008) antes da administração do péptido A β e/ou de fármacos de forma a evitar possíveis interacções farmacológicas.

A acumulação do péptido A β no cérebro tem sido implicada como uma potencial causa para a perda neuronal que ocorre AD (Shimohama, 2000). A morte celular resultante da toxicidade deste péptido é um processo complexo no qual vários factores podem estar envolvidos, nomeadamente o stress oxidativo, disfunção mitocondrial e perturbação da homeostase do cálcio (Selkoe, 2001). É sabido que, em os agregados tóxicos de péptidos A β induzem inflamação e consequente formação de espécies radiculares devido à activação da microglia (macrófagos residentes no cérebro pertencentes à população de células da glia) (Casal *et al.*, 2002). Contudo nem sempre se observa efeito protector de antioxidantes na toxicidade mediada por este péptido. Por exemplo, e como anteriormente discutido, o suplemento B-27, que é rico em antioxidantes, não protegeu as células da toxicidade do péptido A β . Inclusivamente, há estudos em que foram testados vários agentes antioxidantes na toxicidade mediada pelo péptido A β_{25-35} em culturas de neurónios onde não se verificou qualquer efeito protector (Lockhart *et al.*, 1994). Todavia, é necessário ter em consideração que em culturas (*in-vitro*) a exposição ao péptido A β é um processo agudo comparando com a AD onde deposição deste péptido é um processo lento e crónico, pelo que, a extensão do processo inflamatório nesta patologia certamente será diferente quando comparada com modelos *in-vitro*.

Com o propósito de estudar o efeito da activação exclusiva do receptor p75NTR, pelas neurotrofinas endógenas, na toxicidade induzida pelo péptido A β , avaliou-se a acção de um

inibidor da fosforilação dos resíduos de tirosina, o K252a. Deste modo, era esperado que ao inibir a fosforilação dos Trk com o K252a, o receptor de morte p75NTR seria activado em exclusivo pelas neurotrofinas endógenas, aumentando assim a apoptose induzida pelo péptido A β . Surpreendentemente, a administração do K252a às culturas de neurónios, bloqueou totalmente a activação da caspase-3 induzida pelo péptido A β . Curiosamente, durante a obtenção destes resultados, foi publicado um estudo no qual se detectou o mesmo efeito em condições experimentais semelhantes (Xu *et al.*, 2009). Os autores concluíram que o efeito protector do K252a era devido à sua capacidade de inibir as cinases JNK (Xu *et al.*, 2009).

Na realidade, estudos prévios demonstraram que a incubação com o péptido A β activa várias moléculas de sinalização com um papel pró-apoptótico. Recentemente, tem-se dado muita ênfase às cinases JNK uma vez que tanto o seu próprio substrato, c-Jun, como as próprias cinases JNK se encontram activadas em neurónios de pacientes com AD (Zhu *et al.*, 2001). Esta activação também ocorre, de forma robusta, em culturas de neurónios (Morishima *et al.*, 2001; Yao *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2009).

A neuroprotecção conferida pelo K252a (inibidor de cinases JNK) e pela cicloheximida (inibidor da síntese proteica) mostra que, a toxicidade do péptido A β depende da participação de vários processos celulares que conduzem à morte. Na realidade, estudos anteriores já tinham mostrado que a morte neuronal pelo péptido A β , avaliada pelo método de exclusão do azul de tripano (ensaio de viabilidade celular), é dependente da síntese proteica *in-vitro* (Pike *et al.*, 1996). Durante o presente trabalho observou-se que ao inibir a síntese proteica, com a cicloheximida, ocorre uma diminuição acentuada na activação da caspase-3 induzida pelo péptido A β . Estas observações sugerem que a apoptose induzida pelo A β necessita da síntese de proteínas com um papel pró-apoptótico. Apesar de ainda não se conhecerem, na totalidade, as proteínas envolvidas na morte celular induzida pelo péptido A β , sabe-se que a apoptose induzida por este péptido é dependente da síntese *de novo* da proteína FasL (Morishima *et al.*, 2001). Esta proteína solúvel (FasL) induz morte celular por apoptose através da ligação ao seu receptor de morte Fas, que, por sua vez, activa directamente a cascata das caspases (Nagata *et al.*, 1997) conduzindo ao processo de morte por apoptose. De salientar que, a expressão de FasL induzida pelo péptido A β é resultado da activação do factor de transcrição c-Jun, que por sua vez é activado pelas cinases JNK (Morishima *et al.*, 2001). Os resultados observados por outros autores e os agora obtidos nesta tese apontam para que tanto o K252a como a cicloheximida bloqueiem, em diferentes passos, a via JNK/c-Jun/FasL-Fas levando a uma inibição da apoptose induzida pelo A β (Figura 15).

Apesar do efeito neuroprotector bastante robusto do K252a na toxicidade do péptido A β , observado no presente trabalho e por outros investigadores (Xu *et al.*, 2009), existe outro estudo no qual os autores mostram que o K252a não só não protege da toxicidade induzida pelo péptido A β , como também bloqueia o efeito protector do BDNF, devido à inibição do receptor TrkB (Arancibia *et al.*, 2008). Estes resultados contraditórios podem prender-se com questões metodológicas,

nomeadamente no que concerne à forma de avaliação da morte celular. Enquanto, no trabalho de Arancibia e colaboradores, foi utilizado um método de análise da viabilidade celular (ensaio do MTT), o que não permite distinguir a apoptose da necrose, no trabalho aqui descrito bem como nos estudos de Xu e colaboradores foram usados métodos específicos de detecção de morte celular por apoptose.

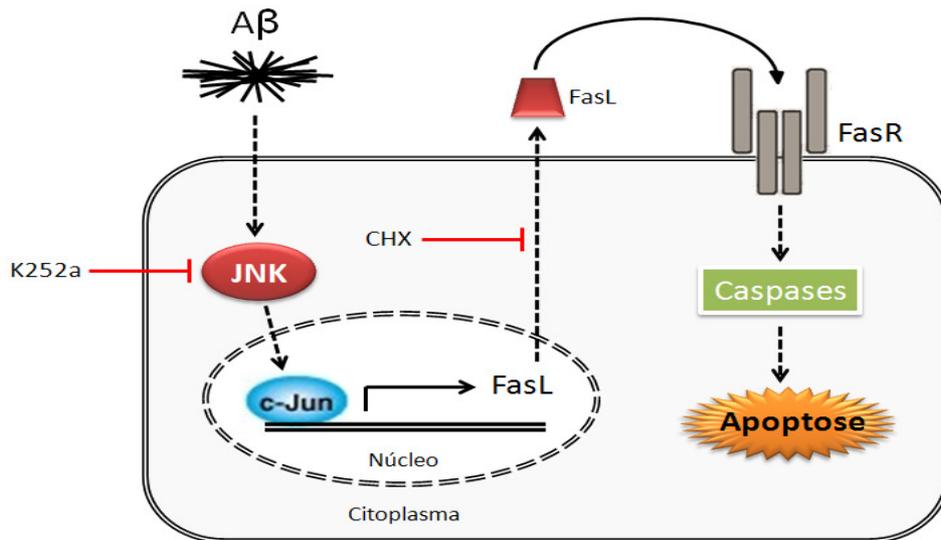


Figura 15 – Esquema de um possível mecanismo para a apoptose induzida pelo péptido A β .

Os agregados de péptido A β induzem activação das cinases JNK que por sua vez activam o factor de transcrição c-Jun (Morishima *et al.*, 2001). Este factor regula a expressão de vários genes, incluindo o ligando do receptor Fas (FasL). A ligação de FasL ao seu receptor (FasR) activa directamente a cascata das caspases culminando assim na morte celular por apoptose (Nagata *et al.*, 1997). Tanto o fármaco K252a, como a cicloheximida (CHX) podem bloquear este mecanismo, através da inibição de JNK (Xu *et al.*, 2009) ou da síntese proteica, respectivamente.

4.2. Influência do BDNF na apoptose induzida pelo péptido A β ₂₅₋₃₅.

Resultados:

O péptido A β induz alterações em processos celulares, nomeadamente nas vias de sinalização. Visto essas alterações ocorrerem numa determinada janela temporal, realizaram-se ensaios preliminares para averiguar a influência da incubação com BDNF a vários tempos relativamente à administração do péptido A β nas culturas de neurónios. Assim, usando o ensaio da actividade enzimática da caspase-3, avaliou-se o efeito neuroprotector do BDNF (20ng/ml) quando administrado: 1 hora antes do péptido A β (Figura 16.a); simultaneamente com o péptido A β ; 3 horas e 5 horas (Figura 16.b) após a adição do péptido A β .

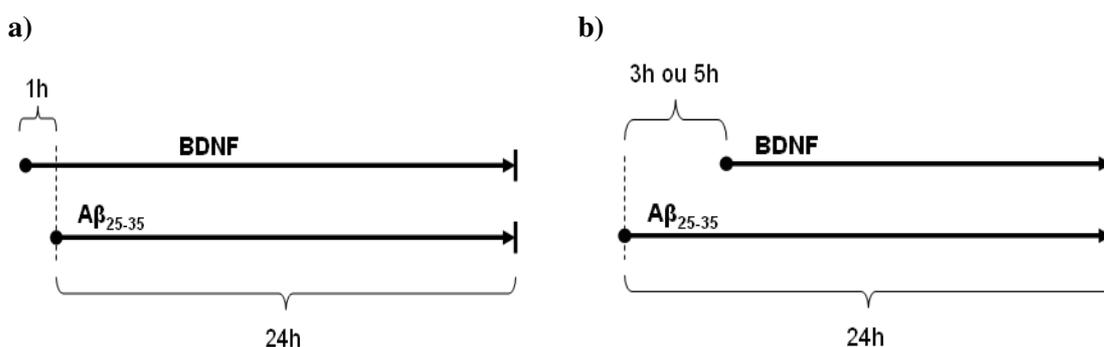


Figura 16 – Diagrama exemplificativo do plano de incubações. a) Administração de BDNF (20ng/ml) 1 hora antes de A β ₂₅₋₃₅ (25 μ M). b) Administração de BDNF 3 ou 5 horas após A β ₂₅₋₃₅. Para todos os casos, o péptido A β esteve presente nas culturas durante um período total de 24 horas. Após este tempo, terminou-se a experiência e lisaram-se as células.

Os resultados obtidos em culturas com 4 DIV mostram que, como esperado, a aplicação de BDNF (20ng/ml) na ausência de péptido A β , não influenciou os valores de actividade enzimática da caspase-3 comparativamente com o controlo (n=4, Figura 17.a)

Na presença de péptido A β ₂₅₋₃₅ (25 μ M), o BDNF (20ng/ml) reduz significativamente a actividade da caspase-3 quando aplicado em simultâneo (25 \pm 7%) ou 3 ou 5 horas após o péptido A β (24 \pm 9% e 24 \pm 7%, respectivamente) (n=4, p<0,05, Figura 17.b).

Quando o BDNF é adicionado 1 hora antes do péptido A β , não se observa um efeito protector, pelo que não há diminuição na actividade da caspase-3 quando comparado com o péptido A β (n=4, Figura 17.b). Deste modo, optou-se sempre por administrar o BDNF cerca de 3 horas após a aplicação do péptido A β , tal como anteriormente descrito (Arancibia *et al.*, 2008).

A observação de que o BDNF protege as células contra a toxicidade mediada pelo péptido $A\beta$ não é nova, contudo, ao contrário do trabalho de Arancibia *et al.*, 2008 onde foi utilizado ensaios de viabilidade celular, no presente trabalho foram utilizados ensaios específicos para a detecção de apoptose (níveis e actividade da caspase-3). Deste modo é possível complementar os resultados previamente publicados e, concluir que o BDNF diminui a apoptose induzida pelo péptido $A\beta$. A observação de que não ocorre efeito protector do BDNF quando este é adicionado antes do péptido $A\beta$, é um resultado novo e de certo modo inesperado.

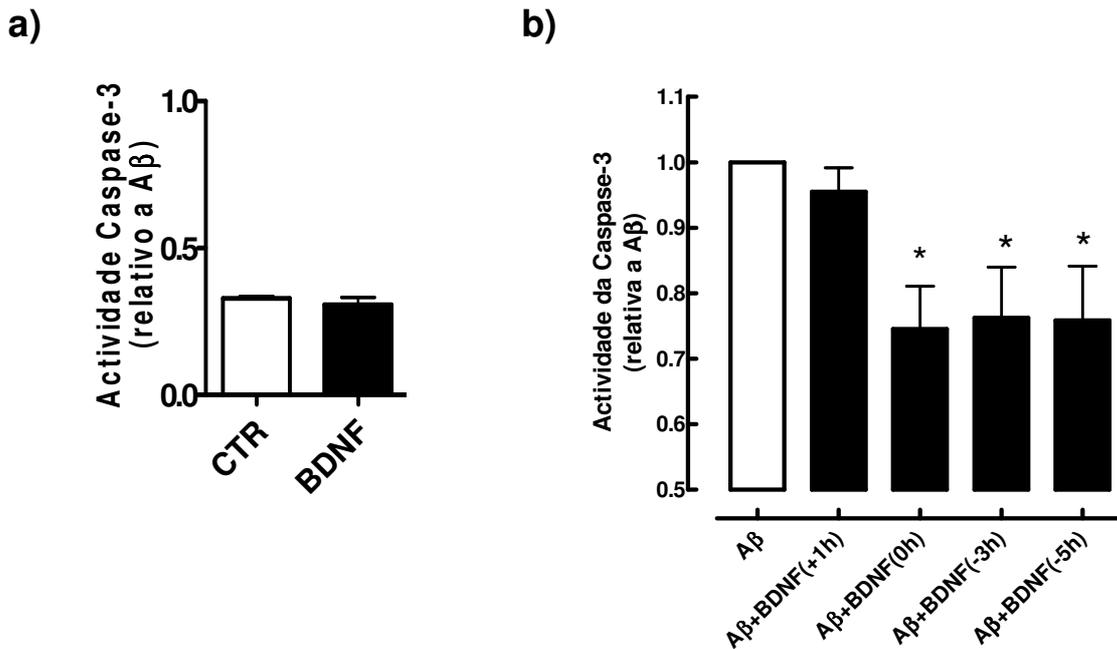


Figura 17 – Efeito do BDNF (20ng/ml), na actividade da caspase-3 induzida pelo péptido $A\beta$ (25 μ M), para diferentes tempos de incubação, em culturas 4 DIV. a) Resultados obtidos através do ensaio de actividade enzimática para o controlo e BDNF na ausência de péptido $A\beta$. **b)** Resultados obtidos através do ensaio de actividade enzimática da caspase-3 na presença de péptido $A\beta$. Legenda: (+1h) - BDNF incubado 1h antes do péptido $A\beta$; (0h) – BDNF incubado simultaneamente com o péptido $A\beta$; (-3h), (-5h) – BDNF incubado 3horas ou 5horas após o péptido $A\beta$, respectivamente. * $p < 0,05$ em comparação com $A\beta$ (ANOVA com correcção de *Dunnnett*, $n=4$).

4.2.1. Efeito protector do BDNF em culturas com 4 DIV.

Resultados:

No subcapítulo anterior mostrou-se que o BDNF diminui a activação da caspase-3 induzida pelo péptido A β e que este efeito apenas se observa quando o BDNF é administrado em simultâneo ou após a incubação com o péptido A β pelo que se optou continuar o estudo adicionando o factor neurotrófico 3 horas após a administração do péptido A β . Assim, utilizando culturas de neurónios com 4 dias *in-vitro* (4 DIV), observou-se que o BDNF (20ng/ml) reduz a formação de caspase-3 induzida pelo péptido A β_{25-35} (25 μ M) em 31 \pm 8% (n=7, p<0,001, Figura 18.a,b) bem como a sua actividade enzimática em 21 \pm 4% (n=7, p<0,001, Figura 18.c).

