

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



**Estudo do Efeito Anti-apoptótico do Monóxido de
Carbono: Comunicação Neurónios-Astrócitos por
Modelação da Sinalização Purinérgica**

Raquel Maria Azeitão Alves

MESTRADO EM BIOLOGIA CELULAR E BIOTECNOLOGIA

2011

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



Estudo do Efeito Anti-apoptótico do Monóxido de Carbono: Comunicação Neurónios-Astrócitos por Modelação da Sinalização Purinérgica

Dissertação de mestrado sob a orientação de:

Doutora Helena Vieira, Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica/ Instituto de Tecnologia Química e Biológica (IBET/ITQB), Laboratório de Tecnologia de Células Animais (TCA)

Professora Doutora Ana Rita Matos, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa (FCUL)

Raquel Maria Azeitão Alves

MESTRADO EM BIOLOGIA CELULAR E BIOTECNOLOGIA

2011

Tese de mestrado em Biologia Celular e Biotecnologia da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, realizada no Laboratório de Tecnologia de Células Animais (TCA) do Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica / Instituto de Tecnologia Química e Biológica (IBET/ITQB) e no Centro de Estudos de Doenças Crónicas (CEDOC)@IGC sob a orientação da Doutora Helena L. A. Vieira.

"Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas, que já tem a forma do nosso corpo, e esquecer os nossos caminhos, que nos levam sempre aos mesmos lugares. É o tempo da travessia: e, se não ousarmos fazê-la, teremos ficado, para sempre, à margem de nós mesmos."

Fernando Pessoa

Agradecimentos

Ao Professor Manuel Carrondo e à Doutora Paula Alves, agradeço pela oportunidade de realizar este estágio de mestrado no Laboratório de Tecnologia de Células Animais e pelo exemplo de rigor, exigência e liderança.

À Doutora Helena Vieira e à Cláudia Queiroga, por me terem aceite neste estágio, por toda a disponibilidade de conhecimento transmitida, pelo exemplo de ciência, pela paciência e compreensão ao longo deste ano.

Agradeço a todos os profissionais tanto do TCA como do CEDOC pelo exemplo de bom trabalho, de luta e de como com esforço e sabedoria se pode chegar longe.

Aos meus colegas de Licenciatura e amigos da Faculdade, principalmente à Filipa, Vera e Isac, por termos sido mais que amigos. Obrigado por toda a partilha e momentos inesquecíveis.

Aos colegas muito especiais como o **João, Francisca**, Daniel, Marta, Paulo e Joana T. agradeço pelo ambiente espectacular, pelos momentos de descontração e pela boa disposição que sempre se manifestou entre nós. Chica, obrigada por tudo!

Aos meus amigos de sempre, Gui, Beatriz, Grilo, Lipe, Inês C. e a muitos outros, agradeço por fazerem parte da minha vida, pela compreensão, pela partilha de histórias, por todas as gargalhadas e por muitas vezes, sem muitas palavras, tornarem fácil os momentos mais difíceis.

A toda a minha família, os meus avós maternos e paternos, ao meu tio Hélder que junto com os meus pais sempre lutou para que eu pudesse ser alguém melhor. E aos meus pantufas Maria e Dinis.

Aos meus pais, Bárbara e José, agradeço do mais fundo que há em mim por toda a educação, pelo amor incondicional, pelo apoio e coragem que sempre me transmitiram, pela luta diária e pelos obstáculos que travaram para me dar uma vida melhor.

A todos, o meu sincero OBRIGADO!

Índice

Prefácio.....	2
Resumo	3
Abstract.....	4
Lista de Abreviaturas.....	5
1. Introdução	7
1.1 O Cérebro e o Sistema Nervoso.....	7
1.1.1 Os Neurónios	7
1.1.2 As Células da Glia.....	7
1.1.3 Comunicação Neurónios e Células Glia.....	8
1.2 Hipóxia Isquémica e Reperfusão.....	9
1.3 Pré- condicionamento.....	9
1.4 Morte Celular	10
1.4.1 Apoptose, Necrose e Autofagia.....	10
1.5 Apoptose e Necrose na HIR cerebral	12
1.5.1 Excitotoxicidade	12
1.5.2 <i>Stress</i> Oxidativo e Radicais Livres.....	13
1.6 Monóxido de Carbono	14
1.6.1 CO e Apoptose.....	16
1.6.2 CO e HO no sistema nervoso	16
1.7 Receptores Purinérgicos	17
1.7.1 Adenosina	17
1.7.1.1 <i>Receptores P1</i>	18
1.7.2.1 <i>Receptores P2</i>	19
2. Objectivos	20
3. Materiais e Métodos.....	21
3.1. Meios e Materiais de cultura.....	21
3.2 Esterilidade	21
3.3 Material Biológico.....	22
3.3.1 Cultura primária de Neurónios do Cerebelo.....	22
3.3.2 Cultura primária de astrócitos corticais	23
3.4 Preparação das soluções de CO.....	24
3.5 Sistema de mono e co-culturas (Neurónios - Astrócitos).....	24
3.6 Prevenção e Indução de morte.....	25
3.7 Observação da Morfologia Nuclear e Viabilidade Celular	25
3.8 Reagentes e Tempos de Reacção	26

3.9 Análise estatística	26
3.10. Esquema resumo do método utilizado no estudo dos componentes em monoculturas de neurónios	27
.....	27
3.11. Esquema resumo do método utilizado no estudo da comunicação neurónios-astrócitos em sistema de co-culturas	27
.....	27
4. Resultados e Discussão	28
4.1 Estudo do efeito do CO na sobrevivência neuronal num sistema de co-culturas	29
4.2 Estudo do papel da adenosina e seus receptores na comunicação astrócito-neurónio e na sobrevivência neuronal	32
4.2.1. Avaliação do efeito da adenosina em monoculturas de neurónios	32
4.2.2 Avaliação do efeito do agonista de receptores A_{2A} em co-culturas	33
4.2.3 Avaliação do efeito do antagonista de receptores A_{2A} em co-culturas	35
4.2.4 Avaliação da inibição da ectonucleotidase em neurónios	36
4.3 Estudo do papel do ATP e seus receptores na comunicação astrócito - neurónio e na sobrevivência neuronal	38
4.3.1 Avaliação do efeito do ATP em monoculturas de neurónios	38
4.3.2. Avaliação do efeito do antagonista de receptores P2 em co-culturas	40
4.3.3 Avaliação do efeito do antagonista de receptores P2X em co-culturas	41
4.3.4 Avaliação da inibição da conexina 43 em astrócitos	43
5. Conclusões	46
6. Perspectivas Futuras	48
Bibliografia	50

Prefácio

Esta tese de mestrado insere-se no âmbito do projecto PTDC/SAU-NEU/098747/2008, intitulado “Pré-condicionamento induzido por monóxido de carbono: novas estratégias na prevenção de lesão cerebral devido à hipóxia-isquémia e reperfusão”, financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT).

O trabalho desenvolvido pretende estudar a comunicação astrócito-neurónio, sob a influência do monóxido de carbono na protecção contra a apoptose neuronal por meio dos astrócitos, onde o principal mecanismo investigado é a sinalização purinérgica.

O trabalho contido nesta dissertação de mestrado foi apresentado em forma de:

- Comunicação oral e poster:

Vieira H.L., Queiroga C.S., Almeida A.S., Tomasi S., **Alves R.M.**, Alves P.M. and Vercelli A. (2011) “Pre-Conditioning Triggered By Carbon Monoxide: New Strategies To Prevent Brain Damage Due To Hypoxia-Ischemia And Reperfusion”. *23RD Biennial Meeting of ISN / ESN, Athens, Greece*, 28 de Agosto a 1 de Setembro 2011.

Será também elaborado um artigo científico com base neste estudo.

Resumo

A hipóxia isquémica e reperfusão leva a lesões cerebrais graves que rapidamente culminam na morte das células neuronais. O monóxido de carbono tem vindo a ser estudado como molécula neuroprotectora e, em pequenas concentrações, confere protecção contra a apoptose em diversos tipos de células e tecidos.

Neste trabalho, propusemo-nos evidenciar a capacidade modeladora do CO, explorando a comunicação celular e o tráfego metabólico entre neurónios e astrócitos após o pré-condicionamento de astrócitos com CO. O estudo baseou-se num sistema de co-culturas (astrócitos-neurónios) no qual foi inicialmente observado que o pré-condicionamento de astrócitos e posterior co-cultura leva a um aumento significativo na viabilidade neuronal após um insulto por *stress* oxidativo (uma consequência da HIR), pela adição de *tert*-butylhydroperoxide (*t*-BHP) 0 a 60 μ M. Assim, foram investigadas duas moléculas libertadas pelos astrócitos após o insulto: o ATP e o seu produto de degradação, a adenosina, que são conhecidas como neuroprotectoras e que estão envolvidas na comunicação célula-célula. Em monoculturas de neurónios a adição de adenosina e/ou ATP previne a morte celular induzida por *stress* oxidativo, indicando que ambas as moléculas estão envolvidas no mecanismo de protecção neuronal. Nos astrócitos, quando se bloqueia a saída de ATP, pela inibição da Cx43 através do antagonista AGA, houve um aumento na morte neuronal. Também a inibição do enzima ectonucleotidase (que permite a degradação do ATP em adenosina) pelo antagonista ARL67156 apresentou tal efeito. Nos neurónios o uso de antagonistas de receptores purinérgicos P1 como é o exemplo do SCH59261 e de receptores P2, PPADS e Suramina, revelaram um défice na protecção neuronal por reversão do efeito protector dos astrócitos pré-tratados com CO. Juntas, ambas as moléculas parecem estar envolvidas no mecanismo de comunicação (neurónios-astrócitos) induzido pelo CO e que leva à protecção neuronal. Contudo, o efeito observado pela inibição dos receptores de adenosina é maior em relação aos receptores de ATP. A adenosina parece assim ter maior importância na comunicação neurónio-astrócito e na protecção neuronal pois: **(i)** a inibição química do seu receptor A_{2A} , **(ii)** a inibição da degradação do ATP pela ectonucleotidase nos astrócitos, **(iii)** a diminuição de adenosina no meio extracelular (como produto da degradação do ATP pela inibição da Cx43 nos astrócitos), comprometem a sobrevivência neuronal. Assim, a adenosina libertada pela adição do CO, é considerada um elemento chave no mecanismo de protecção, sendo uma grande aposta no aperfeiçoamento e desenvolvimento de novas estratégias no estudo do metabolismo e comunicação celular. **Palavras-chave:** Monóxido de Carbono, Apoptose, Co-Culturas, Receptores Purinérgicos, ATP, Adenosina, Cérebro, *Stress* Oxidativo

Abstract

Hypoxia ischemia and reperfusion leads to severe brain injuries and can rapidly culminate in neuronal cells death. Carbon monoxide has been studied as a neuroprotective molecule and, when applied at low concentrations, protects against apoptosis in several cell types and tissues.

Herein we propose to demonstrate that CO modulates neuronal cells death, by exploring cell to cell communication and metabolic traffic occurring between neurons and astrocytes after astrocytic CO-preconditioning. The study was based on a co-culture system (astrocytes - neurons). Astrocytes were pre-treated with CO, followed by co-cultures establishment and challenging neurons to death by oxidative stress (a HIR consequence) by addition of *tert*-butylhydroperoxide (*t*-BHP) at 0 to 60 μ M. We targeted two molecules which are released by astrocytes after CO treatment: ATP and its degradation product, adenosine, which are known to be neuroprotective, and to be involved in cell to cell communication. ATP and adenosine prevented oxidative stress induced-apoptosis in monoculture of neurons, indicating that both molecules are involved in neuronal protection. In astrocytes, inhibition of ATP release by addition of Cx43's antagonist AGA, led to an increase in neuronal death. Still, ectonucleotidase inhibition (which is involved in ATP degradation to adenosine) by addition of its antagonist ARL67156 presented the same effect. In neurons, the use of P1 purinergic receptor antagonist such as SCH59261, and P2 receptor antagonist namely PPADS and Suramin, reversed the neuroprotective role of CO-treated astrocytes. Taken all together, ATP and adenosine seem to be involved in CO-induced astrocyte-neuron communication, improving neuronal survival. However, the effect observed by inhibition of adenosine receptors is higher than ATP receptors. Adenosine appears to present a more effective role in neuronal protection by CO-pretreated astrocytes because: **(i)** chemical inhibition of A2A receptor, **(ii)** inhibition of ectonucleotidase in astrocytes, **(iii)** decrease in extracellular adenosine by inhibition of Cx43 in astrocytes markedly decreased neuronal survival in the co-culture system.

Based in our study, adenosine combined with CO can be considered a key element in HIR damage prevention. All these results prove to be important on the improvement and development of new strategies in neuronal metabolism and cell to cell communication.

Key words: Carbon Monoxide, Apoptosis, Co-Culture, Purinergic Receptors, ATP, Adenosine, Brain, Oxidative Stress.

Lista de Abreviaturas

Adenosina	9-β-D-Ribofuranosyladenine
AGA	Ácido 18A-Glicirretínico
AMPA	α-amino-3hidroxi-5-metil-4-isoxazole propanoato
ARL67156	Trisodium salt hydrate
ATP	Adenosina 5'- trifosfato
AVC isquémico	Acidente Vascular Cerebral isquémico
BSA	Bovine Serum Albumine
BME	Basal Medium Eagle's
BVR	Biliverdina Redutase
Ca²⁺	Cálcio
CGS2168	2-p-(2Carboxyethyl)phenethylamino-5'-N-ethylcarboxa midoadenosine hydrochloride hydrate
CO	Monóxido de Carbono (Carbon Monoxide)
CORM's	Moléculas Libertadoras de CO (CO-releasing molecules)
Cx43	Conexina 43
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
ENT's	Equilibrativenucleoside Transportes
FBS	Fetal Bovine Serum
GABA	Ácido Gamma-aminobutírico
GC	Guanilato Ciclase
GPX	Glutaciona Peroxidase
GS	Glutamina Sintetase
GSH	Glutaciona Reduzida
GSR	Glutaciona Redutase
GSSG	Glutaciona Oxidada
HbCO	Carbomonoxi-Hemoglobina
HI	Hipóxia Isquémica
HIR	Hipóxia Isquémica e Reperfusão
HO	Heme-Oxigenase
H₂O₂	Peróxido de Hidrogénio
H₂S	Sulfato de Hidrogénio
LDH	Lactate Dehydrogenase
MMP	Permeabilização da Membrana Mitocondrial

Na²⁺	Sódio
NMDA	N-metil-D-aspartato
O₂⁻	Ião Superóxido
OH[·]	Radical Hidroxilo
PC	Pré-Condicionamento
PI	Iodeto de Propídio (Propidium iodide)
P/S	Penicillin-Streptomycin
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PPADS	Pyridoxal phosphate-6-azo(benzene-2,4-disulfonic acid) tetrasodium salt hydrate
ROS	Reactive Oxigene Species (Espécies Reactivas de Oxigénio)
SCH58261	7-(2-phenylethyl)-5-amino-2-(2-furyl)-pyrazolo-[4,3-e]-1,2,4- triazolo[1,5-c]pyrimidine
SBTI	Soybean Trypsin Inhibitor
SNC	Sistema Nervoso Central
SOD	Superóxido Desmutase
Suramina	Suramin Sodium Salt
TNF	Factor de Necrose Tumoral
pO₂	Pressão Parcial de Oxigénio
αβmeATP	α,β-Methyleneadenosine 5'-triphosphate lithium salt

1. Introdução

1.1 O Cérebro e o Sistema Nervoso

O cérebro é a central de controlo do sistema nervoso, uma rede complexa de dados sensoriais que recebe, transmite e guarda informação, promove e controla os movimentos, fazendo deste modo toda a manutenção do corpo (Morest & Silver 2003). No sistema nervoso central (SNC), diversos tipos de células actuam de forma integrada para o funcionamento adequado do organismo. Estas células estão divididas em dois grupos: as células neuronais e as células gliais (Ridet et al. 1997).

1.1.1 Os Neurónios

Os neurónios podem ser classificados em termos de características e estrutura, estando estas relacionadas com as suas propriedades. Distinguem-se das células da glia devido à sua polaridade, o que lhes permite a realização de processos especializados. Estão desenvolvidos para receber certas conexões específicas e transmitir as suas informações a outros neurónios. Estas especializações incluem uma membrana celular, que é específica para o transporte de sinais nervosos tal como impulsos electroquímicos; as dendrites, que recebem e libertam os sinais; o axónio, o "cabo" condutor de sinais, e contactos sinápticos, onde a informação pode ser passado de uma célula para outra (Morest & Silver 2003).

Uma outra característica extremamente peculiar dos neurónios é o facto de serem células pós-mitóticas, ou seja, que perderam a capacidade de se dividir, o que torna a sua morte um processo irreversível (Morest & Silver 2003).

1.1.2 As Células da Glia

As células da glia diferem dos neurónios na medida em que não possuem contactos sinápticos entre si e apresentam capacidade de se dividir ao longo da vida, especialmente em resposta à lesão (Ridet et al. 1997). Incluem astrócitos, oligodendrócitos e microglia, que diferem na forma e função, cada uma desempenhando um papel diferente na estrutura e no funcionamento do tecido nervoso.

Os astrócitos constituem aproximadamente metade da população das células do cérebro (Song et al. 2002). São elementos essenciais à homeostase cerebral, possuindo

uma grande interacção com as outras células do sistema nervoso central promovendo o suporte metabólico, físico e estrutural dos neurónios (Ridet et al. 1997; Takano et al. 2009). Desta interacção, entre outros, participam diferentes receptores expressos nessas células, como os purinérgicos, adrenérgicos, colinérgicos, serotoninérgicos e GABAérgicos (Zhang & Barres 2010). Os oligodendrócitos formam bainhas de mielina protectoras sobre os neurónios. As células da microglia são um tipo especializado de macrófagos do SNC cuja função é fagocitar detritos e restos celulares presentes no tecido nervoso (Morest & Silver 2003).

Uma das mais recentes funções atribuídas à glia é a transmissão de sinais através da libertação de substâncias neuroactivas, o que transforma as células da glia em novos alvos no que respeita ao estudo das neurociências e ao desenvolvimento e descoberta de novas drogas para a indústria farmacêutica (Watkins & Maier 2003).

1.1.3 Comunicação Neurónios e Células Glia

Alguns neurónios do sistema nervoso central utilizam a neurotransmissão rápida tanto em sinapses com outros neurónios como com células gliais (Fields & Stevens-Graham 2002). As interacções entre neurónios e células da glia requerem sinalização química através do espaço extracelular (Aschner et al. 2002).

O glutamato libertado pelos neurónios glutamatérgicos tem vindo a ser demonstrado como modelador da transmissão sináptica. Quando ocorre um insulto, o glutamato pode acumular-se no espaço extracelular promovendo a libertação de neurotransmissores. A libertação dos neurotransmissores é efectuada através de sinapses que activam receptores tais como, N-metil-D-aspartato (NMDA) e α -amino-3hidroxi-5-metil-4-isoxazole propanoato (AMPA) e que levam à produção de mensageiros secundários, induzindo ondas de cálcio (Ca^{2+}) e sódio (Na^{2+}) (Alvarez-Maubecin et al. 2000).

Após o glutamato ser libertado pelos neurónios para o espaço extracelular este é rapidamente assimilado pelos astrócitos, os responsáveis pela metabolização deste composto em glutamina. Posteriormente, a glutamina libertada pelos astrócitos é assimilada pelos neurónios que a convertem novamente em glutamato, que serve como neurotransmissor. Todo este processo é designado como ciclo glutamina-glutamato (Aschner et al. 2002).

1.2 Hipóxia Isquémia e Reperfusão

A Hipóxia Isquémia e Reperfusão (HIR) cerebral está entre as complicações mais comuns decorrentes de um défice no metabolismo e na circulação cerebral (o que pode ocorrer em vários estágios da vida) resultante do Acidente Vascular Cerebral isquémico (AVC isquémico). É a terceira causa de morte em todo o mundo, afectando tanto as habilidades comportamentais como cognitivas e leva a diversas neuropatologias (Nalivaeva et al. 2004).

A Hipóxia Isquémia (HI) ocorre devido a uma interrupção do fluxo sanguíneo cerebral, que priva o cérebro da obtenção de oxigénio e nutrientes (Vannucci & Hagberg 2004). Algumas alterações celulares decorrentes deste tipo anomalia incluem a despolarização da membrana, a libertação de aminoácidos excitatórios, a acumulação de radicais livres e a morte celular (Panickar & Norenberg 2005, Vannucci & Hagberg 2004).

A reperfusão é um termo usado para descrever o restabelecimento do fluxo sanguíneo após um período de isquémia. A restauração do fluxo sanguíneo pode resultar em inúmeros efeitos negativos como o aumento da produção de espécies reactivas de oxigénio (ROS), activação da inflamação celular e entrada excessiva de cálcio que leva posteriormente à morte celular (Gottlieb et al. 1994, Wasserfuhr et al. 2008, Victorino et al. 2009). Inúmeros estudos sustentam a hipótese de que a reperfusão após isquémia cerebral contribui substancialmente para a lesão por isquémia e que a disfunção mitocondrial desempenha um papel central (Friberg & Wieloch 2002). Um facto bem estabelecido é que as células continuam a morrer durante várias horas ou até dias após o insulto (Pérez-Pinzón 2004; Dirnagl et al. 2009)

1.3 Pré- condicionamento

O pré-condicionamento (PC) ocorre quando um estímulo nocivo é aplicado abaixo do limiar do dano a um órgão ou tecido (Dirnagl et al. 2009). Deste modo, são activados mecanismos endógenos, que levam o órgão a desenvolver resistência, ou tolerância, contra estímulos posteriores semelhantes e que venham a ultrapassar o limiar de dano (Pérez-Pinzón 2004).

Em 1986, Murry et al. introduziu pela primeira vez o conceito de pré-condicionamento isquémico (Murry et al.1986). Breves e repetitivos períodos de isquémia protegiam o miocárdio, permitindo a redução posterior do tamanho da lesão (Murry et al.1986). Isto indicou que existem mecanismos protectores endógenos activados por curtos intervalos de isquémia (Pérez-Pinzón 2004). Existem duas formas distintas de respostas ao estímulo por

pré-condicionamento, sendo uma aguda ou imediata e a outra crónica ou tardia. O PC imediato induz tolerância em minutos ou poucas horas, no entanto, o PC tardio requer muitas horas ou dias depois do estímulo para aumentar a tolerância, uma vez que envolve geralmente expressão genética e síntese proteica (Pérez-Pinzón 2004).

O cérebro é mais vulnerável a eventos isquémicos do que qualquer outro órgão (Schaller & Graf 2002). Particularmente tem sido muito estudado o papel dos astrócitos no fenómeno de tolerância à isquémia e cada vez mais se tem demonstrado que essas células são essenciais para a sobrevivência neuronal (Schaller & Graf 2002; Zhang & Barres 2010). Em resposta à isquémia os astrócitos sofrem diversas alterações, tornando-se reactivos. O pré-condicionamento pode levar a essas modificações nos astrócitos e esta activação prévia pode ser um dos factores auxiliares na protecção neuronal (Dinargal et al. 2009).

A tolerância contra a isquémia ganhou atenção como um mecanismo extremamente robusto contra condições de *stress*, tais como anóxia / isquémia no coração, espinal medula e no cérebro (Murry et al. 1986; Pérez-Pinzón 2004; Dirnagl et al. 2009). O tempo de isquémia requerido para induzir o pré-condicionamento isquémico é variável entre espécies, órgãos e sistemas (Dirnagl et al. 2009).

1.4 Morte Celular

A morte celular pode ser classificada de acordo com diferentes processos, tais como: **(i) processo morfológico**; que envolve a morte da célula podendo este ser apoptótico (tipo1), autofágico (tipo2), necrótico (tipo3) ou associado à mitose; **(ii) critério enzimático**; com o envolvimento ou não de nucleases ou diferentes classes de proteases tais como caspases e catepsinas; **(iii) aspectos funcionais**; podendo ser programados ou acidentais, fisiológicos ou patológicos, e **(iv) características imunológicas**; podendo estas ser imunogénicas e/ou não-imunogénicas (Galluzzi et al. 2007). Apesar de todas as classificações existentes, a morte celular na qual existe menos controvérsia é a que envolve os processos morfológicos acima referidos.