4 DIV

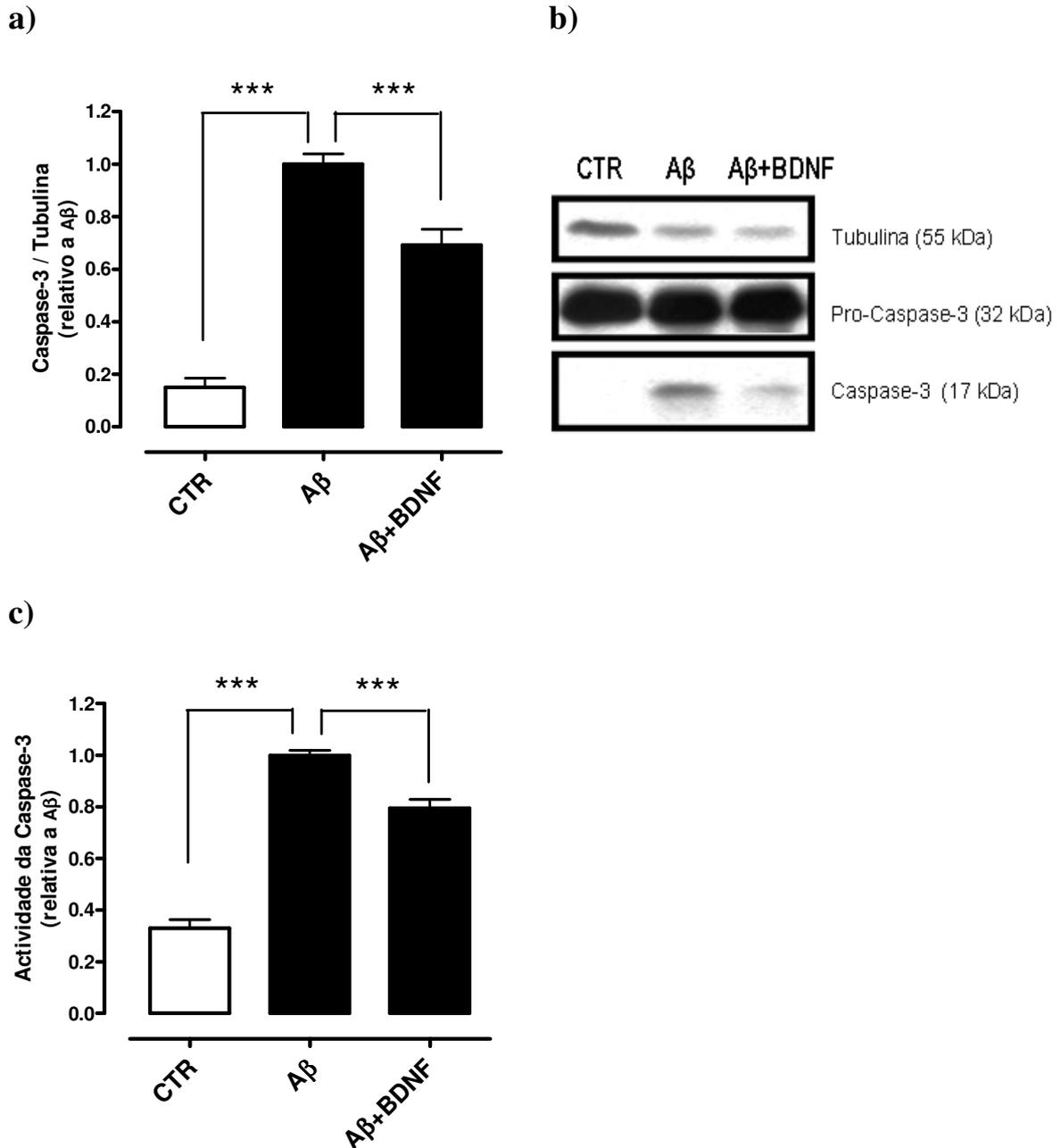


Figura 18 – Efeito do BDNF (20ng/ml) na formação e actividade da caspase-3 induzida pelo péptido $A\beta$ (25 μ M), em culturas 4DIV. a) Resultados da quantificação dos níveis da caspase-3, obtidos por *western-blotting* b) Figura de um *western-blot* representativo usado para a quantificação dos níveis da caspase-3. c) Resultados da actividade enzimática da caspase-3 obtidos pelo ensaio espectrofotométrico. *** $p < 0,001$ (ANOVA com correcção de *Dunnnett*, $n=7$). O BDNF foi adicionado 3 horas após o péptido $A\beta$.

4.2.2. Efeito protector do BDNF em culturas com 10 DIV.

Resultados:

Como referido na introdução desta dissertação, o BDNF exerce os seus efeitos neuroprotectores através do seu receptor TrkB-FL. Encontra-se descrito que os níveis de mRNA que codificam para este receptor atingem um valor máximo em culturas primárias de neurónios durante o período 8 a 10 DIV (Arancibia *et al.*, 2008). De facto, resultados obtidos por *western-blotting* mostram que ocorre um aumento de $48 \pm 12\%$ nas densidades das bandas do receptor TrkB-FL em culturas com 10 DIV comparando com as de 4 DIV ($n=3$, $p<0,05$, Figura 19). Devido a este aumento nos níveis de TrkB-FL, testou-se o efeito do BDNF na morte celular em culturas com 10 DIV.

Em culturas 10 DIV, observou-se um aumento significativo no efeito protector do BDNF (20ng/ml) na toxicidade do péptido $A\beta_{25-35}$ (25 μ M) comparando com culturas 4 DIV ($n=4$, $*p<0,05$, *t-test*). Assim, em culturas 10 DIV, o BDNF reduziu em $41 \pm 8\%$ a formação de caspase-3 avaliada por *western-blotting* ($n=4$, $p<0,01$, Figura 20.a,b) e diminuiu a actividade enzimática da mesma caspase em $39 \pm 7\%$ ($n=4$, $p<0,001$, Figura 20.c), quando comparado ao péptido $A\beta$.

A observação de que o efeito protector do BDNF, contra a apoptose induzida pelo péptido $A\beta$, é maior em culturas com 10 DIV, do que em 4 DIV, é um resultado novo e poderá ser devido a um aumento do número de receptores TrkB presentes nas culturas mais maduras, com 10 DIV.

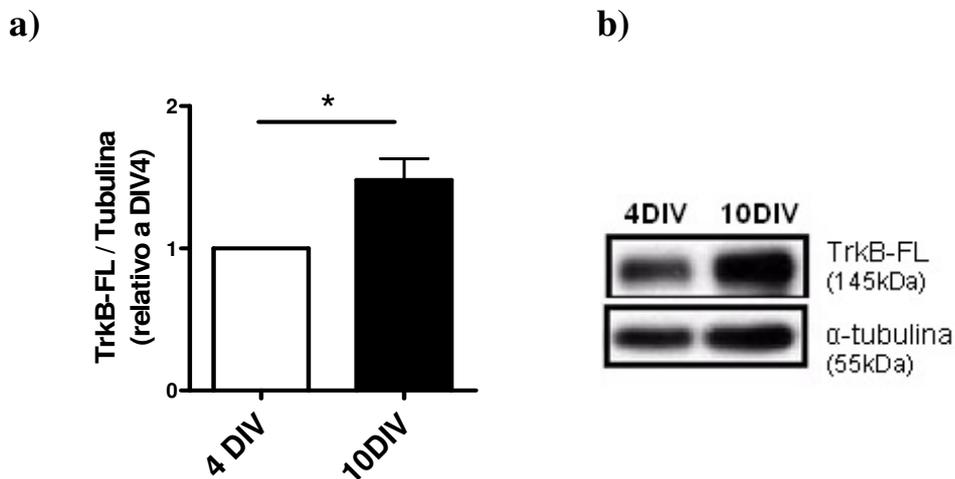


Figura 19 – Níveis do receptor TrkB-FL para culturas com 4DIV e 10DIV. a) Resultados da quantificação das bandas obtidas para o TrkB-FL para 4 DIV e 10 DIV, obtidos por *western-blotting*. **b)** Figura de um *western-blot* representativo usado para a quantificação dos níveis de TrkB-FL. $*p<0,05$, (*t-test*, $n=3$)

10 DIV

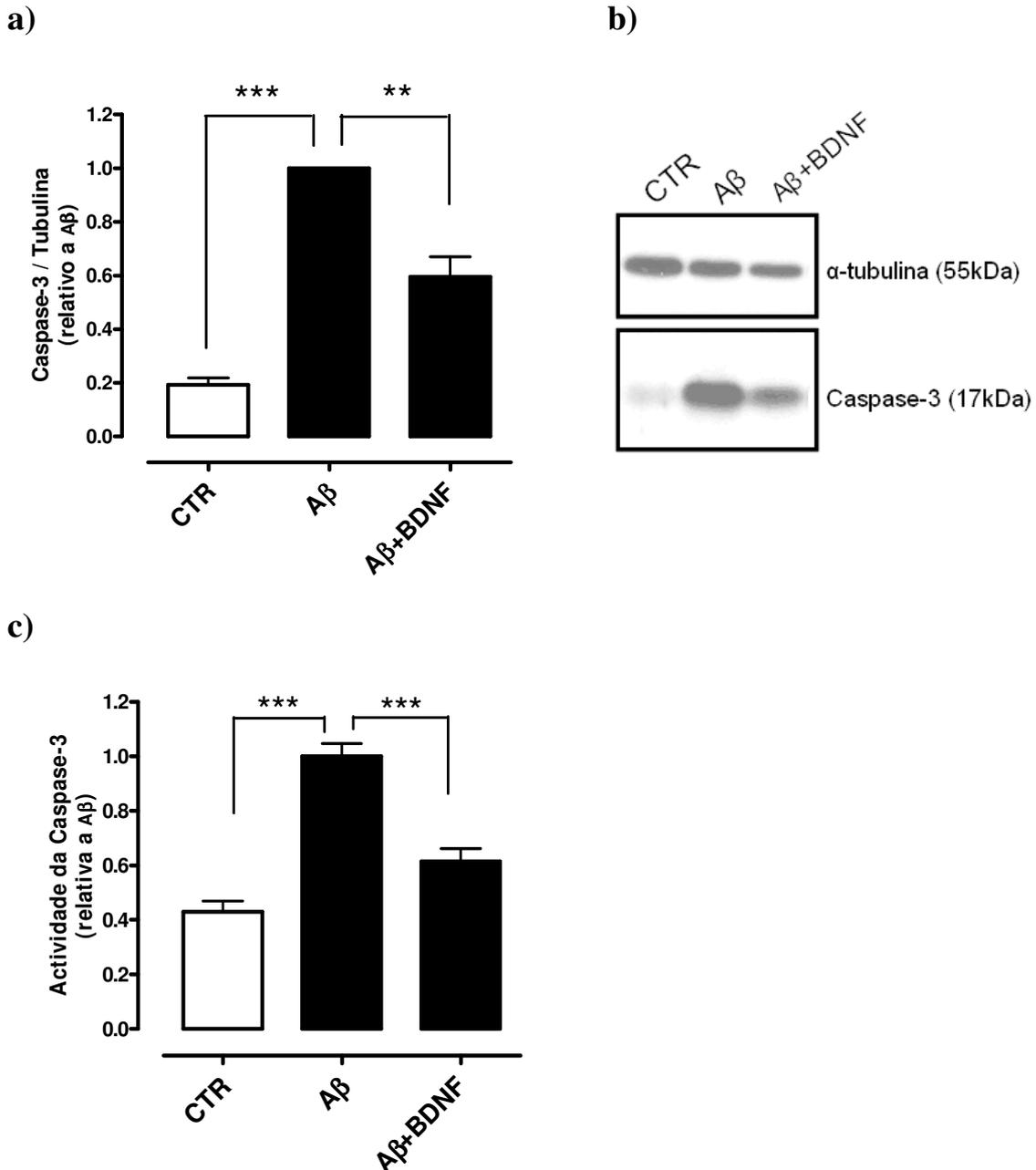


Figura 20 – Efeito do BDNF(20ng/ml) na formação e actividade da caspase-3 induzida pelo péptido A β (25 μ M), em culturas 10 DIV. a) Resultados da quantificação dos níveis da caspase-3, obtidos por *western-blotting*. b) Figura de um *western-blot* representativo usado para a quantificação dos níveis da caspase-3. c) Resultados da actividade enzimática da caspase-3 obtidos pelo ensaio espectrofotométrico. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ (ANOVA com correcção de *Dunnett*, $n=4$). O BDNF foi adicionado 3 horas após o péptido A β .

4.2.3. Discussão:

Os resultados obtidos sugerem que o BDNF diminui a morte celular por apoptose nos neurónios em cultura quando adicionado após o péptido A β e que esse efeito protector é superior em culturas com 10 DIV do que em culturas 4 DIV.

Para avaliar qual o melhor momento para adicionar o BDNF aos neurónios em cultura, fizeram-se alguns ensaios preliminares nos quais se verificou que, o BDNF, apenas tem efeito neuroprotector quando administrado em simultâneo ou após a incubação das células com o agente tóxico. A ausência de efeito neuroprotector do BDNF quando aplicado 1 hora antes do péptido A β pode ser devida a inúmeros factores: 1) tempo de semi-vida pequeno do BDNF no meio de cultura, o qual se pode ter degradado antes da aplicação do péptido A β , não exercendo por isso qualquer efeito neuroprotector; 2) diferente janela temporal entre a activação das vias de sinalização de sobrevivência mediadas pelo BDNF e as vias de sinalização de morte mediadas pelo péptido A β . É sabido que a exposição ao BDNF induz uma activação robusta na proteína Akt, a qual inibe várias proteínas desencadeadoras ou necessárias ao processo de apoptose, denominadas de pró-apoptóticas (Crowder *et al.*, 1998; Datta *et al.*, 1997). Porém, a activação de Akt, induzida pelo BDNF, é transitória, ou seja, os níveis de Akt fosforilada diminuem rapidamente até atingirem o valor basal. Em linhas celulares de neuroblastoma (SH-SY5Y) os níveis de Akt fosforilada atingem o valor máximo 5 minutos após a administração de BDNF (50ng/ml), e ao fim de 1 hora os níveis regressam aos valores basais (Mai *et al.*, 2002). Apesar de a Akt promover sobrevivência através de alterações em outras proteínas a jusante, também inibe a activação da via JNK (Kim *et al.*, 2001), via que se sabe desempenhar um papel central na toxicidade mediada pelo péptido A β . As cinases JNK são activadas após a exposição ao A β , mas de uma forma mais lenta (demorando mais de 1 hora a atingir um valor máximo) (Morishima *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2009). Assim, uma possível falta de interacção temporal entre ambas as vias (Akt e JNK), poderá ser uma das razões para que não se observe efeito protector do BDNF quando este é adicionado 1 hora antes do péptido A β . Em experiências futuras será de todo o interesse testar mais tempos de incubação a fim de estudar com mais rigor a janela temporal na qual o BDNF pode exercer o seu efeito protector.

O BDNF já era conhecido como sendo detentor de efeito neuroprotector em diversos tipos de insultos neuronais, incluindo traumáticos, isquémicos e epilépticos (Lindvall *et al.*, 1994). Assim, a protecção conferida pelo BDNF agora observada na toxicidade induzida pelo péptido A β era, de certa forma, um resultado esperado. Porém, a protecção pelo BDNF no modelo de toxicidade induzida pelo A β não foi um assunto muito explorado no passado. Mais recentemente, em 2008, foi publicado um trabalho onde se mostra que o BDNF protege da toxicidade induzida pelos péptidos A β ₁₋₄₂ e A β ₁₋₂₅, quer *in-vitro*, quer *in-vivo* (Arancibia *et. al*, 2008). Contudo, os autores apenas utilizaram ensaios de viabilidade celular, tais como o ensaio de MTT, pelo que não

é possível diferenciar o tipo de morte celular envolvido. Assim, os resultados descritos nesta dissertação permitem concluir que o BDNF protege da morte celular por apoptose induzida pelo péptido A β *in-vitro*, uma vez que se utilizaram ensaios específicos para a detecção de apoptose, em particular, a avaliação da caspase-3.

No presente estudo, observou-se também que o efeito protector do BDNF varia com a maturação das culturas de neurónios. Assim, em culturas com 10 DIV a protecção pelo BDNF foi superior do que a observada em neurónios com 4 DIV. O aumento do efeito protector do BDNF em culturas com 10 DIV poderá estar relacionado com o aumento nos níveis do receptor TrkB-FL, observado nestas culturas. Este resultado está de acordo com outros estudos nos quais os autores observaram um pico máximo do mRNA que codifica para o TrkB em culturas neuronais com 8 DIV (Arancibia *et al.*, 2008). Assim, será de todo o interessante no futuro, comparar a eficiência do BDNF na activação das vias de sinalização de sobrevivência entre as duas culturas (4 e 10 DIV), de forma a avaliar se a presença mais significativa de TrkB-FL em culturas com 10 DIV se traduz numa maior activação nas vias de sobrevivência mediadas pelo BDNF.

Contudo, existem muitas outras diferenças entre as culturas mais jovens com 4 DIV e as culturas com 10 DIV, tais como, outras alterações moleculares, alterações na arquitectura celular (desenvolvimento dos axónios e dendrites) e ainda modificações na percentagem de células gliais. Em particular, é durante o período em que os neurónios têm 7 a 9 DIV que apresentam o pico máximo de sinaptogénese (formação de sinapses) (Fletcher *et al.*, 1991). Por outro lado, mesmo usando o suplemento B-27 que deveria enriquecer as culturas em neurónios minimizando o crescimento das células da glia (Brewer *et al.*, 1993), verificou-se que as células da glia se encontram em grande percentagem nas culturas com 10 DIV (cerca de 50%, ver Figura 33 em anexo). Estas alterações nas populações de células também poderão contribuir para as diferenças nos resultados obtidos entre ambas as culturas.

4.3. Influência dos receptores A_{2A} da adenosina no efeito neuroprotector do BDNF.

4.3.1. Papel de $A_{2A}R$ na protecção do BDNF em culturas com 4DIV

Resultados:

Para avaliar a influência dos receptores A_{2A} da adenosina no efeito neuroprotector do BDNF, as culturas com 4 DIV foram incubados com BDNF (20ng/ml) na presença e na ausência do agonista (CGS-21680, 10nM) e do antagonista (SCH-58261, 100nM) dos receptores A_{2A} da adenosina. Sempre que se utilizou uma combinação destes fármacos, adicionaram-se ambos simultaneamente.

De forma a avaliar se os fármacos e respectivo veículo (DMSO) teriam algum efeito na morte celular por si próprios, avaliou-se quer a formação de caspase-3 quer a sua actividade quando adicionados às células na ausência do péptido $A\beta_{25-35}$. Como esperado, nenhum dos fármacos isoladamente ou em associação com outros, aumentou a formação ou a actividade enzimática da caspase-3, quando comparando com o controlo (n=3, Figura 21.a). O mesmo resultado foi observado quando as células foram incubadas com o dimetilsulfóxido (DMSO), solvente usado para a preparação dos fármacos utilizados. O seu efeito foi avaliado quando adicionado às culturas neuronais na concentração mais alta utilizada durante as seguintes experiências (0,002% v/v) (n=3, Figura 21).

Como referido anteriormente, há evidências que os efeitos rápidos do BDNF na transmissão e plasticidade sináptica sejam dependentes e/ou facilitados pela activação dos receptores A_{2A} da adenosina (revisto em Sebastião e Ribeiro, 2009). Assim, um dos objectivos desta dissertação foi avaliar se o efeito protector do BDNF na apoptose induzida pelo péptido $A\beta_{25-35}$ era também mediado ou facilitado pela activação dos receptores A_{2A} .

Inicialmente, avaliou-se a influência do receptor A_{2A} na apoptose induzida pelo péptido $A\beta$. Activando o receptor A_{2A} através do agonista CGS-21680 (10nM), na presença do péptido $A\beta_{25-35}$ (25 μ M), não se observam diferenças significativas nos níveis ou na actividade da caspase-3, quando comparando com o péptido $A\beta$ apenas (n=5-6, Figura 22). O bloqueio do receptor A_{2A} através do antagonista SCH-58261 (100nM) ou do SHC-442,416 (100nM), na presença de péptido $A\beta_{25-35}$ (25 μ M), também não alterou significativamente a actividade da caspase-3, comparando com o péptido $A\beta$ (n=4, Figura 23 e n=2, Figura 24, respectivamente)

Deste modo conclui-se que o receptor A_{2A} , por si só, não influencia a morte celular pelo péptido $A\beta$.

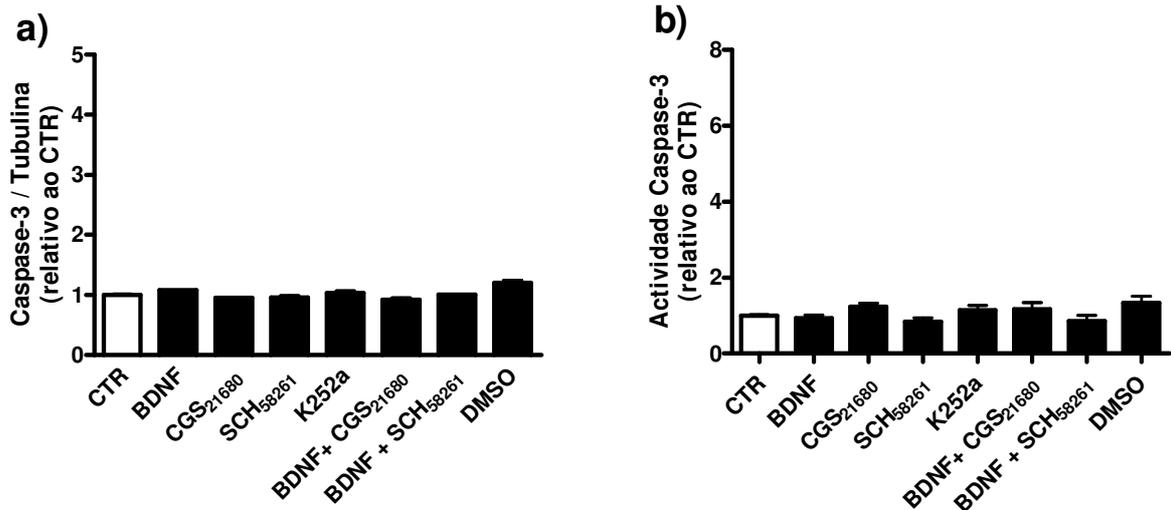


Figura 21 – Os ligandos do A_{2A}R e os ligandos do TrkB não induzem apoptose na ausência de péptido A β , em culturas 4 DIV. a) Resultados da quantificação dos níveis da caspase-3, obtidos por *western-blotting*. b) Resultados obtidos pelo ensaio da actividade enzimática da caspase-3. BDNF (20ng/ml); CGS-21680 (10nM); SCH-58261 (100nM); K252a (200nM); DMSO (0,002% v/v). $p > 0,05$ (ANOVA com correcção de *Dunnnett*, $n=3$) comparado com o controlo (CTR).

Contudo, relativamente ao efeito do receptor A_{2A} na protecção mediada pelo BDNF, os resultados obtidos indicam que a activação do receptor A_{2A}, através da adição de CGS-21680, bloqueia por completo o efeito protector do BDNF na apoptose induzida pelo péptido A β ($p < 0,001$, $n=5-6$, Figura 22). Assim, ao incubar o CGS-21680 (10nM), em simultâneo com o BDNF (20ng/ml), 3 horas após da adição do péptido A β_{25-35} (25 μ M), não se detectam alterações significativas quer nos níveis de caspase-3 ($n=5$, Figura 22.a,b) quer na sua actividade enzimática ($n=6$, Figura 22.c), comparando com o péptido A β apenas.

Em ensaios preliminares, onde apenas se avaliou a actividade da caspase-3, verificou-se que o antagonista do receptor A_{2A}, SCH-58261 (100nM), não alterou significativamente o efeito protector do BDNF (20ng/ml) na toxicidade induzida pelo péptido A β_{25-35} (25 μ M) ($n=4$, Figura 23, $p > 0,05$). Durante estes ensaios preliminares, utilizou-se ainda outro antagonista dos receptores A_{2A}, o SCH-442,416, o qual possui uma maior selectividade e afinidade para o receptor A_{2A} do que o antagonista SCH-58261 (Toddle *et al.*, 2000). A aquisição recente deste fármaco apenas permitiu realizar duas experiências independentes até ao momento ($n=2$). Contudo, este composto também não aparenta alterar o efeito protector do BDNF na toxicidade induzida pelo péptido A β ($n=2$, Figura 24). Futuramente será necessário repetir as experiências com este antagonista mais selectivo.

Deste modo, observou-se pela primeira vez, que a activação dos receptores A_{2A} não altera a toxicidade induzida pelo péptido A β , mas bloqueia o efeito protector do BDNF contra essa toxicidade, em culturas primárias de neurónios com 4 DIV.

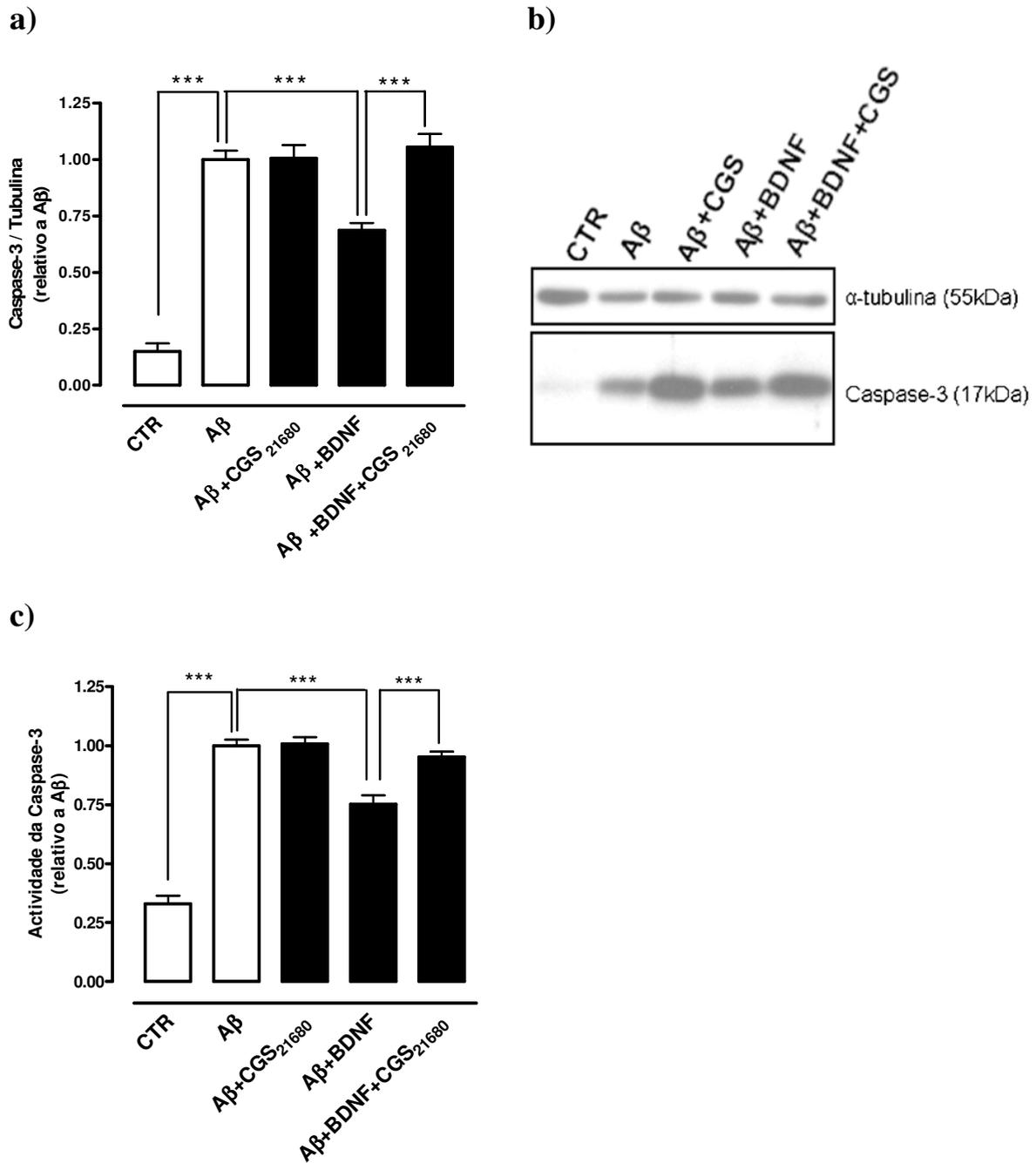


Figura 22 – Influência da activação do receptor A_{2A} no efeito protector do BDNF em culturas 4DIV. a) Gráfico com os resultados obtidos para os níveis da caspase-3 obtidos por *western-blotting* (n=5). b) Figura de um *western-blot* representativo usado para a quantificação dos níveis da caspase-3 c) Gráfico com os resultados da actividade enzimática da caspase-3, obtidos pelo ensaio espectrofotométrico (n=6). Aβ(25μM); BDNF (20ng/ml); CGS-21680 (10nM). ***p<0,001 (ANOVA com correcção de *Bonferroni*).

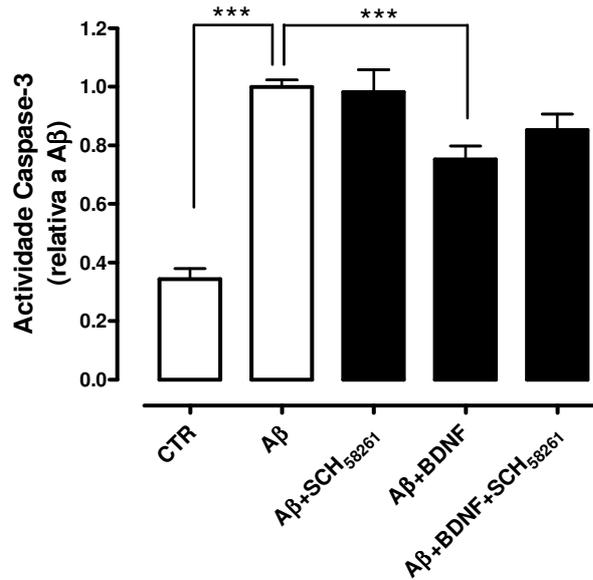


Figura 23 - Influência do bloqueio do receptor A_{2A} no efeito protector do BDNF em culturas 4DIV. Gráfico com os resultados obtidos para a actividade enzimática da caspase-3, obtidos pelo ensaio espectrofotométrico. A β (25 μ M); BDNF (20ng/ml); SCH-58261 (100nM). ***p<0,001 (ANOVA com correcção de *Bonferroni* n=4).