1.4.1 Apoptose, Necrose e Autofagia

A apoptose, morte celular tipo1, também conhecida como morte celular programada, foi inicialmente reconhecida como um processo essencial do desenvolvimento, sendo caracterizada por uma série de alterações morfológicas e químicas (Giffard & Swanson 2005). A condensação e fragmentação da cromatina e do núcleo, a compactação dos organelos citoplasmáticos (mitocôndria e ribossomas formam agregados), o decréscimo do

volume celular e a alteração da membrana plasmática são acontecimentos geralmente observados que resultam no reconhecimento e fagocitose dos corpos apoptóticos (Schulz et al. 1999, Friedlander 2003).

Enquanto a apoptose envolve a perda rápida de todas as estruturas celulares e organelos, a autofagia (morte celular tipo 2) é um processo lento e restrito, no qual porções do citoplasma são sequestradas para vacúolos e posteriormente digeridos por hidrólise lisossomal. A relação entre a apoptose e a autofagia é complexa, a autofagia tanto ser um processo destrutivo para a células como também uma resposta ao *stress*, em especial em carência de nutrientes.

A necrose (morte celular do tipo 3) é normalmente definida como um tipo de morte celular que envolve a ruptura da membrana plasmática. As principais características da necrose incluem: **(i)** o aumento do volume celular, que culmina com a ruptura da membrana plasmática, **(ii)** a perda desorganizada dos organelos, e **(iii)** libertação do conteúdo hidrolítico para o espaço extracelular, promovendo a propagação da lesão do tecido e principalmente a inflamação. A permeabilização da membrana mitocondrial (MMP) pode ser um passo limitante tanto na morte celular por apoptose, bem como na morte celular por necrose. Pode ser activada por diversos mensageiros pró-apoptóticos secundários como é o exemplo do Ca^{2+} , espécies reactivas de oxigénio (ROS) e mensageiros lipídicos sendo também facilitada por proteínas pró-apoptóticas da família Bcl-2 como é o caso da Bak e Bax. (Mattson & Kroemer 2003, Vieira et al. 2000). A MMP induz: **(i)** dissipação do potencial de membrana, **(ii)** desorganização da cadeia respiratória, **(iii)** produção elevada de ROS, **(iv)** síntese de ATP, e **(v)** libertação de moléculas que regulam morte. Todas estas características tornam a morte celular um processo irreversível (Schulz et al., 1999, Mattson & Kroemer 2003, Queiroga et al. 2010).

No sistema nervoso, a morte celular programada tem um papel central tanto para a correcta formação das estruturas cerebrais durante o desenvolvimento do SNC, assim como na propagação de doenças neurodegenerativas (Maycotte et al. 2010). A apoptose neuronal tem sido repetidamente observada em inúmeros estudos com modelos de hipóxia neonatal e em adultos (Hu et al. 2000).

1.5 Apoptose e Necrose na HIR cerebral

Durante um episódio isquêmico ocorre morte celular por necrose no centro da lesão, onde a hipóxia é mais grave, e a apoptose ocorre na penumbra, onde o fluxo sanguíneo colateral reduz o grau de hipóxia (Figura 1) (Friedlander 2003).



Figura 1- Esquema representativo dos tipos de morte no cérebro após um insulto. Na penumbra, onde há algum grau de fluxo sanguíneo colateral, um gradiente de perfusão estabelece um limite entre a morte celular por necrose, a morte celular por apoptose e a sobrevivência do tecido. Adaptado de **Friedlander, 2003. "Apoptosis and Caspases in Neurodegenerative Diseases"**.

A necrose resultante da isquemia é o primeiro resultado da inativação anaeróbia da fosforilação oxidativa. O término dos processos de transporte activo, influxo celular de Ca^{2+} e outros iões a partir da activação de canais iónicos dependentes de voltagem e canais ligando-dependentes (por exemplo, os canais receptores de glutamato), levam à morte celular por necrose (Fiskum et al. 2004). Tendo em conta estes mecanismos e a rapidez com que o processo ocorre (evento rápido que dura minutos), a morte celular por necrose é extremamente difícil de tratar ou prevenir.

A apoptose parece ocorrer como um processo activo após um evento isquémico (Mehta et al. 2007), iniciada por diversos sinais nocivos, produção de espécies reactivas de oxigénio (ROS) e de factores de necrose tumoral (TNF), deficiência de neurotrofinas e factores de crescimento, indução da proteína p53 e libertação do citocromo c pela permeabilização mitocondrial (Kroemer 2003; Zhang et al., 2004). Estes eventos ocorrem na região da penumbra (região vizinha que circunda o centro da lesão), onde a integridade celular ainda pode ser preservada. Por oposição ao processo anterior este é um fenómeno lento que pode durar horas ou dias (Friedlander 2003).

1.5.1 Excitotoxicidade

A excitotoxicidade promove a persistente despolarização neuronal, o que desencadeia uma cascata de eventos celulares que posteriormente levam à morte celular. Três elementos desta cascata ocorrem em paralelo, sendo: **(i)** influxo de sódio, **(ii)** influxo de

cálcio (ambos ocorrem devido à activação de receptores de NMDA) e **(iii)** excitose de glutamato (Doble 1999, Sattler et al. 2000).

Dentre os mecanismos envolvidos na lesão por isquémia, a excitotoxicidade por glutamato é aquele que apresenta maior contribuição (Sattler et al. 2000). Este processo é extremamente complexo activando inúmeros mecanismos moleculares (enzimas proteolíticas, stress oxidativo, peroxidação lipídica e actividade de endonucleases) e uma enorme cascata de sinalização, que contribuem para o processo de morte neuronal (Dafre et al., 2003; Johansson and Belichenko, 2002).

1.5.2 Stress Oxidativo e Radicais Livres

In vivo, as ROS podem ser produzidas de duas formas: **(i)** pela acção das NADPH oxidases localizadas na membrana celular, ou **(ii)** nos complexos mitocondriais quando o oxigénio não é totalmente reduzido a água (Turrens 2003).

É bem conhecido que a lesão cerebral por isquémia e reperfusão está associada à produção de radicais livres. A ocorrência de ROS após o insulto por isquémia e reperfusão é atribuída ao aumento de Ca^{2+} na mitocôndria: a redução da cadeia transportadora de electrões leva a uma redução parcial de oxigénio, formando o anião superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) e os seus derivados mais tóxicos como é o caso do peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e do radical hidroxilo (OH^{\cdot}) (Bazan et al. 2005).

Os efeitos negativos resultantes da formação de ROS na mitocôndria são prevenidos por sistemas de antioxidantes (moléculas capazes de prevenir ou retardar a oxidação de outras moléculas), que inibem a produção de radicais livres e peróxido de hidrogénio. Um exemplo de moléculas antioxidantes endógenas é a superóxido dismutase (SOD), uma família de metaloenzimas, a qual converte enzimaticamente o ião superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) (um grande agente redutor) em peróxido de hidrogénio (H_2O_2) (um agente verdadeiramente oxidante) (Turrens 2003). O enzima catalase e o péptido glutationa, promovem também a remoção de H_2O_2 do interior das células.

O enzima glutationa peroxidase (GPX) catalisa a redução dos hidroperóxidos pela glutationa reduzida (GSH), levando à formação de glutationa oxidada (GSSG) e água. Esse processo catalítico é directamente dependente da redução da glutationa oxidada pela glutationa redutase (GSR). Ainda outro exemplo são as moléculas antioxidantes exógenas como é o caso da vitamina E, vitamina C e betacaroteno.

Apesar de, em condições fisiológicas normais, existir um equilíbrio entre a formação de ROS e antioxidantes, em casos de hipóxia isquémia as defesas antioxidantes tornam-se

insuficientes, resultando num *stress* oxidativo que leva muitas vezes à morte celular (Turrens 2003).

O *stress* oxidativo é uma expressão utilizada para descrever vários processos negativos resultantes de um desequilíbrio entre a acumulação excessiva de ROS e quantidade de defesas antioxidantes (Turrens 2003). Este desequilíbrio resulta numa acumulação de moléculas oxidantes que podem causar a disfunção ou a morte celular, mais grave em células pós-mitóticas, como é o caso dos neurónios (Simonian & Coyle 1996).

Curiosamente as ROS podem apresentar efeitos positivos, podendo ser utilizados pelas células como moléculas sinalizadoras. Embora o O_2^- e o H_2O_2 sejam geralmente considerados subprodutos tóxicos da respiração, algumas evidências recentes sugerem que, dependendo da sua concentração e do tipo de célula em estudo, as ROS são importantes reguladoras de transdução de sinal (sinalizadores) (Bilban et al. 2008).

1.6 Monóxido de Carbono

O monóxido de carbono (CO) é um gás incolor, inodoro e insípido sendo a sua inalação uma das causas de morte em humanos (Motterlini & Otterbein 2010). Como um gás é livremente difundido, atravessa todas as membranas por difusão ignorando receptores e transportadores podendo deste modo mediar, de uma forma rápida, modificações nas células (Motterlini & Otterbein 2010).

Durante décadas o monóxido de carbono foi visto como um “assassino silencioso” (Motterlini & Otterbein 2010). A afinidade do CO para a hemoglobina é aproximadamente 220 vezes mais forte do que a afinidade da hemoglobina para o oxigénio, e a ligação preferencial do CO ao ferro heme, tem como consequência a formação de carbomoxi-hemoglobina (HbCO) que leva á intoxicação por CO (Foresti et al. 2008). Na verdade, os mamíferos são continuamente expostos a pequenas quantidades de CO produzido de forma endógena pela degradação do grupo heme pelo enzima heme oxigenase (HO) (Boczkowski et al. 2006). Esta degradação ocorre na presença de NADPH, o qual serve como agente redutor (Chang et al. 2005).

A molécula heme é degradada por mecanismos enzimáticos e não-enzimáticos. No entanto, ambas as vias usam o O_2 molecular e precisam de um agente redutor. Este é necessário na activação do O_2 , para a redução do ferro heme (a partir do Fe^{2+} e Fe^{3+}), e / ou para a manutenção de ferro no estado Fe^{2+} permitindo a ligação deste ao O_2 (Chang et al. 2005).

A HO é o último enzima envolvido na degradação do heme livre, levando à formação de produtos finais como biliverdina (rapidamente convertida em bilirrubina, um potente antioxidante, pela acção da biliverdina redutase (BVR)), monóxido de carbono e ferro livre (Bauer et al. 2008). As reacções não-enzimáticas, também designadas de "oxidações-acopladas", levam à formação de quatro isómeros de biliverdina a partir do grupo heme (Chang et al. 2005).

Estes enzimas podem estar presentes sob várias isoformas, uma constitutiva (HO-2) e uma indutível (HO-1). Uma outra isoforma, HO-3, também tem sido identificada, mas esta proteína não possui actividade catalítica heme e a sua função específica permanece desconhecida (Boczkowski et al. 2006).

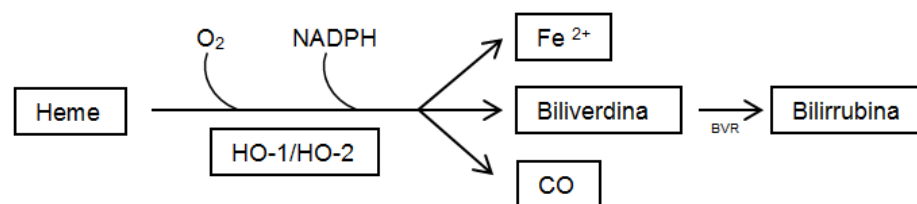


Figura 2- Esquema representativo das vias de degradação do grupo heme. O grupo heme é degradado, pelos isoformas HO-1 e HO-2 da heme oxigenase, em ferro, no isómero biliverdina e em CO. A reacção enzimática requer oxigénio molecular (O₂) e NADPH. A biliverdina redutase (BVR) converte a biliverdina em bilirrubina. Adaptado de: **Chang et al, 2005. "Heme regulation in traumatic brain injury: relevance to the adult and developing brain"**.

As HO, que utilizam o heme como substrato para a produção dos subprodutos (CO, ferro e biliverdina) estão presentes em todos os tecidos, com grande abundância no cérebro (HO-2), fígado (HO-2 e HO-1), baço (HO-1), células endoteliais vasculares e tecidos do músculo liso (HO-1 e OH-2) (Foresti et al. 2008).

Apesar da extrema toxicidade em concentrações elevadas, baixas concentrações de CO podem conferir citoprotecção (Ryter & Otterbein 2004). Os últimos anos têm testemunhado uma intensa pesquisa sobre o significado biológico do CO como um mediador essencial da sinalização em células e tecidos (Boczkowski et al. 2006). As acções citoprotectoras acontecem devido à formação dos subprodutos, que parecem desempenhar importantes funções: **(i)** anti-inflamatórias, **(ii)** anti-apoptóticas, e **(iii)** provavelmente imunomoduladoras (Chang et al. 2005). A baixa reactividade química do CO, em comparação com outros gasotransmissores (como é o caso do NO e sulfato de hidrogénio (H₂S)), favorece o potencial uso deste gasotransmissor em aplicações clínicas (Gozzelino et al. 2010).

O CO também pode inibir a actividade de hemoproteínas, como é o caso da NADPH oxidase que regula a produção de superóxido e citocromo c (complexo IV), que é um aceitador final de electrões mitocondrial e que interferem no transporte de electrões e na fosforilação oxidativa aumentando a geração de ROS (Motterlini & Otterbein 2010, Zuckerbraun et al. 2007, Gozzelino et al. 2010). O CO inibe o citocromo c competindo com as ligações de oxigénio o que faz aumentar a geração de ROS mitocondriais ao nível do complexo III, alterando assim o estado redox da célula. Esta geração de ROS está ligada à activação de vias de sinalização adaptativas promovendo a citoprotecção (Zuckerbraun et al. 2007).

1.6.1 CO e Apoptose

A exposição a baixas concentrações de CO exerce potentes efeitos anti-apoptóticos *in vivo* e *in vitro* (Ryter & Otterbein 2004). Na área de transplante de órgãos, o CO impede a rejeição de um órgão, através da inibição da iniciação de eventos apoptóticos. *In vitro*, a administração exógena de CO ou a superexpressão de HO-1, impedem que o factor de necrose tumoral α (TNF- α) induza a apoptose (Petrache et al. 2011).

A aplicação exógena de CO, em baixas concentrações, inibiu a indução da apoptose promovida por hipóxia isquémica em culturas de células endoteliais da artéria pulmonar (PAEC- pulmonary artery endothelial cells). Este efeito está envolvido na inibição da expressão de caspases, como é o exemplo da caspase-3, -8, -9, libertação do citocromo c mitocondrial, e proteínas da família da Bcl-2 (Zang et al. 2003).

Em ratos tratados com citocinas de células musculares lisas, o efeito anti-apoptótico de CO foi parcialmente dependente da activação de GC e foi associado à supressão da proteína p53 e inibição da libertação de citocromo c mitocondrial (Liu et al. 2003).

1.6.2 CO e HO no sistema nervoso

Em condições normais, a actividade da HO no SNC é muito elevada (Mancuso et al. 2006). A isoforma HO-2 é expressa em populações neuronais no cérebro, hipocampo, hipotálamo, mesencéfalo, cerebelo, entre outros (Abdul et al. 2006). É responsável pela produção neuronal de CO. O seu aumento reduz a peroxidação lipídica, contribuindo para a protecção neuronal (Motterlini & Otterbein 2010).

A isoforma HO-1, por sua vez, está presente em muito pequenas quantidades no cérebro, está localizada em grupos restritos de neurónios e pode também ser encontrada

em células gliais, onde a sua expressão génica pode ser induzida por stress oxidativo (Mancuso et al. 2006). Nas células gliais, a expressão de HO-1 pode ser induzida por lise celular ou por hemorragia, apontando para a participação no desenvolvimento neuronal e nas doenças neurodegenerativas (Wu & Wang 2005).

Em culturas primárias de células neuronais o pré-condicionamento por exposição ao CO induz a geração de ROS em neurónios o que promove uma maior resistência contra apoptose. Este efeito é promovido por mediadores de pré-condicionamento como é o caso da sGC, NOS, mitoK_{ATP} (canais de potássio mitocondrial e dependentes de ATP) (Vieira et al. 2008).

Em mitocôndrias isoladas de astrócitos o pré-condicionamento com CO actua ainda directamente na prevenção da permeabilização da membrana mitocondrial, sendo os ROS as moléculas de sinalização cruciais (Queiroga et al. 2010).

1.7 Receptores Purinérgicos

A sinalização purinérgica emergiu como o mecanismo de comunicação intercelular no sistema nervoso, estando envolvida na comunicação entre vários tipos de neurónios, células gliais e células vasculares (Fields et al. 2006). Os receptores de purinas estão localizados nos corpos celulares ou nos terminais nervosos de diferentes classes funcionais em neurónios e astrócitos (Ren & Bertrand 2008).

Os receptores de purinas são classificados como receptores P1, que são activados por moléculas de adenosina, e receptores P2, que são activados em resposta à estimulação do ATP. Durante as duas últimas décadas as evidências da participação do ATP e da adenosina como moléculas neurotransmissoras na sinalização neuronal, tem sido descritas por diversos autores (Majumder et al. 2007).

1.7.1 Adenosina

A adenosina é uma molécula que se encontra dissipada sistemicamente no meio extracelular, e está muito presente no organismo de mamíferos, especialmente no SNC, coração e vasos sanguíneos. Durante a ocorrência de crises cerebrais (como é o exemplo da lesão por isquémia) as concentrações de adenosina aumentam, o que potencia a actividade neuronal. Além do seu papel reconhecido na comunicação intercelular, a adenosina endógena parece ser crucial para a protecção dos tecidos após o insulto em

resposta ao aumento do metabolismo e à reduzida disponibilidade de energia (Ongini et al. 1997, Abbracchio et al. 2009)

Há duas formas de acumulação de adenosina extracelular: **(i)** como produto da degradação da adenosina 5'- trifosfato (ATP) através de uma cascata de ectonucleotidases, e **(ii)** por transporte através dos ENT's (equilibrativenucleoside transportes) (Sebastião & Ribeiro 2009). Devido à actividade da adenosina cinase, as concentrações intracelulares de adenosina são baixas. Como as quantidades elevadas de adenosina se encontram no ambiente extracelular, a principal direcção de transporte de adenosina ocorre para o interior das células. No entanto, em algumas condições (por exemplo, escassez de oxigénio, níveis baixos de glucose, despolarizações e hipóxia-isquémia), as concentrações intracelulares de adenosina aumentam e o seu transporte ocorre do interior para o exterior da célula (Freguelli et al. 2007, Sebastião & Ribeiro 2009, Li et al 2007). Esta acumulação extracelular de adenosina durante episódios de baixa energia e privação de oxigénio é extremamente importante para a neuroprotecção (Sebastião & Ribeiro 2009).

1.7.1.1 Receptores P1

Existem quatro tipos diferentes de receptores de adenosina ligados à proteína G: receptores A1, A_{2A}, A_{2B} e A3 (Abbracchio et al. 2009). A adenosina actua como um agonista de todos os receptores anteriormente referidos. A farmacologia dos receptores de adenosina é feita principalmente por antagonistas do receptor selectivo (Ren & Bertrand 2008).

Os receptores A1 têm uma ampla distribuição no sistema nervoso central e estão funcionalmente associados a diversos factores: **(i)** inibição da formação de cAMP (cyclic adenosine monophosphate), **(ii)** estimulação da condutância ao potássio, **(iii)** inibição do canal-N mediador da condutância de cálcio, **(iv)** estimulação da produção de fosfolipase C e **(v)** modulação da produção de óxido nítrico (Ralevic & G Burnstock 1998). Diversos estudos reconhecem estes receptores como envolvidos em efeitos protectores mediados pela adenosina tanto no pré-condicionamento como em episódios de isquémia e reperfusão no coração, pulmões e cérebro, sendo uma parte significativa destes efeitos mediada por receptores A1 (Ralevic & G Burnstock 1998).

Existem dois subtipos moleculares de receptores A2 que estão ligadas à activação da guanilato ciclase (GC). O receptor A_{2A}, receptor de alta afinidade, também pode utilizar canais N e P mediadores de Ca²⁺ como os mecanismos de transdução de sinal. O receptor A_{2B} apresenta menor afinidade mas é aquele que se encontra em maior abundância no sistema nervoso. Os receptores A3 foram descobertos recentemente como receptores P1. E

estão ligados à inibição da GC e ao aumento dos níveis de Ca^{2+} intracelular. O receptor A3 mostra distribuição ampla com baixos níveis no cérebro, mas está envolvido no pré-condicionamento isquémico e reperfusão (Abbracchio et al. 2009). A activação pré-sináptica dos receptores A3 mostrou neutralizar a supressão da excitabilidade neuronal induzida pela activação do receptor A1, reforçando ainda mais o conceito de que existem efeitos opostos entre receptores A1 e A3 no cérebro (Sei et al. 1997).

1.7.2 ATP

São vários os mecanismos através dos quais os nucleótidos de adenina podem ser libertados a partir de neurónios e astrócitos para o meio extracelular. Primeiro, o ATP pode atravessar a membrana quando a mesma está danificada (Franke & Illes 2006). Em segundo lugar, o ATP pode passar a membrana celular através de transportadores ou canais, como conexinas e hemicanais. Em terceiro, o ATP pode ser liberado por exocitose de vesículas sinápticas (neurónios) ou em grânulos intracelulares (células não neuronais), ambos mediados por um mecanismo Ca^{2+} -dependente (Franke & Illes 2006).

1.7.2.1 Receptores P2

Os receptores P2 podem ser divididos com base na sua estrutura e mecanismos de acção em duas famílias: os receptores P2X, como canais iónicos dependentes de ligantes (receptores ionotrópicos) e os receptores P2Y, que englobam receptores ligados à proteína G (receptores metabotrópicos) (Burnstock 2004).

Os receptores P2X apresentam duas regiões transmembranares, com os N- e C-terminais localizados intracelularmente, sendo que a maior porção da proteína é extracelular. A porção extracelular contém locais de ligação para o ATP e locais para antagonistas e moduladores (Guthrie et al. 1999)

Os receptores P2Y são compostos por sete regiões transmembranares, com as cadeias N-terminal (extracelular) e C-terminal (intracelular) curtas. Catorze proteínas foram caracterizadas como sendo da família de receptores P2Y (Abbracchio et al. 2003). No entanto, apenas os receptores P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11, P2Y12, P2Y13 e P2Y14 são aceites na literatura como sendo receptores P2Y funcionalmente expressos em mamíferos (Nicholas 2001, Lee et al. 2003). Os receptores P2 desempenham um papel importante em diversos estudos tais como apoptose no cancro e isquémia (Abbracchio & Burnstock, 2009).

2. Objectivos

As lesões cerebrais por hipóxia-isquémia e reperfusão ocorrem devido a um baixo teor em oxigénio e nutrientes nos tecidos e órgãos, cuja ocorrência se pode dever a diversos factores, como é o exemplo o AVC isquémico e complicações perinatais. O insulto por HIR leva à morte preferencial de neurónios, poupando a glia e os elementos vasculares. Muitos dos neurónios morrem por necrose no espaço de minutos, mas uma grande parte morre por apoptose o que leva horas ou dias. É uma doença que atinge milhões de pessoas em todo o mundo, sendo muito poucas as terapêuticas existentes no que respeita ao combate contra este tipo de doença. Assim há uma necessidade urgente e um enorme interesse clínico em desenvolver novas estratégias e aplicar novas técnicas terapêuticas de modo a minimizar este tipo de problema.