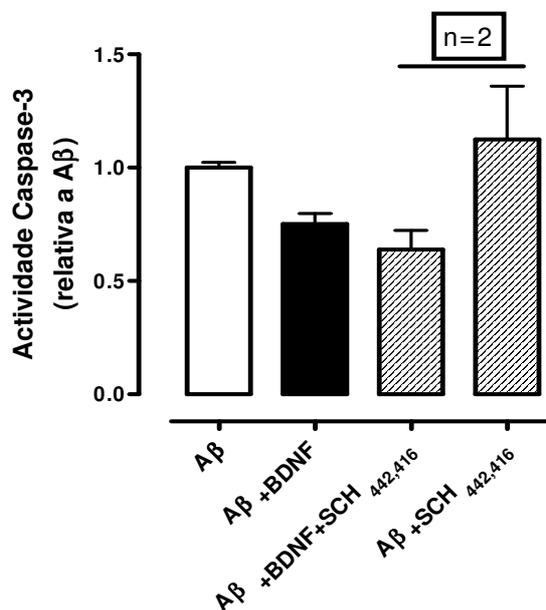


Figura 24 – Efeito do bloqueio do receptor A_{2A} com o novo antagonista SCH442,416 (100nM), em culturas 4 DIV. Gráfico com os resultados da actividade enzimática da caspase-3, obtidos pelo ensaio espectrofotométrico. O antagonista SCH442,416 é um antagonista com maior selectividade e afinidade para o receptor A_{2A} do que o antagonista SCH-58261. Porém o SCH442,416 foi adquirido recentemente, pelo que apenas se efectuou apenas 2 experiências independentes (n=2). A β (25 μ M); BDNF (20ng/ml).

4.3.2. Papel do receptor A_{2A} na protecção do BDNF em culturas com 10DIV

Resultados:

Anteriormente observou-se que o BDNF protege contra a apoptose induzida pelo péptido $A\beta$ e que essa protecção é superior em culturas com 10 DIV, provavelmente devido a um aumento dos níveis de expressão do receptor TrkB-FL. Observou-se ainda que, em culturas com 4 DIV, a activação do receptor A_{2A} da adenosina bloqueia o efeito protector do BDNF. Perante isto, surgiu a necessidade de saber se a activação dos receptores A_{2A} também bloqueava o efeito protector do BDNF em culturas com 10 DIV.

Para responder a esta questão, repetiram-se os procedimentos anteriores, mas utilizando culturas de neurónios com 10 dias em cultura.

Em primeiro lugar, avaliou-se o efeito do receptor A_{2A} na apoptose induzida pelo péptido $A\beta$, em culturas 10 DIV. A activação do receptor A_{2A} através da administração do agonista CGS-21680 (10nM), na presença de péptido $A\beta$ (25 μ M), não alterou significativamente os níveis ou a actividade da caspase-3, comparando com o péptido $A\beta$ apenas (n=4, Figura 25). Bloqueando o receptor A_{2A} através do antagonista SCH-58261 (100nM) também não se observou alterações significativas nos níveis ou na actividade da caspase-3 (n=3, Figura 26). Assim, é possível concluir que o receptor A_{2A} não influencia a toxicidade do péptido $A\beta$ em culturas 10 DIV.

Relativamente ao efeito do receptor A_{2A} na protecção mediada pelo BDNF, ao contrário das observações em culturas com 4 DIV, nas culturas mais maduras, com 10 DIV, a activação do receptor A_{2A} pelo CGS-21680 (10nM) não bloqueou o efeito protector do BDNF na toxicidade do péptido $A\beta_{25-35}$ (25 μ M). Deste modo, a protecção conferida quer pelo BDNF (20ng/ml), quer pelo BDNF (20ng/ml) na presença de CGS-21680 (10nM) foi igual, isto é, em ambas as condições houve uma diminuição de cerca de 40% na actividade e nos níveis da caspase-3, comparativamente com o péptido $A\beta$ sozinho (n=4, p<0,01, Figura 25).

Verificou-se ainda que o antagonista dos receptores A_{2A} , SCH-58261 (100nM), em culturas com 10 DIV, também não altera significativamente o efeito protector do BDNF (20ng/ml) na toxicidade induzida pelo péptido $A\beta$ (n=3, Figura 26).

Com base nestas observações conclui-se, pela primeira vez, que em culturas com 10 DIV, o receptor A_{2A} da adenosina não altera a toxicidade do péptido $A\beta$ (à semelhança de 4 DIV), nem influencia o efeito protector do BDNF nessa mesma toxicidade (ao contrário de 4 DIV).

10 DIV – Activação do receptor A_{2A}

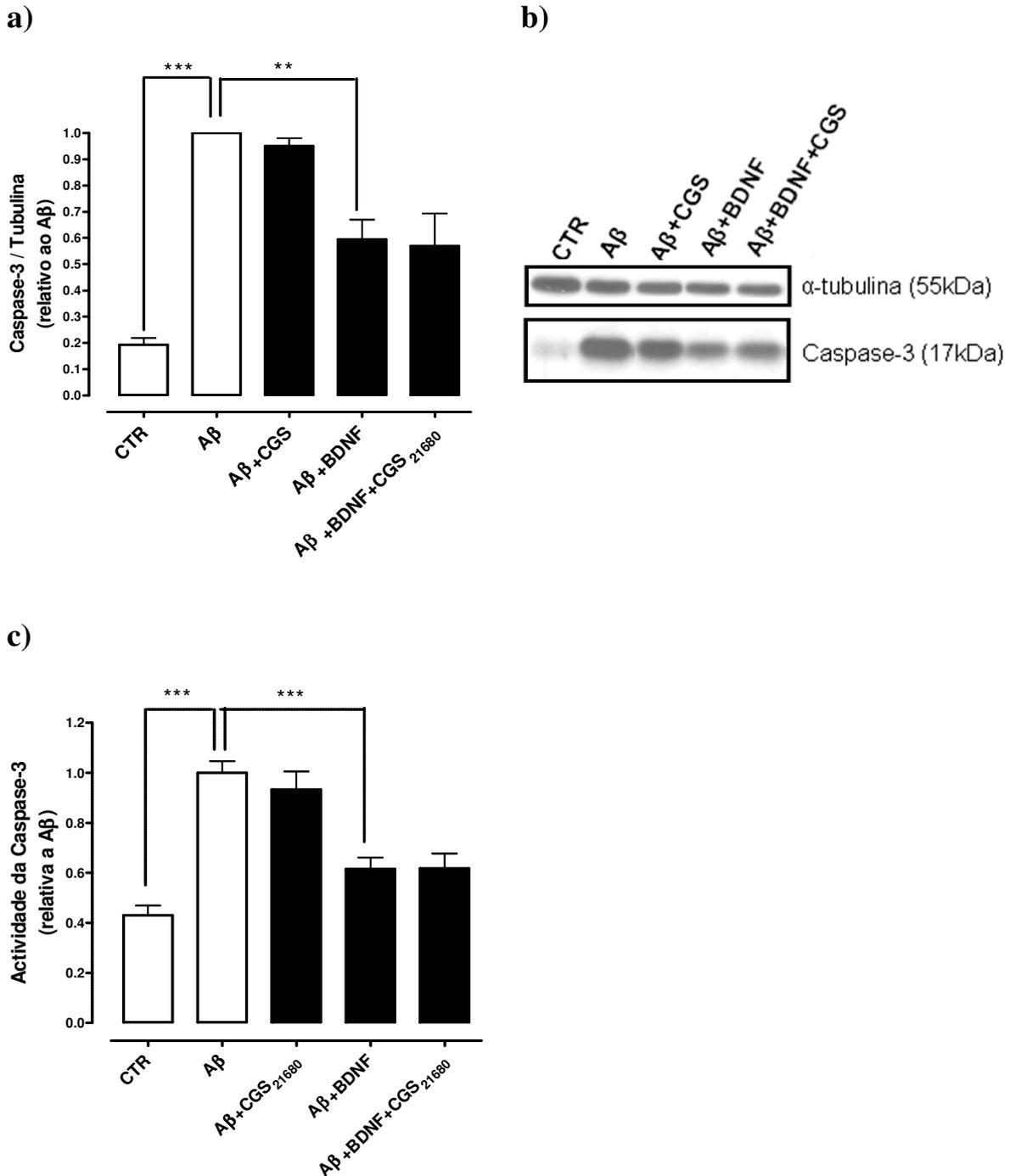


Figura 25 – Activação do receptor A_{2A} não altera efeito protector do BDNF, em culturas 10DIV. a) Gráfico com os resultados obtidos para os níveis da caspase-3 através de *western-blotting*. b) Figura de um *western-blot* representativo usado para a quantificação dos níveis da caspase-3. c) Gráfico com os resultados da actividade enzimática da caspase-3, obtidos pelo ensaio espectrofotométrico. A β (25 μ M); BDNF (20ng/ml); CGS-21680 (10nM).***p<0,001, **p<0,01 (n=4, ANOVA com correcção de Bonferroni).

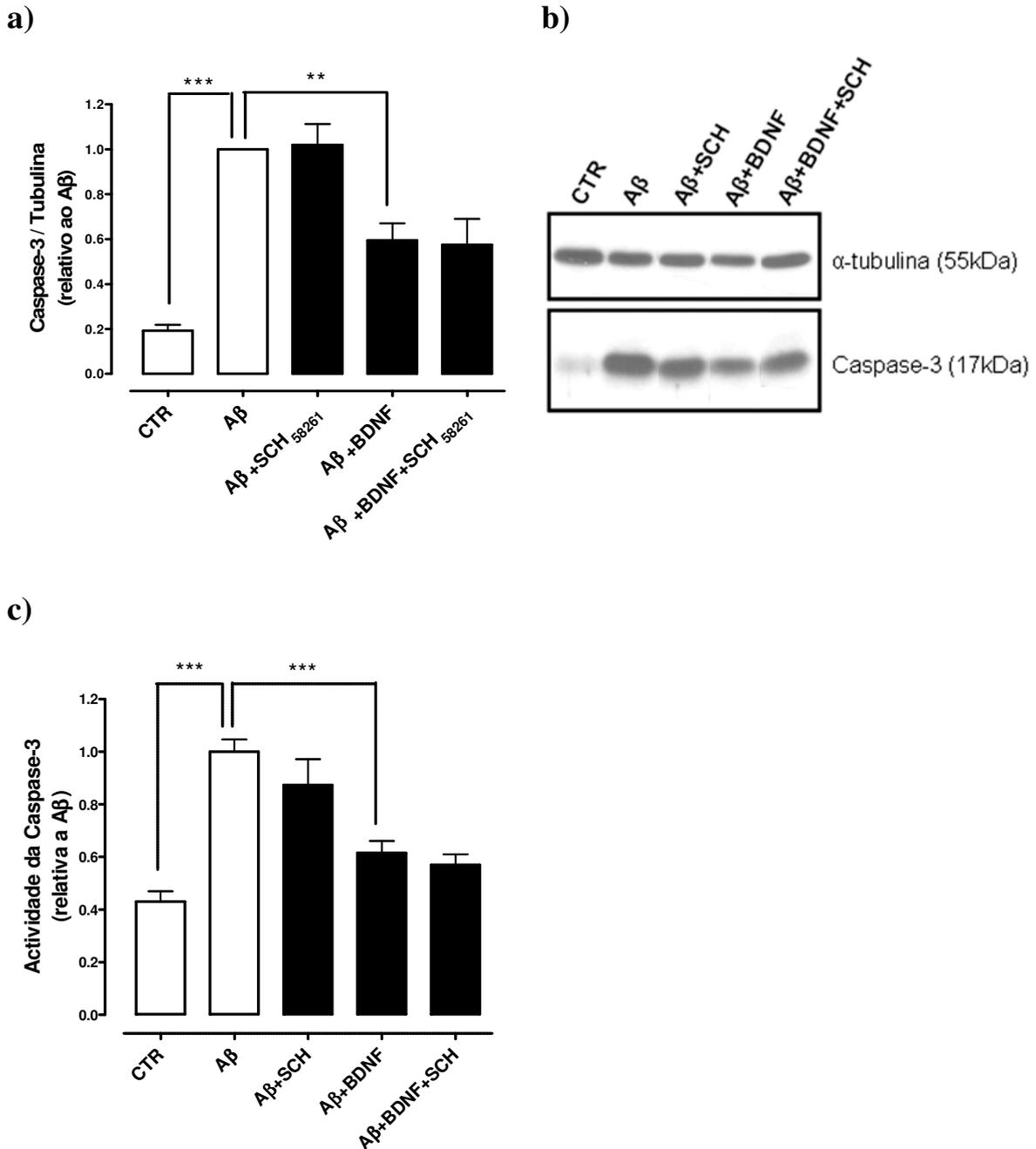
10 DIV – Bloqueio do receptor A_{2A} 

Figura 26 – Bloqueio do receptor A_{2A} não influencia o efeito protector do BDNF, em culturas 10DIV. **a)** Gráfico com os resultados obtidos para os níveis da caspase-3 através de *western-blotting*. **b)** Figura de um *western-blot* representativo usado para a quantificação dos níveis da caspase-3 **c)** Gráfico com os resultados da actividade enzimática da caspase-3, obtidos pelo ensaio espectrofotométrico. Aβ(25μM); BDNF (20ng/ml); SCH-58261 (100nM). ***p<0,001, **p<0,01 (n=3, ANOVA com correcção de *Bonferroni*).

4.3.3 Discussão:

Os resultados obtidos neste capítulo indicam que a activação do receptor A_{2A} da adenosina, pelo agonista CGS-21680, não influencia a apoptose induzida pelo péptido A β em culturas com 10 DIV. Contudo, em culturas com 4 DIV, a activação deste receptor bloqueia o efeito neuroprotector do BDNF.

Como referido anteriormente, existem evidências de que a adenosina interage com as neurotrofinas podendo modular as suas funções. Em particular, sabe-se que a activação do receptor A_{2A} da adenosina activa o receptor TrkB na ausência de BDNF, por um mecanismo de trans-activação ainda não completamente esclarecido (Lee e Chao, 2001; Rajagopal *et al.*, 2004).

Por outro lado, do ponto de vista funcional, é conhecido que, a activação do receptor A_{2A} é um pré-requisito essencial para os efeitos excitatórios do BDNF na transmissão sináptica (Diógenes *et al.*, 2004, 2007; Tebano *et al.*, 2008). Apesar de, neste último caso, se tratar de uma dependência e não de uma trans-activação, é mais uma evidência da interacção entre o BDNF e a adenosina, em particular nos efeitos rápidos mediados pelo BDNF. Com base nestas observações, e tendo presente a possível utilidade terapêutica, o objectivo principal deste trabalho foi investigar se numa situação de morte neuronal (induzida pelo péptido A β) os efeitos protectores do BDNF (efeitos tróficos) eram dependentes ou potenciados pela activação dos receptores A_{2A}.

Os resultados obtidos nas culturas com 4 DIV ou com 10 DIV indicam que a administração quer do agonista (CGS-21680), quer do antagonista (SCH-58261) dos receptores A_{2A}, não produz qualquer efeito nos níveis de apoptose induzida pelo A β . Com base nestes resultados é possível concluir que, neste modelo de morte celular, a toxicidade do péptido A β não é influenciada pela activação ou bloqueio dos receptores A_{2A}. Todavia, em culturas com 4 DIV a activação do receptor A_{2A} bloqueou o efeito protector do BDNF na toxicidade induzida pelo péptido A β . Este efeito não se verificou em culturas com 10 DIV, nas quais a activação do receptor A_{2A} não alterou o efeito protector do BDNF.

Tendo em consideração que, o receptor A_{2A} pode activar o receptor TrkB (Lee e Chao, 2001), os resultados aqui obtidos diferem dos esperados, isto é, esperava-se que a activação do receptor A_{2A} da adenosina por si só protegesse os neurónios, ou que estimulasse o efeito protector do BDNF, na apoptose induzida pelo péptido A β . Contudo, é preciso não esquecer que o receptor A_{2A} tem uma sinalização própria e que a trans-activação do receptor TrkB não é o único efeito da mesma. Em particular, sabe-se que, os receptores acoplados à proteína G, nos quais se incluem o A_{2A}, podem activar as cinases JNK (Schulte e Fredholm, 2003). Num contexto diferente, está descrito que em ratinhos *knockout* para o gene A_{2A} ou em ratinhos normais onde se administrou o antagonista SCH-58261 *in-vivo*, há uma redução significativa nos níveis de JNK fosforilada (Ribé *et al.*, 2008). Como referido anteriormente, o péptido A β induz uma forte activação das cinases

JNK, as quais desempenham um papel importante na promoção de apoptose. É possível que um dos mecanismos em que o BDNF exerce o seu efeito protector seja através de uma inibição na activação destas cinases via PI3K-Akt (Kim *et al.*, 2001). Contudo, a activação do receptor A_{2A} poderá neste contexto reforçar a activação de JNK anulando assim o efeito protector do BDNF.