Na literatura, o monóxido de carbono (CO) tem vindo a ser descrito como uma molécula protectora neste tipo de células, apresentando um efeito anti-apoptótico tanto em monoculturas de neurónios como em monoculturas de astrócitos. Deste modo, o presente trabalho tem como objectivo estudar a comunicação astrócitos-neurónios e a influência do monóxido de carbono nesta comunicação, em particular na protecção contra a apoptose neuronal pelos astrócitos, sendo a sinalização purinérgica o principal mecanismo investigado.

A estratégia utilizada baseia-se em verificar se o efeito protector do CO ocorre nos neurónios, através do pré-condicionamento de astrócitos. Para tal, é utilizado um sistema de co-culturas no qual ambas as células (neurónios e astrócitos) coexistem no mesmo meio. Este sistema é efectuado através de utilização de *inserts* (membranas de policarbonato porosas que permitem a passagem de meio de cultura e que não permitem a ocorrência de trocas directas entre ambas as células, ou seja, estas não estão em contacto físico) mimetizando deste modo o mecanismo que ocorre *in vivo*. Pretende-se ainda verificar quais as moléculas envolvidas neste mecanismo ou nesta comunicação celular.

O ATP e a adenosina são moléculas descritas como transmissoras entre astrócitos e neurónios, e em situações de *stress* celular são rapidamente libertadas para o meio extracelular. Deste modo, são estas as moléculas alvo no presente trabalho assim como os seus receptores específicos neuronais, cujo funcionamento pode levar à protecção contra a morte celular.

3. Materiais e Métodos

3.1. Meios e Materiais de cultura

Como meio de cultura para os astrócitos foi usado *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) suplementado com 10% (v/v) de soro bovino fetal (*FBS – Fetal Bovine Serum*), 1% (v/v) de antibiótico *Penicillin-Streptomycin (P/S)*, 1% (v/v) de Gentamicina, 1% de L-Glutamina e 6 mM de Glucose.

Para a cultura de neurónios do cerebelo foi usado o meio *Basal Medium Eagle's (BME)* (Gibco Invitrogen), suplementado com 10% (v/v) FBS (Gibco Invitrogen), 0.4% de insulina B 1 mg/L (Sigma) e 0.1% ácido aminobenzóico (pABA) 1g/L (Sigma), 1% (v/v) de Pen/Strep (Gibco Invitrogen) e 2 mM L-Glutamina (Gibco Invitrogen). O tampão usado para as lavagens foi *Phosphate-Buffered Saline (PBS)*.

Para a cultura e crescimento dos astrócitos corticais foram usados frascos de plástico descartável com superfície aderente e arejamento através da tampa, com um filtro de poro 0.22 µm (*T-flask*), com 175 cm² de área de cultura (Nunc). Para os neurónios foram usadas placas de 24 poços (Nunc) previamente revestidas com poli-D-lisina 0,05g/L (Sigma) para melhor aderência. Este revestimento prévio foi realizado a 37°C durante um período mínimo de 2h. A poli-D-lisina foi removida e a placa lavada duas vezes com PBS.

3.2 Esterilidade

Todo o material para preparação e manutenção das culturas de células (meios de cultura, tampões, soluções, material de dissecação) é estéril. A esterilização foi feita por autoclavagem (30 min para soluções e 2 h para vidro, a 121°C e 1 atm) ou filtração (por um filtro de poro 0.22 µm). O material descartável (pipetas, *T-flask*, tubos de centrifuga) é fornecido em condições de esterilidade, assim como o meio BME e suplementos como FBS, o P/S, glutamina e gentamicina. De modo a controlar a esterilidade dos meios foram feitos testes de esterilidade aeróbios e anaeróbios, periódicos usando meio rico (*TPB – tryptose phosphate broth* da Sigma).

Todo o trabalho efectuado em ambiente esterilizado foi realizado em câmaras de fluxo laminar vertical Nuair (tipo II), onde o ar é mantido estéril através da utilização de um sistema de filtros HEPA e após exposição do interior da câmara a luz ultravioleta durante um período mínimo de 30 min. As culturas foram mantidas numa incubadora, a 37°C, com humidade controlada e atmosfera a 7% CO₂ (Nuair US Autoflow).

3.3 Material Biológico

Neste trabalho, utilizaram-se culturas primárias de células do cérebro provenientes do córtex de ratos Wistar com 2 dias (para cultura de astrócitos corticais) e do cerebelo de ratos com 7 dias (para cultura de neurónios) provenientes do Biotério do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT), Lisboa, Portugal.

3.3.1 Cultura primária de Neurónios do Cerebelo

A preparação desta cultura a partir do cérebro de rato foi adaptada de (Schousboe *et al.* 1989). Todas as soluções foram preparadas e filtradas com um filtro de 0,2 µm (Sartorius) imediatamente antes do início da preparação da cultura. Os ratos foram imersos em etanol 70% (v/v) e decapitados usando uma tesoura cirúrgica de pontas finas. O material de dissecação esterilizado por autoclavagem foi mantido em etanol 70 % (v/v) durante a preparação da cultura.

Retirou-se o cerebelo do cérebro do animal e colocou-se num tubo colector com 3 g/L *Bovine Serum Albumine* (BSA) e 1.16 mM MgSO₄ em tampão Krebs (7,07 g/L NaCl, 0,36g/L KCl, 1,66g/L KH₂PO₄, 2,14g/L NaHCO₃, 2,57g/L Glucose). Este tampão foi usado para todas as soluções deste procedimento. Em todas as soluções foi efectuado o reequilíbrio do pH através do arejamento com CO₂. A partir deste passo o procedimento foi seguido em ambiente estéril, na câmara de fluxo laminar, à temperatura ambiente. Os cerebelos foram colocados numa placa Teflon e cortados sequencialmente com uma lâmina de aço inox estéril (Kiato). Seguidamente foram transferidos para um tubo com solução 1 (80 mL de tampão Krebs, 0.24 g de BSA, 0.62 mL de solução MgSO₄ 150 mM). Dissociou-se o tecido secções na solução com movimentos suaves para cima e para baixo com uma pipeta de vidro estéril. O tecido foi sedimentado por centrifugação (1 minuto a 200 g) e ressuspenso em solução 2 (20 mL de solução 1, 4 mg de tripsina, 200 µL DNase 10 mg/mL). Colocou-se a suspensão em agitação em banho a 37°C com agitação durante 15 min. Adicionou-se então um volume equivalente de solução 4 (0.04 g/L DNase, 0.5 g/L inibidor de tripsina *Soybean Trypsin Inhibitor* (SBTI) e 1.5 mM MgSO₄ em 20 mL tampão de Krebs) e centrifugou-se novamente a 200 g durante 10 min. Desprezou-se o sobrenadante e adicionou-se a solução 3 (tampão de Krebs com 3,13g/L de SBTI e 0,24 mM de MgSO₄), resuspende-se com uma seringa de agulha metálica de punção lombar várias vezes e deixou-se repousar 5 min. Transferiu-se o sobrenadante para 10 mL de meio de cultura para neurónios (BME). Repetiu-se este passo novamente. Centrifugou-se novamente 5 minutos a

200g. O sobrenadante é removido e são novamente adicionados 20 ml de meio BME. Contaram-se as células ao microscópio e adicionou-se a concentração de inoculo pretendida (1×10^6 células/ml) às placas de cultura de 24 poços.

Colocaram-se as placas na incubadora a 37 °C e 7% CO₂. Passadas 48h da inoculação adicionou-se 20 µM *Cytosine β-D-Arabinofuranoside* (anti-mitótico), que impede a propagação de células que não os neurónios (já que estes não se dividem). O meio de cultura utilizado nos neurónios não é mudado durante o processo de maturação das células. A observação das células é feita periodicamente ao microscópio óptico invertido de forma a monitorizar o crescimento e maturação celular.

3.3.2 Cultura primária de astrócitos corticais

As culturas primárias de astrócitos corticais foram preparadas com base no procedimento descrito em (Richter-Landsberger *et al.* 1994). O meio de cultura DMEM usado na inoculação foi suplementado com 20% (v/v) soro e 1% (v/v) de antibiótico P/S.

Os ratos foram imersos em etanol 70% (v/v) e decapitados usando uma tesoura cirúrgica de pontas finas. Após a separação dos hemisférios cerebrais das restantes regiões do cérebro (cerebelo e meninges), todos os passos foram feitos dentro da câmara de fluxo em ambiente estéril.

Fizeram-se passar gentilmente, os hemisférios por uma rede de Nylon, com a ajuda de um êmbolo de uma seringa, para uma placa de Petri com meio de cultura, de modo a dissociar as células. Para garantir uma melhor disrupção do tecido, resuspende-se com ajuda de seringa de punção lombar, cerca de 3 vezes. Inocularam-se *T-flasks* de 175 cm² para um volume final de suspensão de 30 ml. Os *T-flasks* foram colocados na incubadora a 37 °C e 7% CO₂.

Após 3 dias da inoculação mudou-se o meio, e três dias depois fez-se nova mudança para meio com 15% (v/v) FBS. A partir daqui o meio foi mudado de 2 vezes por semana usando DMEM com 10% (v/v) de FBS. Após 10 dias as células presentes na cultura de astrócitos foram separadas dos mesmos por agitação vigorosa e removidas como é descrito em (McCarthy *et al.* 1980). As células aderentes foram sub-cultivadas em novos *T-flask* numa diluição 1:4 proporcionando uma maior área para propagação celular. O processo consiste em aspirar a totalidade do meio de cultura, lavar as células com PBS, adicionar tripsina/EDTA de forma a cobrir toda a superfície celular e quando as células estiverem todas em suspensão adiciona-se meio de cultura em volume superior ao da tripsina, para que esta seja inactivada pelas proteínas do soro, perfazendo um volume final de 10 ml. De seguida distribui-se o conteúdo por 4 *T-flask* já com meio de cultura DMEM suplementado,

para um volume final de 30 ml. Passadas três semanas após a sub-cultivação celular, as células estão maduras para a realização de estudos.

Tal como no caso dos neurónios, as culturas de astrócitos foram observadas periodicamente ao microscópio óptico invertido.

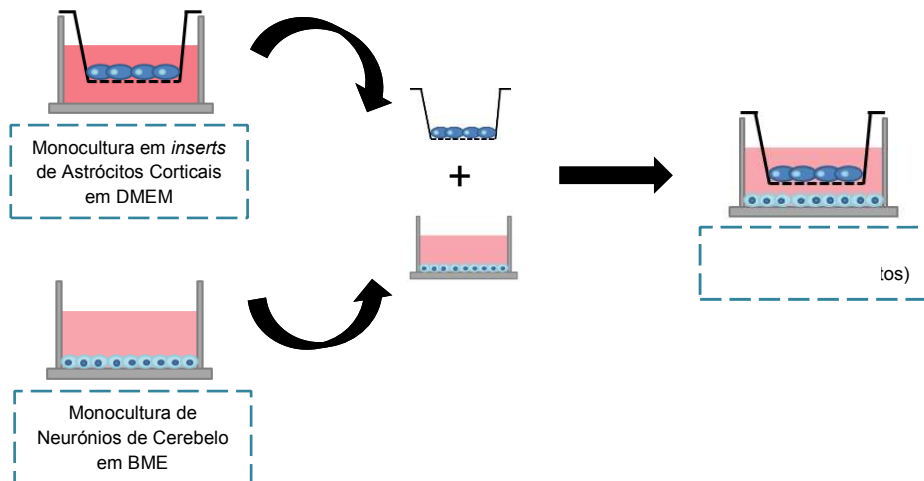
3.4 Preparação das soluções de CO

As soluções *stock* de CO são preparadas no próprio dia. Para tal são utilizados frascos de vidro de 10 ml estéreis contendo 5 ml de PBS (Phosphate Buffered Saline) e cuidadosamente seladas. O tampão é saturado com CO a 100% durante 30 minutos de modo a produzir uma solução *stock* com uma concentração final de 10^{-3} M (Motterlini et al., 2002).