Visto que, em culturas com 10 DIV a activação deste receptor não bloqueou o efeito neuroprotector do BDNF, é possível que nestas culturas mais maduras o receptor A_{2A} seja expresso em menores quantidades do que em 4DIV, o que poderia explicar os resultados obtidos.

Contudo não é fácil de compreender o motivo pelo qual a activação dos receptores A_{2A} por si só, não aumenta os níveis de apoptose, quer na presença ou na ausência de péptido $A\beta$. Caso estes receptores activem as cinases JNK seria de esperar um aumento na apoptose aquando da administração do agonista dos receptores A_{2A} . A observação de que a activação do receptor A_{2A} , por si só, não aumenta a apoptose induzida pelo péptido $A\beta_{25-35}$ em ambas as culturas (4 e 10 DIV), poderá ser devida à concentração de péptido $A\beta$ utilizada ser demasiado tóxica ($25\mu\text{M}$) (Pike *et al.*, 1995), pelo que poderá haver uma saturação na activação das cinases JNK ou nas vias efectoras de morte celular. Sabendo que, a toxicidade do péptido $A\beta$ depende da dose, poder-se-ia testar esta hipótese utilizando uma concentração inferior e menos tóxica de péptido $A\beta$. Dado que não se conhecem quais os efeitos do BDNF e/ou da adenosina na activação das cinases JNK induzida pelo péptido $A\beta$, será interessante explorar futuramente esta questão e também será importante perceber qual o efeito da activação dos receptores A_{2A} nas vias de sobrevivência mediadas pelo BDNF (como na via PI3K/Akt) de modo a compreender melhor os mecanismos envolvidos no bloqueio do efeito protector do BDNF pelo receptor A_{2A} .

Para além do possível efeito nas vias de sinalização de morte, a adenosina através da activação do seu receptor A_{2A} participa ainda noutros processos, como por exemplo, na formação de células da glia reactivas (Brambilla *et al.*, 2003). Um dos efeitos do péptido $A\beta$ é precisamente a activação dessas células reactivas e a consequente formação de produtos tóxicos derivados do processo de inflamação (Casal *et al.*, 2002). Também é sabido que, em determinadas circunstâncias, a activação da glia parece ser atenuada pelo BDNF (Kiprianova *et al.*, 1999). Deste modo, e tendo em conta que as culturas de neurónios utilizadas neste trabalho apresentam células da glia (ver Anexos), é possível que a activação dessas células pelo péptido $A\beta$ possa ser estimulada pela activação do receptor A_{2A} e atenuada pelo BDNF, pelo que isto poderá explicar a reversão do efeito protector do BDNF em culturas 4 DIV quando activado o receptor A_{2A} . Assim, e de modo a avaliar a influência das células gliais nos resultados observados, será importante repetir estas experiências, na presença de um inibidor da proliferação celular, como por exemplo o 5-Fluororacil (5-FU). Este composto induz apoptose nas células em proliferação e é usado para enriquecer as culturas em neurónios, dado que estes são células pós-mitóticas e não proliferam ao contrário das células da glia.

Apesar dos resultados aqui descritos não mostrarem que a activação dos receptores A_{2A} potencia a acção neuroprotectora do BDNF, outros trabalhos já o demonstraram usando diferentes modelos de indução de morte. Em particular, em culturas primárias de neurónios de hipocampo, a activação do receptor A_{2A} promove sobrevivência aquando da ausência de suporte trófico (remoção do soro e de BDNF). Este efeito é dependente da actividade dos receptores A_{2A} e TrkB e também da actividade de Akt (Lee e Chao, 2001). Contudo, a remoção de suporte trófico ou a adição de compostos tóxicos, como o péptido A β são modelos diferentes de induzir morte celular. Nomeadamente, para a administração de determinados compostos tóxicos, sabe-se que tanto as vias de morte activadas, como as vias de sobrevivência necessárias para a protecção, são diferentes quando comparadas à situação de morte induzida pela remoção do suporte trófico (Anderson *et al.*, 1999).

Porém, existem algumas discrepâncias na literatura, e o bloqueio do receptor A_{2A} tem sido considerado por muitos grupos como neuroprotector em determinados insultos, uma vez que este está envolvido quer na activação excessiva das células da glia, quer na libertação do glutamato que é um neurotransmissor que em excesso induz morte neuronal por excitotoxicidade. Todavia, a potenciação do suporte trófico e o efeito anti-inflamatório resultante da activação do receptor A_{2A} podem contribuir para a neuroprotecção. Deste modo, o bloqueio do receptor A_{2A} tanto pode resultar num efeito pro-tóxico como num efeito protector, dependendo da situação experimental em concreto (Popoli *et al.*, 2007; Stone *et al.*, 2009; Ribeiro *et al.*, 2003).

Esta dualidade de efeitos por parte do receptor A_{2A} poderá estar na base das discrepâncias observadas na literatura, onde se observa que tanto a activação como o bloqueio deste receptor podem fornecer protecção em diferentes contextos experimentais (Fredholm *et al.*, 2005)

4.4. Alterações das densidades do receptor TrkB induzidas pelo péptido A β ₂₅₋₃₅.

Durante os estudos relativos à apoptose houve a preocupação de analisar possíveis alterações nos níveis dos receptores A_{2A} e TrkB, de modo a explorar razões e mecanismos que contribuíssem para os resultados obtidos. Contudo, dificuldades técnicas inerentes à detecção do receptor A_{2A} impossibilitaram a sua quantificação durante o presente trabalho. No entanto, foi possível detectar e quantificar o receptor TrkB através da técnica de *western-blotting*. Os resultados indicam que o péptido A β ₂₅₋₃₅ altera as densidades das diferentes isoformas do receptor TrkB. Estas observações serão apresentadas e discutidas no presente capítulo, utilizando sempre culturas de neurónios com 4 DIV. Contudo, em experiências piloto com culturas 10 DIV observou-se um padrão nos resultados semelhante aos obtidos para 4 DIV.

4.4.1. O péptido A β ₂₅₋₃₅ diminui a densidade do receptor TrkB-FL e aumenta a densidade do TrkB-Tc.

Resultados:

Devido a um mecanismo de *splicing* alternativo o gene para o receptor TrkB pode codificar para duas proteínas distintas: a isoforma truncada do receptor (TrkB-Tc), e a isoforma completa (TrkB-FL). A isoforma truncada é semelhante à isoforma completa no seu domínio extracelular, mas não possui o domínio de sinalização intracelular responsável por grande parte dos efeitos associados às neurotrofinas. Estas diferenças estruturais conferem massas moleculares distintas às diferentes isoformas, o que possibilita a sua distinção por *western-blotting*. A isoforma TrkB-FL tem um peso molecular de 145 kDa e a isoforma TrkB-Tc de 95 kDa (Figura 27.c).

Usando culturas de neurónios com 4 DIV, é possível observar que a administração do péptido A β ₂₅₋₃₅ (25 μ M), durante 24 horas, diminui a densidade do receptor TrkB-FL em 40 \pm 6% ($p < 0,001$, $n=7$, Figura 27.a), quando comparado com o controlo. Esta diminuição na isoforma TrkB-FL é concomitante com um aumento na isoforma TrkB-Tc em 235 \pm 20% ($n=7$, $p < 0,001$, Figura 27.b), comparativamente com a situação controlo. Apesar destas alterações nas isoformas dos receptores já se encontrarem descritas em cérebros *post-mortem* de pacientes com AD (Ferrer *et al.*, 1999), os resultados aqui apresentados indicam, pela primeira vez, que o péptido A β ₂₅₋₃₅ é capaz de produzir estas alterações, por si só, em culturas primárias de neurónios.

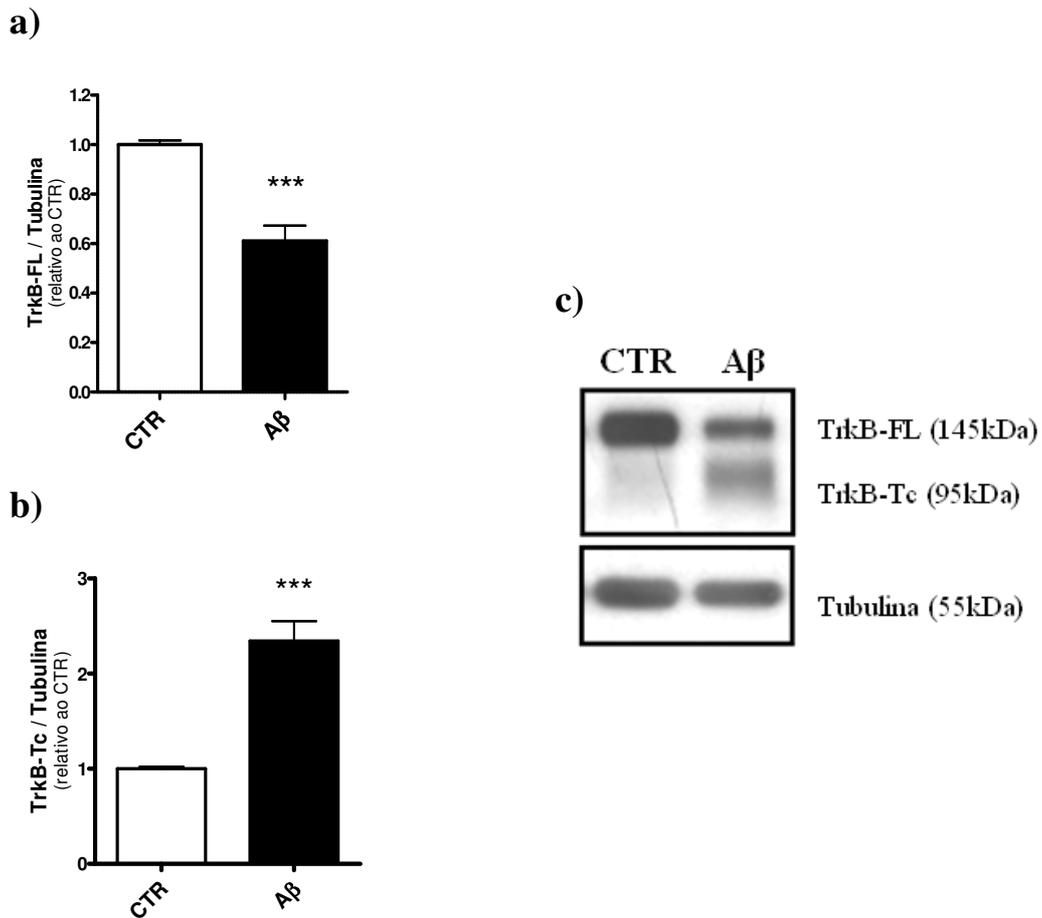


Figura 27 – Densidades do receptor TrkB na presença do péptido A β ₂₅₋₃₅(25 μ M) em culturas 4DIV. a) Gráfico representativo das densidades do receptor TrkB-FL (TrkB *full-length*) obtidas por *western-blotting*. **b)** Gráfico representativo das densidades do receptor TrkB-Tc (TrkB *truncated*) obtidas por *western-blotting*. **c)** Imagem de um *western-blot* representativo para as alterações nas densidades das bandas correspondentes aos receptores TrkB-FL (145kDa) e TrkB-Tc (95kDa) na presença e ausência do péptido A β . ***p<0,001 (*t-test*, n=7).

4.4.2. O aumento na densidade do TrkB-Tc induzido pelo péptido A β é dependente da síntese proteica.

Resultados:

No subcapítulo anterior observou-se que o péptido A β aumenta a densidade do receptor TrkB-Tc para aproximadamente o dobro comparativamente ao controlo. Com o objectivo de perceber se este aumento era resultado de uma diminuição da degradação do receptor ou de uma maior síntese *de novo*, utilizou-se como inibidor da síntese proteica a cicloheximida (CHX).

Em ensaios preliminares nos quais se pré-incubaram as células com a CHX (5 μ M) 1 hora antes do péptido A β_{25-35} (25 μ M), que permaneceu 24 horas na cultura, não se observou o aumento nas densidades do receptor TrkB-Tc induzido pelo péptido (n=2, Figura 28). Apesar deste resultado ser relativo a um número de experiências pequeno (n=2), e portanto deverá ser aumentado, dadas as grandes diferenças, podemos afirmar que o aumento dos níveis de TrkB-Tc induzido pelo péptido A β é dependente da síntese proteica.

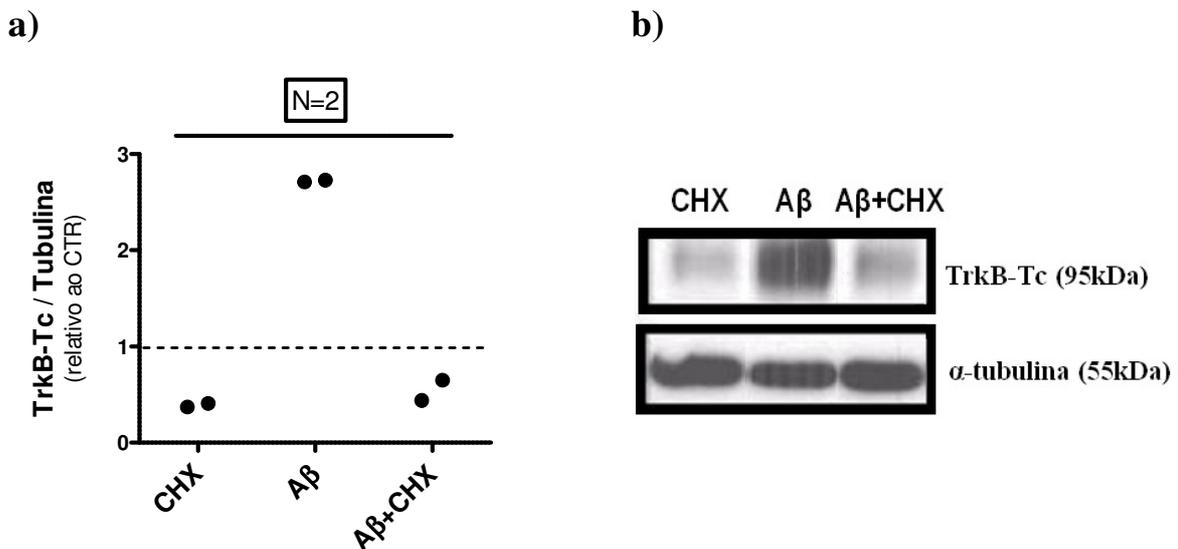


Figura 28- Efeito da inibição da síntese proteica pela cicloheximida (CHX, 5 μ M) no aumento do TrkB-Tc induzido pelo péptido A β (25 μ M), em culturas 4 DIV. **a)** Gráfico de pontos com os resultados das densidades do receptor TrkB-Tc (TrkB *truncated*) obtidas por *western-blotting* (n=2). Linha a tracejado representa o valor para o controlo. **b)** Imagem de um *western-blot* representativo na qual se observa as bandas do TrkB-Tc e da α -tubulina para as referidas condições.

4.4.2. O aumento na densidade do TrkB-Tc induzido pelo péptido A β é bloqueado pelo BDNF

Na ausência de péptido A β , a administração de BDNF (20ng/ml) nas culturas não altera os níveis de TrkB-Tc (n=4, Figura 29), mas observa-se uma diminuição nos níveis de TrkB-FL (Figura 29.b). Esta diminuição robusta, observada para o receptor TrkB-FL, já se encontra previamente descrita (Sommerfeld *et al.*,2000).