3.5 Sistema de mono e co-culturas (Neurónios - Astrócitos)

Após estarem confluentes, os astrócitos são retirados dos *T-flasks* na concentração pretendida e transferidos para placas de 24 poços (Nunc) que contêm os *inserts* (Enzifarma). Os *inserts* para cultura de células são membranas de policarbonato, com uma superfície lisa e poros cilíndricos que atravessam a membrana. A membrana permeabilizada contém poros de aproximadamente 0,4 μ m de diâmetro, permitindo trocas gasosas e passagem de pequenas moléculas com dimensões inferiores ao tamanho dos poros. No poço de 1.9 cm² adiciona-se 0,5 ml de meio de cultura DMEM, os *inserts* são colocados dentro dos poços e de seguida adicionados 0,5mL de suspensão celular no respectivo *insert*. Os astrócitos estão prontos a ser utilizados para as experiências 24 horas depois, tempo necessário para que adiram à membrana dos *inserts*.

O sistema de co-culturas é estabelecido procedendo-se à aspiração do meio contido nos *inserts*, posteriormente são adicionados 500uL de meio BME (retirado das placas que contêm a cultura de neurónios) e colocados nos respectivos *inserts*, sendo estes transferidos de seguida para o poço correspondente nas placas com a cultura de neurónios (ver esquema 1).



Esquema 1 – Representação do sistema integrado de co-culturas de neurónios e astrócitos. Legenda:
 ● - “neurónios”; ● - “astrócitos”; _/_ - membrana permeabilizada com poros de 0,4 μm de diâmetro (*insert*); rosa escuro - meio astrocítico; rosa claro - meio neuronal.

3.6 Prevenção e Indução de morte

A apoptose neuronal é efectuada imediatamente antes do início das co-culturas e é induzida com um agente oxidante, o *tert*-butylhydroperoxide (*t*-BHP) em várias concentrações que variam entre 0 e 50 μM , por um período de 18 horas. A prevenção da morte celular neuronal é efectuada pelo tratamento com CO 50 μM que é adicionado aos astrócitos 3 horas antes se efectuarem as co-culturas.

A análise dos parâmetros é feita por microscopia de fluorescência utilizando fluoróchromos para marcar as células, Hoechst 33342 (Hoe, 2 mM, Invitrogen) para observar a condensação da cromatina das células, e Iodeto de Propídio (PI, 1 $\mu\text{g/ml}$, Invitrogen) para determinar a viabilidade celular baseada na integridade da membrana plasmática.

3.7 Observação da Morfologia Nuclear e Viabilidade Celular

Para observação e contagem das células foi utilizado um microscópio de fluorescência Leica DMRB e filtros para excitação a 365 nm e emissão a 420 nm. As células foram contadas utilizando uma objectiva de 100x, com óleo de imersão e os resultados da contagem são expressos em percentagem relativamente ao controlo (100%)

3.8 Reagentes e Tempos de Reacção

De modo a verificar as vias envolvidas no processo de morte celular neuronal foram testados vários agonistas e antagonistas dos receptores de ATP e adenosina. O tipo de receptor alvo, os reagentes utilizados, os tempos de reacção e o tipo de células envolvidas estão especificados na tabela abaixo.

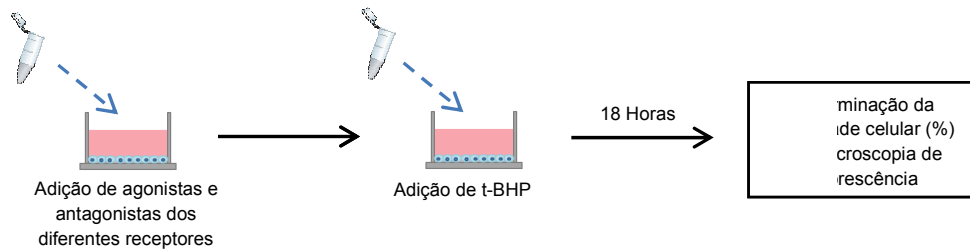
Quadro 1 – Quadro representativo dos compostos utilizados nos receptores de ATP e adenosina no estudo do efeito do CO na comunicação entre neurónios-astrócitos. Tipo de receptor alvo, suas concentrações finais e tempos de exposição.

		Reagente	Células	Tipo de receptor alvo	Concentração final	Tempo de exposição	Número de replicados
Receptores de Adenosina (P1)	Agonista	9-β-D-Ribofuranosyladenine (Adenosina)	Neurónios	A ₂	5 μM	15 min.	N=5
		2-p-(2 Carboxyethyl)phenethylamino-5'-N-ethylcarboxamidoadenosine hydrochloride hydrate (CGS21680)	Neurónios	A _{2A}	0,01 μM	5 min.	N=6
	Antagonista	7-(2-phenylethyl)-5-amino-2-(2-furyl)-pyrazolo-[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidine (SCH58261)	Neurónios	A _{2A}	1 μM	15 min.	N=4
		Reagente	Células	Tipo de receptor alvo	Concentração final	Tempo de exposição	Número de replicados
Receptores de ATP (P2)	Agonista	α,β-Methyleneadenosine 5'-triphosphate lithium salt (αβmeATP)	Neurónios	P2X	10 μM	15 min.	N=6
	Antagonista	Pyridoxal phosphate-6-azo(benzene-2,4-disulfonic acid) tetrasodium salt hydrate (PPADS)	Neurónios	P2	10 μM	60min.	N=4
		Suramin sodium salt (Suramina)	Neurónios	P2X	30 μM	15 min.	N=4
		Reagente	Células	Tipo de receptor alvo	Concentração final	Tempo de exposição	Número de replicados
Inibidores específicos	Inibidor da Conexina 43	Ácido 18A-Glicirretínico AGA	Astrócitos	Cx43	15μM	5mim.	N= 14
	Inibidor da ectonucleotidase	Trisodium salt hydrate ARL67156	Neurónios	Ectonucleotidase	50μM	30min.	N= 7

3.9 Análise estatística

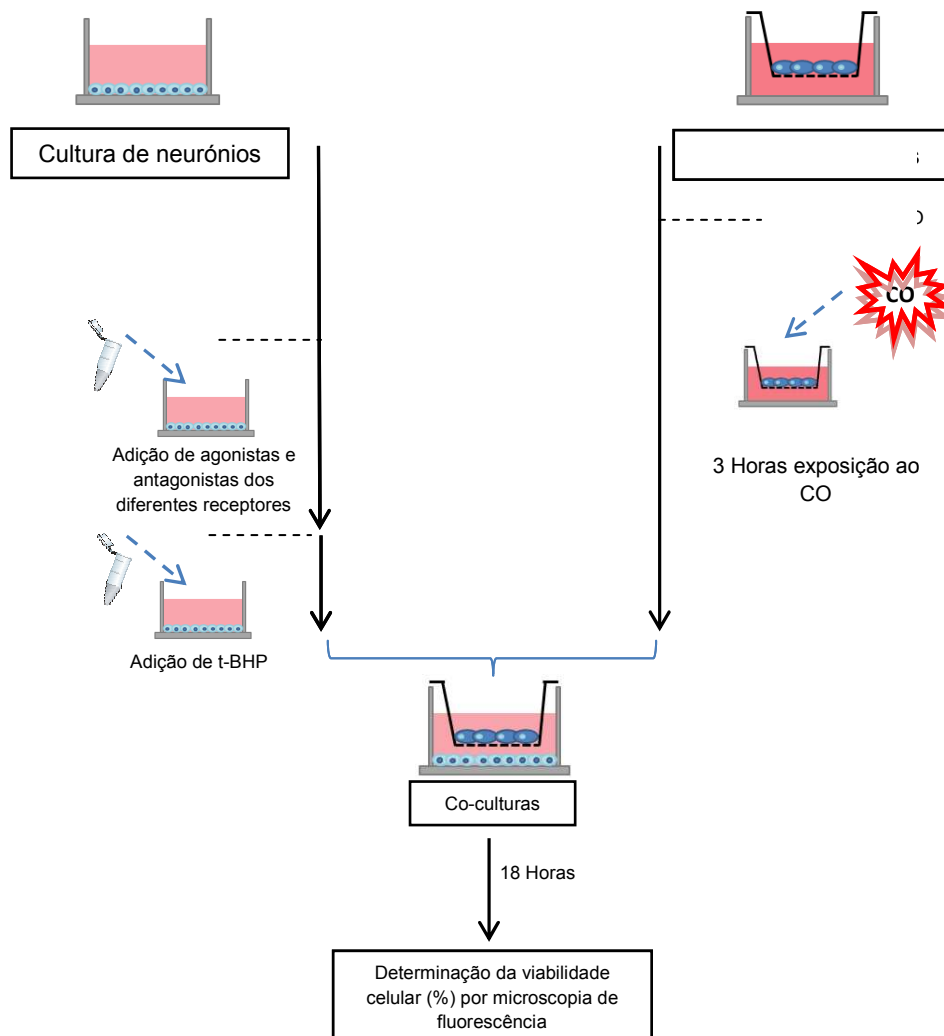
Os resultados foram processados pelo programa Microsoft Excel 2010 e expressos como média aritmética e erro padrão da média. Utilizou-se o teste ANOVA com factor único de modo a comprar todas as colunas entre si sendo os valores considerados significativos quando $p < 0,05$.

3.10. Esquema resumo do método utilizado no estudo dos componentes em monoculturas de neurónios



Esquema 2 - Representação do método adoptado no estudo efectuado em monoculturas de neurónios. As culturas encontram-se a 37°C e 7% de CO₂.

3.11. Esquema resumo do método utilizado no estudo da comunicação neurónios-astrócitos em sistema de co-culturas.



Esquema 3 - Representação do método adoptado no estudo do sistema integrado de co-culturas de neurónios e astrócitos. As culturas encontram-se a 37°C e 7% de CO₂.

4. Resultados e Discussão

As células gliais suportam a actividade neuronal e promovem o dinamismo e plasticidade do sistema nervoso central (Watkins & Maier 2003). Após um insulto, distúrbio metabólico, toxicidade, e na evolução das doenças degenerativas, as células da glia reagem de uma forma protectora em relação aos neurónios e facilitam a sua regeneração.

O ATP está descrito na literatura como um transmissor essencial na comunicação entre as células gliais e neurónios, sendo este libertado para o meio extracelular onde é rapidamente degradado. A libertação do ATP para o meio extracelular ocorre após um insulto, o que leva ao *stress* das células. O produto da sua degradação, a adenosina, é uma molécula conhecida como neuroprotectora, e tal como o ATP, é também libertada para o meio extracelular em situações extremas.

Sabendo que: **i)** o CO promove a protecção contra a morte celular de neurónios e astrócitos, **ii)** o CO induz um aumento da produção de ATP intracelular e da saída de adenosina em astrócitos e que, **iii)** a protecção neuronal é efectuada pelos astrócitos, que promovem o suporte metabólico e físico dos neurónios. O trabalho experimental foi efectuado de modo a verificar qual das moléculas, ATP ou adenosina, está envolvida na comunicação entre as células, promovendo a sua protecção.

Para tal, e de modo a mimetizar melhor o que acontece no ambiente *in vivo*, foi aplicado um sistema *in vitro* de co-culturas que permite estudar as trocas metabólicas entre astrócitos e neurónios. Este sistema permite a coexistência dos dois tipos de células (neurónio e astrócitos) no mesmo meio, mas com a característica especial de impedir que ambas as células tenham qualquer tipo de interacção física. Isto impede que sejam efectuadas trocas directas entre as células.

A aplicação de agonistas e antagonistas de receptores específicos das moléculas de ATP e de adenosina nas diferentes células foi o método adoptado para estudar o tráfego metabólico promovido pelo CO e o seu efeito na viabilidade neuronal.

De modo a mimetizar o *stress* oxidativo foi utilizado o agente oxidante t-BHP (*tert*-butil hidroperóxido), em diferentes concentrações (0 a 60 μ M). Para a contagem das células foram utilizados 2 fluorocromos: Hoechst, para avaliar a condensação da cromatina, (Figura 2A) e PI, para avaliação da viabilidade celular através da permeabilização da membrana plasmática (Figura 2B), eventos associados à apoptose. Todos os dados apresentados estão expressos em percentagem relativa ao total de células. As células mortas por apoptose apresentam uma diminuição do seu volume, que também pode ser observado em microscopia de contraste de fase (Figura 2C).