Porém, a observação com maior relevância neste subcapítulo, advém do facto de que a adição do BDNF (20ng/ml), na presença de péptido A β (25 μ M), reverte o aumento da densidade do receptor TrkB-Tc induzido pelo A β , para valores semelhantes aos da condição controlo (n=5, p<0,001, Figura 30).

Assim, é possível concluir, pela primeira vez, que o BDNF bloqueia, na totalidade, o aumento do TrkB-Tc induzido pelo péptido A β , em culturas primárias de neurónios.

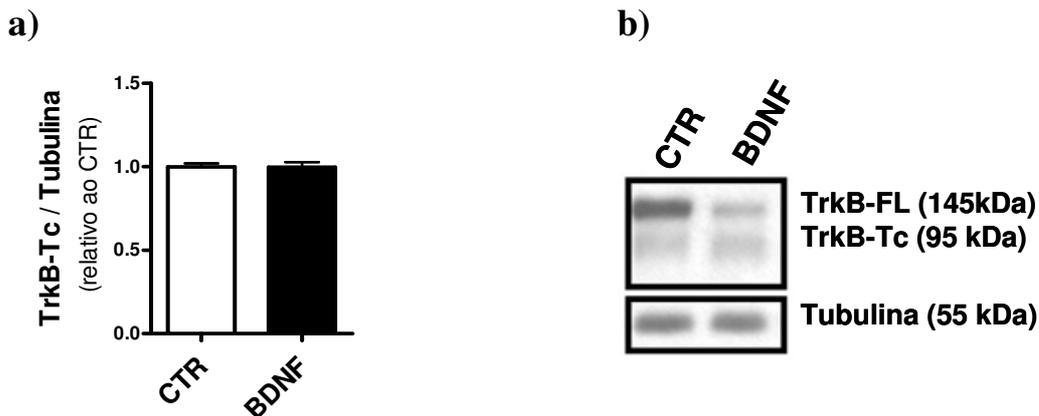


Figura 29 – Efeito do BDNF(20ng/ml) no receptor TrkB, na ausência de péptido A β (25 μ M), em culturas 4 DIV. a) Gráfico das densidades do receptor TrkB-Tc obtidas por *western-blotting* (n=4) **b)** Imagem de um *western-blot* representativo, na qual se observa as bandas do TrkB-FL, do TrkB-Tc e da α -tubulina, para as referidas condições. Aquando da administração de BDNF (20ng/ml) observa-se uma diminuição robusta na densidade da banda do TrkB-FL em 70 \pm 9% quando comparado à situação controlo (n=4, p<0.001). Esta diminuição é bloqueada pela adição do K252a (200nM) (n=4, p<0.001).

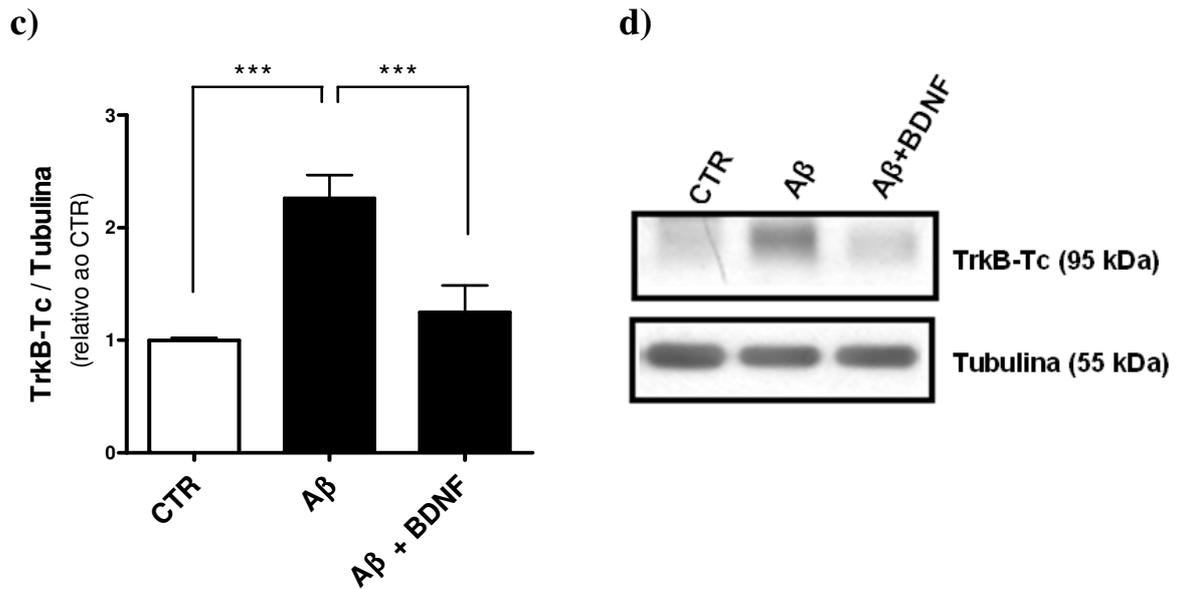


Figura 30 – Efeito do BDNF(20ng/ml) no aumento do TrkB-Tc induzido pelo péptido A β (25 μ M), em culturas 4 DIV. a) Gráfico das densidades do receptor TrkB-Tc obtidas por *western-blotting* (n=5) b) Imagem de um *western-blot* representativo, na qual se observa as bandas do TrkB-Tc e da α -tubulina, para as referidas condições.

4.4.3. Discussão:

Os resultados anteriores indicam que, nas condições experimentais utilizadas, as densidades do receptor TrkB variam aquando da exposição por 24 horas ao péptido A β ₂₅₋₃₅ (25 μ M). Ocorre uma diminuição na densidade da isoforma completa (TrkB-FL) concomitante com um aumento na isoforma truncada (TrkB-Tc) na presença do péptido A β . Os resultados também indicam que este aumento na isoforma TrkB-Tc é dependente da síntese proteica e que é bloqueado pela adição de BDNF (20ng/ml).

Apesar de nunca se ter estabelecido uma ligação directa entre o péptido A β e as alterações nos níveis de TrkB, em córtex cerebral *post-mortem* de pacientes com doença de Alzheimer, observou-se um aumento das densidades do TrkB-Tc e uma diminuição de TrkB-FL (Ferrer *et al.*, 1999). Assim este trabalho sugere fortemente que os agregados de péptido A β podem estar na origem das alterações observadas nas densidades dos receptores TrkB nos tecidos *post-mortem* de pacientes com AD.

O mecanismo exacto pelo qual o péptido A β promove estas alterações *in-vitro* não é conhecido, pelo que se podem propor pelo menos duas hipóteses: o péptido A β promove uma expressão selectiva da isoforma TrkB-Tc em neurónios ou o péptido A β aumenta a proliferação das células da glia, que sendo células ricas em TrkB-Tc favorecerem o aumento global do receptor truncado.

Relativamente à primeira hipótese proposta, o péptido A β poderia diminuir ou bloquear a expressão do TrkB-FL e promover uma expressão selectiva da isoforma truncada. Tendo em consideração que o gene que origina ambas as isoformas é o mesmo, isto significaria à partida que o péptido A β alteraria os mecanismos de *splicing* alternativo, levando a uma expressão preferencial da isoforma truncada. Assim sendo, este mecanismo proposto eventualmente envolveria modificações na maquinaria de processamento do RNA.

A hipótese mais simples para explicar as alterações observadas, seria a de o péptido A β ser capaz de promover um aumento no número de células da glia, as quais se sabe que são ricas em TrkB-Tc (Rose *et al.*, 2003). Está descrito que, em culturas gliais, apenas o péptido A β ₁₋₄₂, e não o fragmento A β ₂₅₋₃₅, aumenta a proliferação glial (Casal *et al.*, 2002). Contudo, em linhas celulares de microglia (Ra2), o fragmento A β ₂₅₋₃₅ induz proliferação celular, ainda que menos eficaz do que o péptido A β ₁₋₄₂ (Ito *et al.*, 2005).

O uso da cicloheximida (5 μ M) como inibidor da síntese proteica apenas permite concluir que o aumento no TrkB-Tc, induzido pelo péptido A β , é dependente da síntese proteica e que não é devido a uma diminuição da degradação do receptor. No entanto este composto não permite distinguir se o aumento do TrkB-Tc é devido à contribuição das células glia ou ao aumento selectivo na expressão do receptor truncado em neurónios, uma vez que ambos os processos

dependem da síntese proteica. Para fazer esta distinção, seria necessário utilizar um inibidor da proliferação glial (5-FU). Caso esta hipótese fosse a correcta o uso de 5-FU iria atenuar as alterações observadas nos receptores TrkB. Contudo, a eliminação da glia através da utilização deste composto é uma situação artificial que não ocorre fisiologicamente pelo que a maioria das interações glia-neurónio seriam perdidas.

O aumento no receptor TrkB-Tc quando da administração do péptido A β poderá levar a uma diminuição no efeito neuroprotector do BDNF, amplificando assim a morte neuronal por apoptose. Isto porque, o receptor TrkB-Tc aparenta actuar como um inibidor da sinalização do BDNF pelas seguintes razões: 1) o TrkB-Tc é um receptor sem actividade de cinase de tirosina, que não activa as vias de sinalização de sobrevivência características do BDNF (Middlemas *et al.*, 1991); 2) o receptor TrkB-Tc tem afinidade para o BDNF, podendo actuar como um sequestrador desta molécula, regulando assim os níveis biológicos de BDNF disponível em determinadas situações (Beck *et al.*, 1993) e finalmente 3) o receptor truncado é um inibidor dominante do receptor completo (TrkB-FL) uma vez que se pode associar a este, inibindo a sua homodimerização necessária à transdução de sinal (Eide *et al.*, 1996).

Independentemente do mecanismo que explica o aumento de TrkB-Tc induzido pelo péptido A β , a observação de que o BDNF bloqueia esse aumento é muito interessante e levanta muitas questões. Nomeadamente, sabe-se que na doença de Alzheimer os níveis de BDNF encontram-se diminuídos e que os níveis do receptor truncado se encontram aumentados (Ferrer *et al.*, 1999). Isto poderá indicar que o aumento do receptor truncado, para além de poder ser uma consequência da deposição de péptido A β , pode também ser consequência dos baixos níveis de BDNF.

Partindo da hipótese mais provável para explicar o aumento no TrkB-Tc induzido pelo péptido A β , ou seja, a hipótese de que o A β induz proliferação nas células da glia, o facto de o BDNF impedir esse aumento no receptor truncado poderá, eventualmente, ser devido a uma inibição na proliferação glial. A ideia de que, o BDNF impede a proliferação glial e formação de glia reactiva não é nova, contudo, ainda se encontra pouco explorada. Em particular, está descrito que a activação da glia resultante de um insulto isquémico é atenuada pela administração de BDNF (Kiprianova *et al.*, 1999).

Contudo, não se sabe se o BDNF atenua a activação e a proliferação da glia em todas as circunstâncias, e em particular na presença de péptido A β , pelo que este assunto merece ser explorado de modo a compreender melhor os resultados obtidos no presente subcapítulo. Para abordar esta questão será importante contabilizar as células da glia em proliferação, através de técnicas, como o ensaio de BrdU (*bromodeoxyuridine*).

É ainda de salientar que a adição de BDNF induz uma diminuição robusta nos níveis do receptor TrkB-FL (Figura 29.b). Esta observação não é nova, e existem evidências que essa diminuição é devida a uma degradação do receptor pelo proteassoma, poucas horas após a ligação

do BDNF. Esta degradação depende da fosforilação do receptor TrkB-FL, uma vez que o fármaco K252a (inibidor da fosforilação dos receptores Trk) bloqueia este processo (Sommerfeld *et al.*, 2000). O motivo pelo qual o BDNF não origina uma degradação do receptor TrkB-Tc (Figura 29) provavelmente está relacionado com o facto da isoforma truncada não possuir domínio intracelular, e como tal não poder ser fosforilada. Contudo, isto não explica a razão pela qual o BDNF bloqueia o aumento nas densidades do TrkB-Tc induzido pelo péptido A β .

Não se conhece ainda qual o impacto biológico e funcional da rápida degradação do receptor TrkB-FL após a ligação do BDNF. Porém, a modulação deste mecanismo poderá vir a ser relevante em situações degenerativas ou em situações onde seja necessária a administração de BDNF a longo prazo, de modo a promover a sobrevivência neuronal.

Finalmente, uma vez que a activação do receptor A_{2A} aparenta ser necessária à formação de células da glia reactivas (Brambilla *et al.*, 2003), e partindo do pressuposto de que o péptido A β induz uma activação nas células da glia, será interessante estudar futuramente o efeito de antagonistas de receptor A_{2A} no aumento do receptor TrkB-Tc induzido pelo péptido A β .

5. Conclusões

Na primeira tarefa avaliou-se, em culturas primárias de neurónios, o modelo de morte celular por apoptose induzida pelo péptido $A\beta$, cuja acumulação no cérebro é muito característica da doença de Alzheimer. **Observou-se que o péptido $A\beta$ induz apoptose nos neurónios em cultura e que a inibição da síntese proteica ou a adição do fármaco K252a bloqueia essa apoptose.**

Dado que a administração directa do BDNF tem sido proposta como possível terapia para a doença de Alzheimer, estudou-se o efeito protector do BDNF na apoptose induzida pelo péptido $A\beta$, em culturas de neurónios. **Neste estudo observou-se que o BDNF reduz a apoptose quando adicionado após o péptido $A\beta$, e que esse efeito protector é superior em culturas com 10 dias (10 DIV) do que em culturas com 4 DIV.**

Sabe-se que a activação dos receptores A_{2A} da adenosina pode activar o receptor TrkB, ou facilitar os efeitos do BDNF na plasticidade sináptica, pelo que, no presente trabalho se pretendeu analisar o papel do receptor A_{2A} no efeito protector do BDNF, na apoptose induzida pelo péptido $A\beta$. **Os resultados indicam que a activação do receptor A_{2A} da adenosina por si só não altera a apoptose induzida pelo péptido $A\beta$. Contudo, em culturas com 4 DIV, a activação deste receptor bloqueia o efeito protector do BDNF. Em culturas mais maduras (com 10 DIV) a activação do receptor A_{2A} não influencia o efeito neuroprotector do BDNF.**

Em cérebros de pacientes com doença de Alzheimer, as densidades da isoforma truncada do receptor TrkB (TrkB-Tc) encontram-se aumentadas enquanto as densidades da isoforma completa do receptor TrkB (TrkB-FL) encontram-se diminuídas. Contudo, até ao momento nunca se tinha correlacionado o péptido $A\beta$ com estas alterações. **No presente trabalho, utilizando culturas primárias de neurónios com 4 DIV, observou-se que a administração de péptido $A\beta$ durante 24 horas diminui os níveis da isoforma TrkB-FL e aumenta os níveis da isoforma TrkB-Tc. Este aumento de TrkB-Tc é dependente da síntese proteica e é bloqueado pela administração de BDNF.**

O trabalho aqui apresentado mostra que o péptido $A\beta$ aumenta a isoforma truncada do receptor TrkB e diminui a isoforma completa, podendo deste modo contribuir para uma perda no efeito protector do BDNF endógeno. Por outro lado, observou-se que o efeito neuroprotector do BDNF pode ser diminuído pela activação dos receptores A_{2A} da adenosina. Assim, o presente

5. Conclusões

trabalho reforça a ideia de que a sinalização do BDNF está comprometida em doenças neurodegenerativas, e que o desenvolvimento de pequenas moléculas que possam estimular os efeitos do BDNF endógeno, através da activação de outros receptores, poderá ser uma estratégia com possível potencial terapêutico.

6. Perspectivas Futuras

Com base nas observações de que o péptido $A\beta$ altera os níveis das isoformas dos receptores TrkB, o objectivo principal a longo prazo será perceber se esse fenómeno contribui para a perda da neuroprotecção endógena mediada pelo BDNF, e explorar mecanismos envolvidos nessa perda de modo a encontrar maneiras de a evitar.

Para alcançar este objectivo, será necessário perceber em primeiro lugar a contribuição das células da glia nos efeitos observados. Para isso as alterações nos níveis dos receptores TrkB serão avaliadas na ausência de células da glia através da adição de um inibidor da proliferação glial (como o 5-Fluoracilo). Por outro lado, dado que a adição de BDNF bloqueou o aumento do receptor TrkB truncado induzido pelo péptido $A\beta$, será necessário perceber se o péptido $A\beta$ reduz a libertação de BDNF endógeno, e em segundo lugar perceber quais os mecanismos pelo qual o BDNF impede o aumento do receptor TrkB-Tc. Tendo em conta que a hipótese proposta para este aumento envolve uma possível proliferação das células da glia, será importante verificar se o BDNF impede essa mesma proliferação (Figura 31).

Dado que é conhecido que os receptores A_{2A} da adenosina são importantes na activação das células da glia, será importante perceber qual o efeito dos antagonistas destes receptores nos níveis de TrkB-Tc e na possível proliferação glial induzida pelo péptido $A\beta$ e revertida pelo BDNF (Figura 31).

Relativamente à morte celular por apoptose induzida pelo péptido $A\beta$, mais uma vez é necessário avaliar a contribuição da glia nos efeitos observados com agonistas e antagonistas dos receptores A_{2A} da adenosina. Também será importante estudar se o receptor A_{2A} e o BDNF modulam a activação das vias de sinalização envolvidas na morte pelo $A\beta$, como a via das cinases JNK.

Num ponto de vista funcional, dado que se sabe que o péptido $A\beta$ inibe a LTP (*Long-term potentiation*), seria também interessante explorar, através de experiências de electrofisiologia em fatias organotípicas em cultura, se o BDNF e/ou a adenosina podem modular os efeitos do $A\beta$ na plasticidade. Em ultima análise, será importante perceber se num modelo animal para a AD, como os ratinhos transgénicos APPsw, se encontram presentes alterações nas densidades das isoformas do receptor TrkB, e se a administração de antagonistas dos receptores A_{2A} *in-vivo*, modula não só os níveis de TrkB e de BDNF mas também da LTP (Figura 31).

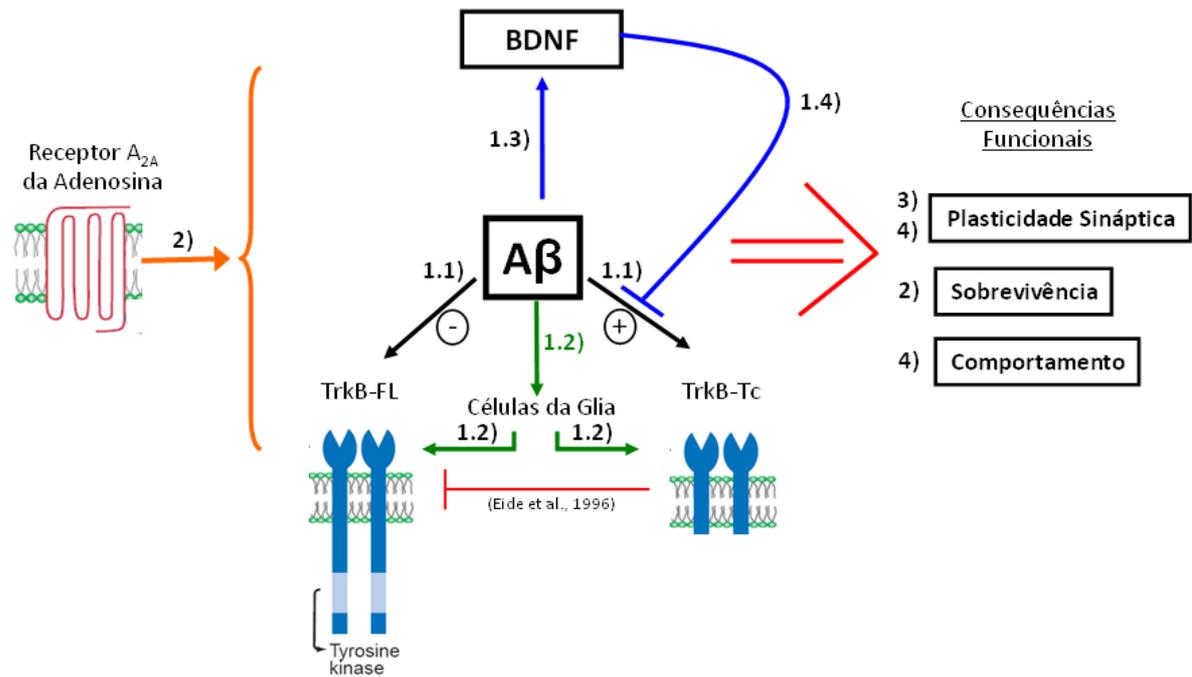


Figura 31 – Representação esquemática para um futuro projecto de investigação.

As alterações no TrkB induzidas pelo péptido Aβ e a contribuição das células da glia para essas alterações, serão avaliadas em 1.1) e 1.2). A influência do péptido Aβ nos níveis do BDNF endógeno das culturas de neurónios será investigada em 1.3) através do método de ELISA. O bloqueio pelo BDNF no aumento de TrkB-Tc induzido pelo Aβ será elucidado em 1.4). A influência do receptor A_{2A} da adenosina nas alterações do TrkB e na glia, induzidas pelo Aβ, será avaliada em 2). As consequências funcionais da adenosina e do BDNF neste sistema serão estudadas em 3) (experiências de plasticidade sináptica *in-vitro*), em 4) (experiências *in-vivo* de plasticidade sináptica e de comportamento animal num modelo de AD).

7. Bibliografia

- Anderson CN., Tolkovsky AM. (1999) A role for MAPK/ERK in sympathetic neuron survival: protection against a p53-dependent, JNK-independent induction of apoptosis by cytosine arabinoside. *J. Neurosci.* **19**, 664-673.
- Arancibia S, Silhol M, Moulière F, Meffre J, Höllinger I, Maurice T, Tapia-Arancibia L. (2008) Protective effect of BDNF against beta-amyloid induced neurotoxicity in vitro and in vivo in rats. *Neurobiology of Disease.* **31**, 316-326.
- Arévalo J.C and Wu S.H (2006) Neurotrophin signaling: many exciting surprises. *Cell. Mol. Life Sci.* **63**, 1523-1537.
- Barde Y.A., Edgar D. and Thoenen H. (1982) Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J.* **1**, 549-553.
- Beck KD., Lamballe F., Klein R., Barbacid M., Schauwecker PE., McNeill TH, *et al.* (1993) Induction of Noncatalytic TrkB Neurotrophin Receptors during Axonal Sprouting in the Adult Hippocampus. *The Journal of Neuroscience* **13**, 4001-4014.
- Behbahani H., Rickle A., Concha H., Ankarcona M., Winblad B., and Cowburn RF. (2005) Flow Cytometry as a Method For Studying Effects of Stressors on Primary Rat Neurons. *Journal of Neuroscience Research* **82**, 432-441.
- Binder DK., Croll SD., Gall CM., Scharfman HE. (2001) BDNF and epilepsy: too much of a good thing? *Trends Neurosci.* **24**, 47-53.
- Blum R. and Konnerth A. (2005) Neurotrophin-mediated rapid signalling in the central nervous system: mechanisms and functions. *Physiology* **20**, 70-78.
- Brambilla R., Cottini L., Fumagalli M., Ceruti S., Abbracchio MP. (2003) Blockade of A_{2A} Adenosine Receptors Prevents Basic Fibroblast Growth Factor-Induced Reactive Astroglia in Rat Striatal Primary Astrocytes. *GLIA* **43**, 190-194 (2003).
- Brewer GJ., Torricelli JR., Evage EK., Price PJ. (1993) Optimized Survival of Hippocampal Neurons in B27 Supplemented Neurobasal. A new Serum-free Medium Combination. *J. Neurosci. Res.* **35**, 567-576.
- Brunet A., Bonni A., Zigmond MJ., Lin MZ., Juo P., Hu LS., Anderson MJ., Arden KC., Blenis J., and Greenberg ME. (1999) Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a forkhead transcription factor. *Cell* **96**, 857-68.
- Casal C., Serratos J., Tusell JM. (2002) Relationship between β -AP peptide aggregation and microglial activation. *Brain Research* **928**, 76-84.
- Chen Y., Stevens B., Chang J., Milbrandt J., Barres BA., Hell JW. (2008) NS21: Re-defined and Modified Supplement B27 for Neuronal Cultures. *J Neurosci Methods.* **171**, 239-247.
- Cohen GM. (1997) Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem. J.* **326**, 1-16.
- Connor B. and Dragunow M. (1998) The role of neuronal growth factors in neurodegenerative disorders of the human brain. *Brain. Res. Rev.* **27**, 1-39.
- Coulson EJ. (2006) Does the p75 neurotrophin receptor mediate A β -induced toxicity in Alzheimer's disease? *Journal of Neurochemistry* **98**, 654-660.

7. Bibliografia

- Crowder RJ., and Freeman RS. (1998) Phosphatidylinositol 3-kinase and Akt protein kinase are necessary and sufficient for the survival of nerve growth factor-dependent sympathetic neurons. *The Journal of Neuroscience* **18**, 2933–2943.
- Datta SR., Dudek H., Tao X., Masters S., Fu H. Gotoh Y., and Greenberg ME. (1997) Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* **91**, 231–241.
- Dechant G. and Barde YA. (2002) The neurotrophin receptor p75NTR: novel functions and implications for diseases of nervous system. *Nat. Neurosci.* **5**, 1131-1136.
- Diógenes MJ., Assaife-Lopes N., Pinto-Duarte A., Ribeiro JA., Sebastião AM. (2007). Influence of age on BDNF modulation of hippocampal synaptic transmission: interplay with adenosine A2A receptors. *Hippocampus* **17**, 577–585.
- Diógenes MJ., Fernandes CC., Sebastião AM., Ribeiro JA. (2004) Activation of adenosine A2A receptor facilitates brain-derived neurotrophic factor modulation of synaptic transmission in hippocampal slices. *J. Neurosci.* **24**, 2905–2913.
- Dorsey SG., Renn CL., Carim-Todd L. Barrick CA., Bambrick L., *et al.* (2006). In Vivo restoration of physiological levels of truncated TrkB.T1 receptor rescues neuronal cell death in a trisomic mouse model. *Neuron* **51**, 21-28.
- Dunwiddie TV. and Masino SA. (2001) The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* **24**, 31–55.
- Eide F, Vining E, Eide B, Zang K, Wang XY, and Reichardt L. (1996) Naturally Occurring Truncated trkB Receptors Have Dominant Inhibitory Effects on Brain-Derived Neurotrophic Factor Signaling. *The Journal of Neuroscience* **10**, 3123-3129.
- Estus S., Tucker HM., van Rooyen C., Wright S., Brigham EF., Wogulis M., Rydel RE. (1997) Aggregated amyloid- β protein induces cortical neuronal apoptosis and concomitant “apoptotic” pattern of gene induction. *J. Neurosci* **17**, 7736–7745.
- Ferrer I., Marín C., Rey M.J., Ribalta T., Goutan E., Blanco R., Tolosa E. and Martí E. (1999) BDNF and full-length and truncated TrkB expression in Alzheimer disease. Implications in therapeutic strategies. *J Neuropathol. Exp. Neurol.* **58**, 729-739.
- Finkbeiner S., Tavazoie SF., Maloratsky A., Jacobs KM., Harris KM. and Greenberg ME. (1997) CREB: A Major Mediator of Neuronal Neurotrophin Responses. *Neuron* **19**, 1031–1047.
- Fletcher TL., Cameron P., De Camilli P., Banker G. (1991) The distribution of synapsin I and synaptophysin in hippocampal neurons developing in culture. *J. Neurosci* **11**, 1617-1626.
- Fredholm BB., Chen JF., Cunha RA., Svenningsson P., Vaugeois JM. (2005) Adenosine and brain function. *International Review of Neurobiology* **63**, 191-270.
- Gong Y., Chang L, Viola KL, Lacor PN, Lambert MP, Finch CE, Krafft GA, and Klein WL. (2003). Alzheimer’s disease-affected brain: Presence of oligomeric A β ligands (ADDLs) suggests a molecular basis for reversible memory loss. *PNAS* **100**, 10417-10422.
- Grewal SS., York RD., Stork PJ. (1999) Extracellular-signal-regulated kinase signalling in neurons. *Curr. Opin. Neurobiol.* **9**, 544-553.
- Gruden MA., Davidova TB., Malisauskas M., Sewell RD., Voskresenskaya NI., *et al.* (2007) Differential neuroimmune markers to the onset of Alzheimer's disease neurodegeneration and dementia: Autoantibodies to Ab (25–35) oligomers, S100b and neurotransmitters. *J. Neuroimmunol.* **186**, 181–192.

Hallböök, F., Ibañez, CF. and Persson, H. (1991) Evolutionary studies of the nerve growth factor gene family reveals a novel member highly expressed in *Xenopus laevis* ovary. *Neuron* **6**, 845-858.

Hohn A., Leibrock J., Bailey K., Barde YA. (1990). Identification and characterization of a novel member of the nerve growth factor/brain-derived neurotrophic factor family. *Nature* **334**, 339-341.

Huang EJ. and Reichardt LF. (2001) Neurotrophins: Roles in Neuronal Development and Function. *Annu. Rev. Neurosci.* **24**, 677-736.

Huang EJ. and Reihardt LF. (2003) Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Ann. Rev. Biochem.* **72**, 609-642.

Ichijo H. (1999) From receptors to stress-activated MAP kinases. *Oncogene* **18**, 6087- 6093.

Ito S., Sawada M., Haneda M., Fujii S., Oh-hashii K., Kiuchi K., *et al.* (2005) Amyloid- β peptides induce cell proliferation and macrophage colony-stimulating factor expression via the PI3-kinase/Akt pathway in cultured Ra2 microglial cells. *FEBS Letters* **579**, 1995-2000.

Kaplan DR., and Miller FD. (2000) Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr. Opin. Neurobiol.* **10**, 381-391.

Kim AH., Khursigara G., Sun X., Franke TF., Chao MV. (2001) Akt Phosphorylates and Negatively Regulates Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 893-901.

Klein R., Jing SQ., Nanduri V., O'Rourke E. and Barbacid M. (1990) The trk proto-oncogene encodes a receptor for nerve growth factor. *Cell* **65**, 189-197.

Klein WL. (2006) Synaptic targeting by A β oligomers (ADDLs) as a basis for memory loss in early Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia* **2**, 43-55.

Kiprianova I, Freiman TM, Desiderato S, Schwab S, Galmbacher R, Gillardon F, Spranger M. (1999) Brain-derived neurotrophic factor prevents neuronal death and glial activation after global ischemia in the rat. *J. Neurosci. Res.* **56**, 21-7.

Kroemer G. Galluzzi L, Vandenabeele P., Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, *et al.* (2009) Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death and Differentiation* **16**, 3-11.

Kubo T., Nishimura S., Kumagai Y., Kaneko I. (2002). In vivo conversion of racemized beta-amyloid ([D-Ser 26] A beta 1-40) to truncated and toxic fragments ([D-Ser 26] A beta 25-35/40) and fragment presence in the brains of Alzheimer's patients. *J. Neurosci. Res.* **70**, 474-483.

Lamballe F., Klein R., Barbacid M. (1991). TrkC, a new member of the Trk family of tyrosine protein kinases, is a receptor for neurotrophin-3. *Cell* **66**, 967-979.