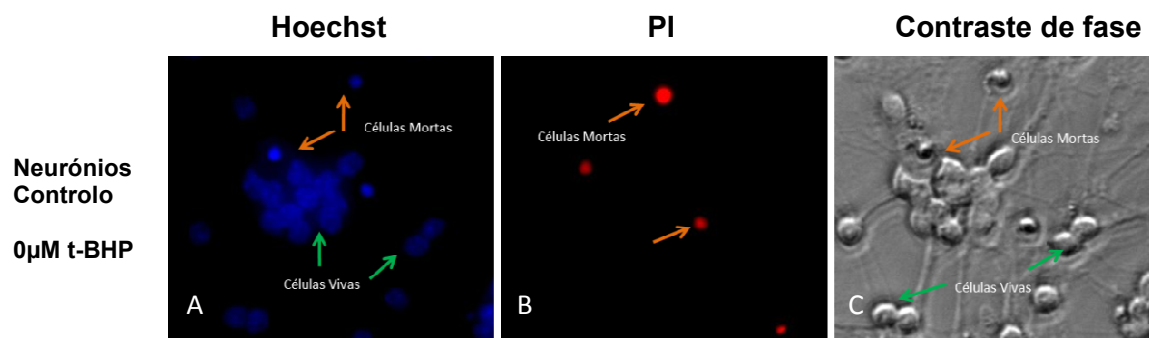


Figura 2 – Imagem representativa de culturas primárias de neurónios de cerebello antes da indução de morte por *stress* oxidativo (t-BHP). Para a avaliação dos parâmetros por microscopia de fluorescência foram utilizados os fluorocromos: Hoechst (2µM) para observação da condensação da cromatina neuronal (núcleos azuis), e Iodeto de Propídio (PI) a 1 µM para a observação da viabilidade celular neuronal (núcleos vermelhos). As setas laranja indicam a as células mortas e as setas verdes indicam as células vivas. É ainda apresentada uma imagem da cultura de neurónios do cerebello, obtida por contraste de fase.

4.1 Estudo do efeito do CO na sobrevivência neuronal num sistema de co-culturas

Sabendo que o CO protege neurónios e astrócitos em culturas isoladas, procedeu-se ao estudo do efeito desta molécula num sistema integrado de co-culturas (astrócitos-neurónios). Este é um sistema mais complexo mas mais fisiológico, pois mimetiza o que acontece no sistema *in vivo*, o que permite retirar conclusões mais exactas.

Inicialmente procedeu-se à realização das culturas de neurónios e astrócitos separadamente. As culturas de neurónios foram efectuadas em placas de 24 poços e os astrócitos, por sua vez, foram cultivados em *inserts* e posteriormente colocados em placas de 24 poços (ver esquema 3, pág.27, materiais e métodos).

Neste sistema os astrócitos corticais cultivados em *inserts* são previamente tratados com soluções saturadas de CO a uma concentração final de 50µM. Após 3 horas, tempo necessário para que o CO actue nas células, foi induzida a morte por *stress* oxidativo (t-BHP 0 a 80µM) nos neurónios e procedeu-se ao estabelecimento das co-culturas. Os *inserts* são adicionados ao poço correspondente na placa onde se encontram os neurónios. Assim permanecem durante 18 horas, até se dar início à contagem celular. É de salientar que os neurónios nunca estiveram em contacto com o CO.

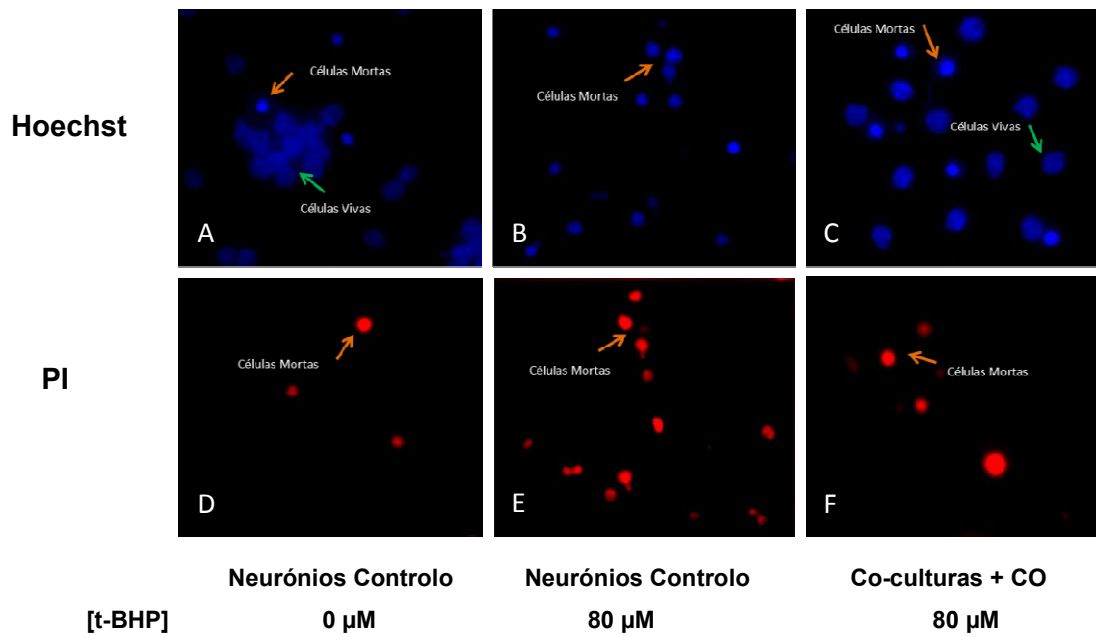


Figura 3 – Imagem representativa das contagens efectuadas em culturas primárias de neurónios de cerebello após da indução de morte por *stress* oxidativo (t-BHP). Para a avaliação dos parâmetros por microscopia de fluorescência foram utilizados os fluorocromos: Hoechst (a 2 µM) para observação da condensação da cromatina neuronal (núcleos azuis), e Iodeto de Propidio (PI) a 1 µM para a observação da viabilidade celular neuronal (núcleos vermelhos). As setas laranja indicam a as células mortas e as setas verdes indicam as células vivas.

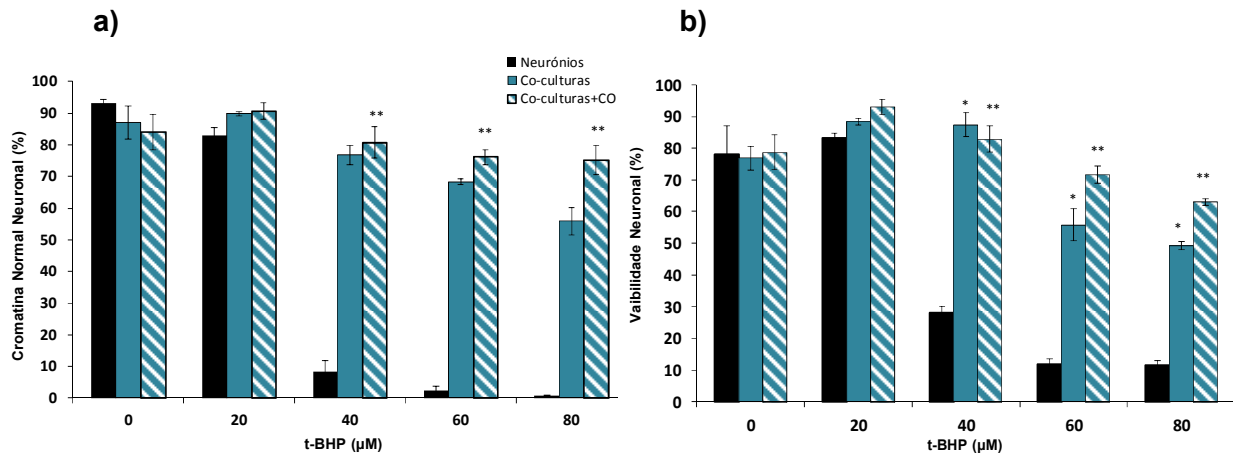


Gráfico 1 - Efeito do CO, em sistema de co-culturas, na apoptose neuronal induzida por *stress* oxidativo (t-BHP). As culturas primárias de astrócitos corticais foram previamente tratadas com CO (50 µM). Após 3horas a morte celular foi induzida por adição de t-BHP (0 a 80 µM) nos neurónios de cerebello e procedeu-se às co-culturas. O indutor de morte actuou por um período de 18horas. Os parâmetros determinados por microscopia de fluorescência foram **a)** condensação da cromatina neuronal (hoechst a 2µM); **b)** viabilidade celular neuronal (iodeto de propidio a 1µM). *p < 0.05 comparado com monoculturas de neurónios, **p < 0.05 comparado com co-culturas.

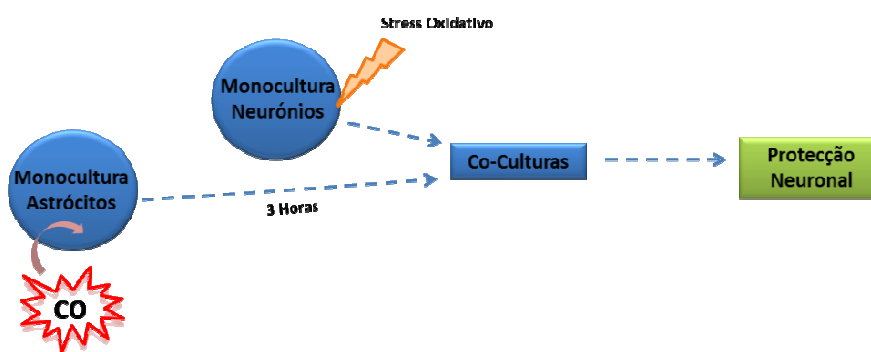
Os resultados observados no Gráfico 1 indicam que as culturas de astrócitos têm um efeito protector nos neurónios, aumentando a viabilidade destas células. Este já é um resultado esperado, pois é função dos astrócitos proteger os neurónios. No entanto, quando é adicionado CO aos astrócitos o efeito protector nos neurónios é mais proeminente e é principalmente observado nas concentrações mais elevadas de *t*-BHP. Este facto é indicador de que, quando ocorre um insulto neuronal mais grave, os astrócitos que previamente foram tratados com CO, exercem sobre os neurónios um efeito mais exacerbado de modo a efectuar uma maior protecção.

No caso da ausência de indutor de morte, os resultados obtidos tanto para os neurónios como para as co-culturas com e sem CO são pouco significativas o que indica que a molécula não é tóxica para as células e que a morte celular observada nos neurónios ocorreu única e exclusivamente devido à adição do indutor de *stress* oxidativo (*t*-BHP).

Deste modo, segundo os resultados obtidos é possível concluir que o CO, que é aplicado nos astrócitos, tem um efeito anti-apoptótico nos neurónios em co-culturas. Mais interessante de observar neste mecanismo é o facto de o efeito protector do CO não estar limitado a um único tipo de células, mas sim ser mediado a partir de outras células, os astrócitos. Isto leva-nos a acreditar que estas células sofrem alterações metabólicas e promovem cascatas de sinalização que vão, por sua vez, aumentar a sua capacidade de protecção em relação às células neuronais.

Através das imagens obtidas por microscopia de fluorescência (Figura 3), é possível observar que após a indução de morte das células neuronais (*t*-BHP 80 μ M), estas apresentam uma taxa de mortalidade extremamente elevada (Figura 3B e E). Os valores são revertidos pela adição de CO aos astrócitos, que por sua vez vai promover o aumento da taxa de sobrevivência de neurónios após um insulto por *stress* oxidativo (Figura 3C e F).

É a partir destes resultados que nasce a hipótese que deu tema a esta dissertação e que está na base de todo o estudo efectuado.



Esquema 4 - Mecanismo de protecção neuronal proposto, através do pré-condicionamento de astrócitos com CO e posterior co-cultura (neurónios - astrócitos).

4.2 Estudo do papel da adenosina e seus receptores na comunicação astrócito-neurónio e na sobrevivência neuronal

4.2.1. Avaliação do efeito da adenosina em monoculturas de neurónios

Estudos prévios no âmbito do presente projecto e anteriormente ao início desta tese, mostraram que a concentração de adenosina é aumentada pela adição de CO.