Lambert MP, Barlow AK, Chromy BA, Edwards C, Freed R, *et al.* (1998). Diffusible, nonfibrillar ligands derived from A β 1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 6448-53.

Lee FS., and Chao MV. (2001) Activation of TrK neurotrophin receptors in the absence of neurotrophins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 3555-3560.

Lee R., Kermani P., Teng KK. and Hempstead B.L. (2001) Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science* **294**, 1945-1948.

Lessmann V., Gottmann K. and Malsangio M. (2003) Neurotrophin secretion: current facts and future prospects. *Prog. Neurobiol.* **69**, 341-374.

7. Bibliografia

- Levi-Montalcini R. and Cohen S. (1956) In vitro and in vivo effects of a nerve growth-stimulating agent isolated from snake venom. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **42**, 695-699.
- Lewin GR. and Barde YA. (1996) Physiology of the neurotrophins. *Annu. Rev. Neurosci.* **19**, 289-317.
- Linden J. (2001) Molecular approach to adenosine receptors: receptor-mediated mechanisms of tissue protection. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **41**, 775-787.
- Lindvall O., Kokaia Z., Bengzon J., Elmér E., Kokaia M. (1994) Neurotrophins and brain insults. *Trends Neurosci.* **17**, 490-496.
- Lockhart BP., Benicourt C., Junien JL., Privat A. (1994). Inhibitors of free radical formation fail to attenuate direct β -amyloid₂₅₋₃₅ peptide-mediated neurotoxicity in rat hippocampal cultures. *J. Neurosci. Res.* **39**, 494-505.
- Lonze BE., Riccio A., Cohen S., Ginty DD. (2002) Apoptosis, axonal growth defects, and degeneration of peripheral neurons in mice lacking CREB. *Neuron* **34**, 371-385.
- Middlemas DS., Lindberg RA., and Hunter T. (1991) trkB, a neural receptor protein-tyrosine kinase: evidence for a full-length and two truncated receptors. *Mol. Cell Biol.* **11**, 143-153.
- Morishima Y., Gotoh Y., Zieg J., Barrett T., Takano H., Shirasaki Y., *et al.* (2001) β -Amyloid induces neuronal apoptosis via a mechanism that involves the c-Jun N-Terminal kinase pathway and the induction of Fas Ligand. *Journal of Neuroscience* **21**, 7551-7560.
- Nagata S. (1997) Apoptosis by death factor. *Cell* **80**, 293-299.
- Ninkina N., Adu J., Fischer A., Piñón GP., Buchman VL., Davies AM. (1996) Expression and function of TrkB variants in developing sensory neurons. *The EMBO Journal* **15**, 6385-6393.
- Pardridge WM., Wu D., Sakane T. (1998) Combined use of carboxyl-directed protein pegylation and vector-mediated blood-brain barrier drug delivery system optimizes brain uptake of brain-derived neurotrophic factor following intravenous administration. *Pharm. Res.* **15**, 576-582.
- Pekny M. e Nilsson M. (2005) Astrocyte Activation and Reactive Gliosis. *Glia* **50**, 427-434.
- Phillips HS., Hains JM., Armanini M., Laramée GR., Johnson SA. (1991) BDNF mRNA is decreased in the hippocampus of individuals with Alzheimer's disease. *Neuron* **7**, 695-702.
- Pike CJ., Balazs R., Cotman CW. (1996) Attenuation of β -amyloid neurotoxicity in vitro by potassium-induced depolarization. *J. Neurochem.* **67**, 1774-1777.
- Pike CJ., Burdick D., Walencewicz AJ., Glabe CG., and Cotman CW. (1993). Neurodegeneration induced by β -amyloid peptides *in vitro*: the role of peptide assembly state. *J. Neurosci.* **13**, 1676-1687.
- Pike CJ., Walencewicz AJ., Glabe CG., and Cotman CW. (1991) *In vitro* aging of β -amyloid protein causes peptide aggregation and neurotoxicity. *Brain Res.* **563**, 311-314.
- Pike CJ., Walencewicz-Wasserman AJ., Kosmoski J., Cribbs DH., Glabe CG., Cotman CW. (1995). Structure-activity analyses of beta-amyloid peptides: contributions of the beta 25-35 region to aggregation and neurotoxicity. *J. Neurochem.* **64**, 253-265.
- Popoli P., Blum D., Martire A., Ledent C., Ceruti S., Abbracchio MP. (2007) Functions, dysfunctions and possible therapeutic relevance of adenosine A2A receptors in Huntington's disease. *Prog. Neurobiol.* **81**, 331-348.

Puttfarcken PS., Manelli AM., Neilly J., Frail DE. (1996) Inhibition of age-induced beta-amyloid neurotoxicity in rat hippocampal cells. *Exp. Neurology* **138**, 73-81.

Rajagopal R., Chen ZY., Lee FS., Chao MV. (2004) Transactivation of Trk Neurotrophin Receptors by G-Protein-Coupled Receptor Ligands Occurs on Intracellular Membranes. *The Journal of Neuroscience* **24**, 6650–6658

Ribé D., Sawbridge D., Thakur S., Hussey M, Ledent C., Kitchen I., Hourani S., Li JM. (2008) Adenosine A_{2A} receptor signaling regulation of cardiac NADPH oxidase activity. *Free Radical Biology & Medicine* **44** 1433–1442.

Ribeiro JA., Sebastião AM. and de Mendonça A. (2003) Adenosine receptors in the nervous system: pathophysiological implications. *Prog. Neurobiol.* **68**, 377-392.

Rose C., Blum R., Pichler B., Lepier A., Kafitz K., and Konnerth A. (2003) Truncated TrkB-T1 mediates neurotrophin-evoked calcium signalling in glia cells. *Nature* **426**, 74-78.

Rosin D., Robeva A., Woodard R., Guyenet P., Linden J. (1998) Immunohistochemical Localization of Adenosine A_{2A} Receptors in the Rat Central Nervous System *J. Comp. Neurol.* **401**, 163–186.

Roux PP., Barker PA. (2002) Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. *Progress in Neurobiology* **67**, 203-233.

Schulte G., Fredholm BB. (2003) Signalling from adenosine receptors to mitogen-activated protein kinases. *Cellular Signalling* **15**, 813–827.

Sebastião AM., Ribeiro JA. (2009). Adenosine Receptors and the Central Nervous System. *Handbook of Experimental Pharmacology* **193**, 471-534.

Segal RA. and Greenberg ME. (1996) Intracellular signalling pathways activated by neurotrophic factors. *Annu. Rev. Neurosci.* **19**, 463-489.

Seiger A, Nordberg A, von Holst H, Backman L, Ebendal T, Alafuzoff I, Amberla K, Hartvig P, Herlitz A, Lilja A, *et al.* (1993) Intracranial infusion of purified nerve growth factor to an Alzheimer patient: the first attempt of a possible future treatment strategy. *Behav. Brain. Res.* **57**, 255-61.

Selkoe DJ (1999) Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease. *Nature* **399**, A23–A31.

Shimohama S. (2000) Apoptosis in Alzheimer's disease—an update. *Apoptosis.* **5**, 9–16.

Sommerfeld MT., Schweigreiter R., Barde YA., Hoppe E. (2000) Down-regulation of the neurotrophin receptor TrkB following ligand binding. *The Journal of Biological Chemistry* **275**, 8982-8990.

Soppet D., Escandon E., Maragos J., Middlemas DS., Reid SW., *et al.* (1991). The neurotrophic factors brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 are ligands for the TrkB tyrosine kinase receptor. *Cell* **65**, 895–903.

Stone TW., Ceruti S., Abbracchio MP. (2009) Adenosine Receptors and Neurological Disease: Neuroprotection and Neurodegeneration. *Handbook of Experimental Pharmacology* **193**, 535-587.

Tebano MT., Martire A., Potenza RL., Gro C., Pepponi R., Armida M., *et al.* (2008) Adenosine A_{2A} receptors are required for normal BDNF levels and BDNF-induced potentiation of synaptic transmission in the mouse hippocampus. *J Neurochem* **104**, 279–286.

7. Bibliografia

Thoenen H. and Sendtner M. (2002) Neurotrophins: from enthusiastic expectations through sobering experiences to rational therapeutic approaches. *Nat. Neurosci. Supp.* **5**, 1046-1050.

Toddle S., Moresco RM, Simonelli P, *et al* (2000). Design, radiosynthesis, and biodistribution of a new potent and selective ligand for in vivo imaging of the adenosine A_{2A} receptor system using positron emission tomography. *J.Med.Chem.* **43**, 4359.

Ventriglia M., Bocchio Chiavetto L., Benussi L., Binetti G., Zanetti O., Riva M.A. and Gennarelli M. (2002) Association between the BDNF 196 A/G polymorphism and sporadic Alzheimer's disease. *Mol. Psychiatry* **7**, 136–137.

Wang KC., Kim JA., Sivasankaran R., Segal R., He Z. (2002). p75 interacts with the Nogo receptor as a co-receptor for Nogo, MAG and OMgp. *Nature* **420**, 74-78.

Xu Y., Hou XY., Liu Y., Zong YY (2009) Different Protection of K252a and N-acetyl-L-cysteine Against Amyloid- β Peptide-induced Cortical Neuron Apoptosis Involving Inhibition of MLK3–MKK7–JNK3 Signal Cascades. *Journal of Neuroscience Research* **87**, 918–927.

Yaar M., Zhai S., Pilch PF., Doyle SM., Eisenhauer PB., Fine RE. and Gilchrist BA. (1997) Binding of β -amyloid to the p75 Neurotrophin Receptor induces apoptosis. A possible mechanism for Alzheimer's disease. *J. Clin. Invest.* **100**, 2333-2340.

Yamazaki T., Yamaguchi H., Nakazato Y., Ishiguro K., Kawarabayashi T., and Hirai S. (1992) Ultrastructural characterization of cerebellar diffuse plaques in Alzheimer's disease. *J. Neuropath. Exp. Neurol.* **51**, 281–286.

Yang DD., Kuan CY., Whitmarsh AJ, Rincon M, Zheng TS, Davis RJ, Rakic P, Flavell RA (1997) Absence of excitotoxicity-induced apoptosis in the hippocampus of mice lacking the Jnk3 gene. *Nature* **389**, 865–870.

Yankner BA. (1996) Mechanisms of neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *Neuron* **16**, 921–932.

Yao M., Nguyen TV., Pike CJ. (2005) β -Amyloid-Induced Neuronal Apoptosis Involves c-Jun N-Terminal Kinase-Dependent Downregulation of Bcl-w. *Journal of Neuroscience* **25**, 1149–1158.

Yoon SO, Carter BD, Casaccia-Bonofil P, Chao MV (1998) Competitive signaling between TrkA and p75 nerve growth factor receptors determines cell survival. *J Neurosci* **18**, 3273-3281.

Zhu X, Raina AK, Rottkamp CA, Aliev G, Perry G, Boux H, Smith MA. 2001. Activation and redistribution of c-jun N-terminal kinase/stress activated protein kinase in degenerating neurons in Alzheimer's disease. *J Neurochem* **76**, 435–441.

8. Anexos

8.1. Caracterização das culturas primárias de neurónios.

De modo a avaliar a percentagem das células da glia para as culturas primárias de neurónios, utilizou-se a técnica de imunocitoquímica descrita nos métodos. Para distinguir os diferentes tipos celulares, utilizou-se um anticorpo que reconhece a proteína MAP-2 (específica de neurónios) e um anticorpo que reconhece a proteína GFAP (presente em células gliais reactivas e em neurónios imaturos). Para detectar os núcleos celulares, utilizou-se o DAPI (azul).

Os resultados obtidos para culturas controlo com 4 DIV indicam que cerca de 80% das células totais são neurónios (vermelho e azul) pelo que, as restantes 20% são células da glia (azul) (Figura 32). Para as culturas com 4 DIV ocultou-se a marcação com GFAP, dado que os neurónios são imaturos e ocorre marcação dupla para o GFAP e para o MAP-2. Para culturas mais maduras, com 10 DIV, cerca de 50 % das células totais são neurónios (vermelho e azul) enquanto as restantes 50 % são células da glia (azul e verde ou apenas azul) (Figura 33). Nesta figura é possível visualizar uma célula da glia com forte marcação para o GFAP.

A marcação da proteína GFAP é frequentemente utilizada para identificar astrócitos, contudo a sua expressão depende muito do estado de activação destas células (Pekny e Nilsson, 2005). Assim, as células com marcação única para o DAPI (sem GFAP) foram também consideradas como células gliais, dado que podem ser astrócitos não reactivos ou outros subtipos de células da glia, como microglia ou oligodendrócitos.

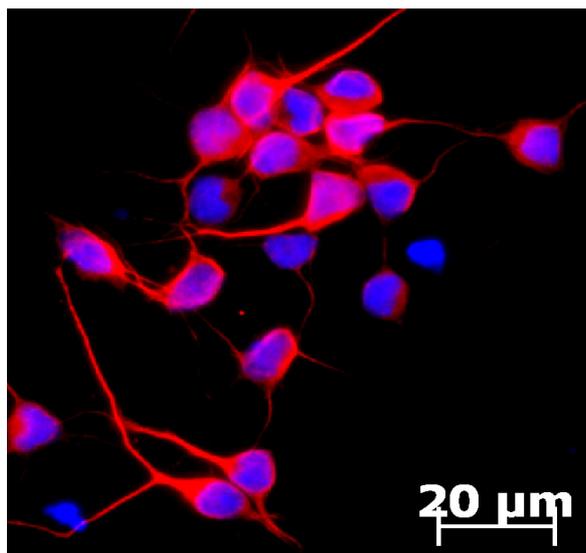


Figura 32 - Caracterização das culturas de neurónios com 4 DIV. Imagem de imunocitoquímica obtida por microscopia de fluorescência usando culturas de neurónios em condição controlo com 4 dias *in-vitro*. A cor azul representa o DAPI que marca os núcleos celulares e o vermelho representa a proteína MAP-2 que é específica para neurónios. Células positivas para DAPI e sem marcação para o MAP-2 foram consideradas como células da glia. Ampliação de 400x.

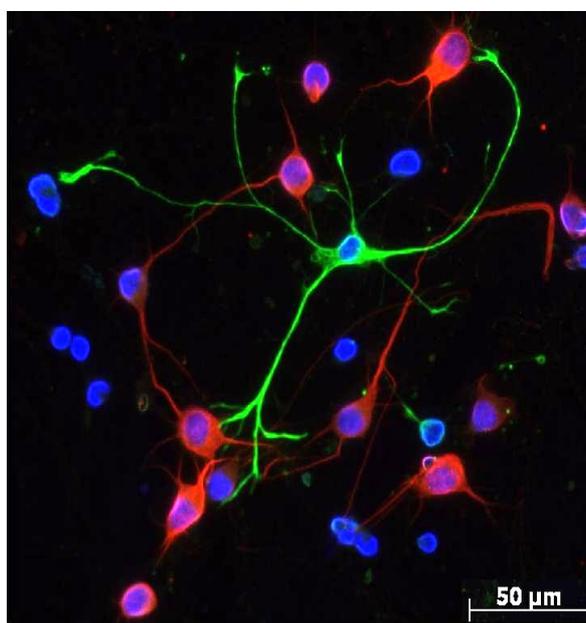


Figura 33 - Caracterização das culturas de neurónios com 10 DIV. Imagem de imunocitoquímica obtida por microscopia de fluorescência usando culturas de neurónios em condição controlo com 10 dias *in-vitro*. A cor azul representa o DAPI, que marca os núcleos celulares e o vermelho representa a proteína MAP-2 que é específica para neurónios. A cor verde representa a proteína GFAP, que é expressa em células da glia reactivas. Células sem marcação para o MAP-2 foram consideradas como células da glia. Ampliação de 400x.