A adenosina (9- β -D-Ribofuranosyladenine) existe por todo o corpo, sendo que no cérebro está normalmente presente no espaço extracelular. Actuando como um neuromodelador tem a capacidade de regular a libertação de neurotransmissores e modular a sinalização sináptica. Apresenta ainda um efeito neuroprotector, desempenhando um papel na regulação homeostática do SNC, na ocorrência de episódios de hipóxia-isquemia (Sebastião & Ribeiro 2009).

Assim, tendo presente o efeito neuromodelador e neuroprotector da adenosina, foi adicionado às monoculturas de neurónios uma concentração de adenosina de 5 μ M e, por microscopia de fluorescência, observaram-se os resultados abaixo descritos.

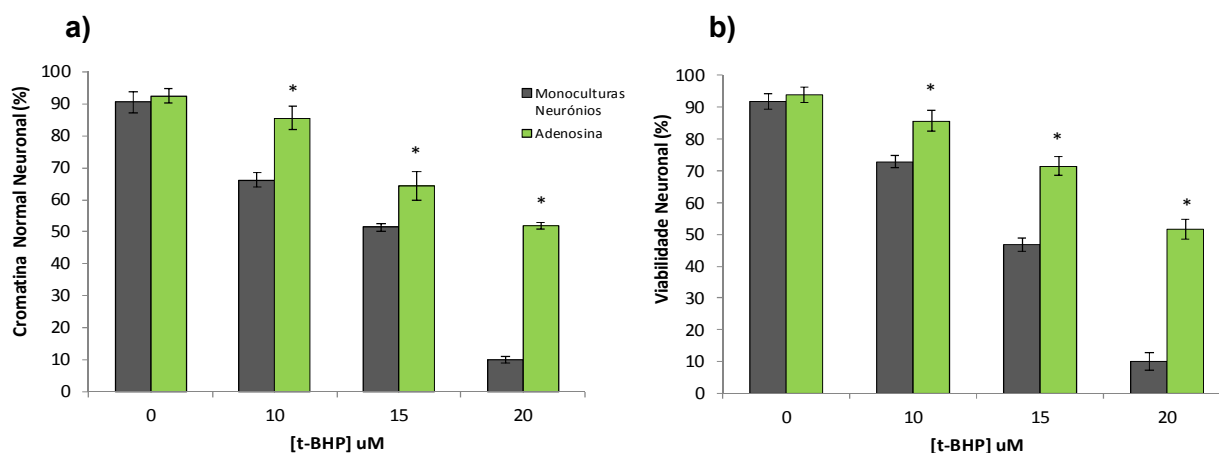


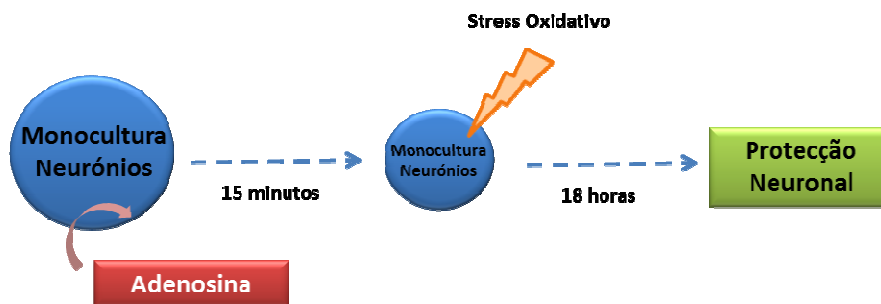
Gráfico 2 - Efeito da adenosina na apoptose neuronal induzida por *stress* oxidativo (*t*-BHP). As culturas primárias de neurónios do cerebelo foram previamente tratadas com adenosina (5 μ M) e após 15 minutos foram adicionadas às várias concentrações de *t*-BHP, que variam entre 0 e 20 μ M num período de 18 horas. Os parâmetros determinados por microscopia de fluorescência foram **a)** condensação da cromatina neuronal (hoechst a 2 μ M); **b)** viabilidade celular neuronal (iodeto de propídio a 1 μ M). * p <0.05 comparado com monoculturas de neurónios.

Através da observação do gráfico 2 é possível constatar que a adição de adenosina às culturas de neurónios leva a um aumento da viabilidade celular. Este efeito é observado para as diferentes concentrações de indutor de morte, que mostram uma redução da morte

celular por condensação da cromatina (**gráfico a**), e por perda da integridade membrana (viabilidade celular), como se pode observar pelo **gráfico b**.

Nas concentrações controlo, ou seja, quando não foi adicionado indutor de morte ($[t\text{-BHP}]=0$), os neurónios com e sem adição de adenosina não apresentam diferenças significativas. Isto indica que o efeito observado pela adição de adenosina não levou à toxicidade das células e que estas morreram única e exclusivamente devido ao efeito do indutor de morte.

Com os dados obtidos é possível concluir que a adenosina tem uma grande influência na protecção neuronal no nosso sistema, em concordância com o que já está descrito em inúmeros trabalhos (Agnati et al. 2010). Deste modo é um forte candidato a estar envolvido na comunicação astrócitos-neurónios.



Esquema 5 - Mecanismo de protecção neuronal proposto, através da adição de adenosina ao meio neuronal e posterior indução de morte.

4.2.2 Avaliação do efeito do agonista de receptores A_{2A} em co-culturas

Os receptores $ADORA_{2A}$, também designados como A_{2A} , são receptores de adenosina conhecidos por atenuar a inflamação e o dano provocados em inúmeros tecidos (Agnati et al. 2010).

Após a indicação dada pelos resultados anteriores de que a adenosina está envolvida na protecção neuronal, foi necessário verificar por que receptores essa protecção era mediada. Para tal foi adicionado aos neurónios um composto que está descrito na literatura como um agonista específico dos receptores A_{2A} , o 2-p- (2Carboxyethyl) phenethylamino-5'-N ethylcarboxamido adenosine hydrochloride hydrate, ou CGS21680.

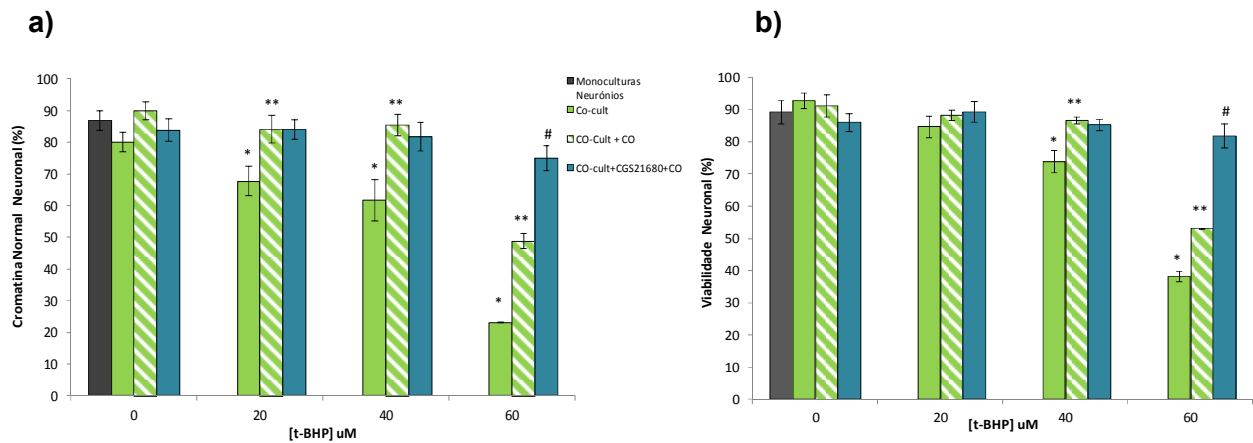
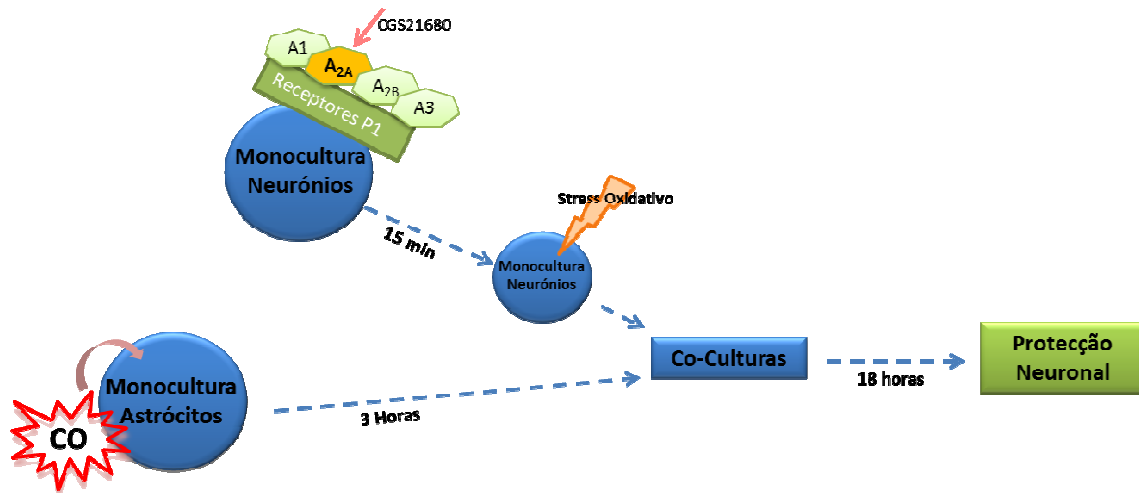


Gráfico 3 - Efeito do agonista CGS21680, em sistema de co-culturas, na apoptose neuronal induzida por *stress* oxidativo (*t*-BHP). As culturas primárias de neurónios do cerebelo são previamente tratadas com CGS21680 (0,01 μM), após 15 minutos foram adicionadas várias concentrações de *t*-BHP, que variam entre 0 e 60 μM e por fim foram efectuadas as co-culturas. O indutor de morte actuou por um período de 18 horas. Os parâmetros determinados por microscopia de fluorescência foram **a)** condensação da cromatina neuronal (hoechst a 2 μM); **b)** viabilidade celular neuronal (iodeto de propídio a 1 μM). **p*<0.05 comparado com monoculturas de neurónios, ***p*<0.05 comparado com co-culturas e #*p*<0.05 comparado com co-culturas+CO.

Tal como previamente indicado, pode observar-se através do gráfico 3 que as co-culturas previnem a morte neuronal. De acordo com a experiência anterior (gráfico 2) um aspecto evidente é que a adição de CO às co-culturas tem um efeito benéfico na viabilidade celular, que se apresenta muito superior.

Nos casos em que é adicionado o agonista CGS21680 observou-se um aumento significativo na percentagem de células vivas. Este efeito é mais exacerbado a elevadas concentrações de *t*-BHP (60μM) relativamente às restantes, nas quais não se observam quaisquer diferenças na adição deste composto.

Estes resultados parecem indicar que, quando ocorre um insulto mais grave por *stress* oxidativo, a adição do agonista promove um incremento na protecção neuronal. Isto significa que os receptores A_{2A} , que são receptores de adenosina mais específicos, estão bastante envolvidos no aumento da viabilidade neuronal. Por sua vez quando o insulto não é tão elevado o efeito do agonista mantém-se igual ao do CO em co-culturas.



Esquema 6 - Mecanismo de protecção neuronal proposto, através do pré-condicionamento de astrócitos com CO, adição do agonista de receptores A_{2A} (CGS21680) e posterior co-cultura (neurónios - astrócitos).

4.2.3 Avaliação do efeito do antagonista de receptores A_{2A} em co-culturas

O SCH59261 (7- (2-phenylethyl) -5-amino-2- (2-furyl) -pyrazolo- [4,3-e] -1,2,4-triazolo [1,5-c] pyrimidine) é um potente e selectivo antagonista de receptores de adenosina A_{2A}, que actua como modelador da actividade neuronal. Está também descrito como um agente protector contra a morte neuronal produzida por isquémia ou excitotoxicidade. Deste modo o antagonista SCH58261 torna-se uma importante ferramenta para o estudo dos receptores de adenosina A_{2A} e o seu papel em várias doenças.

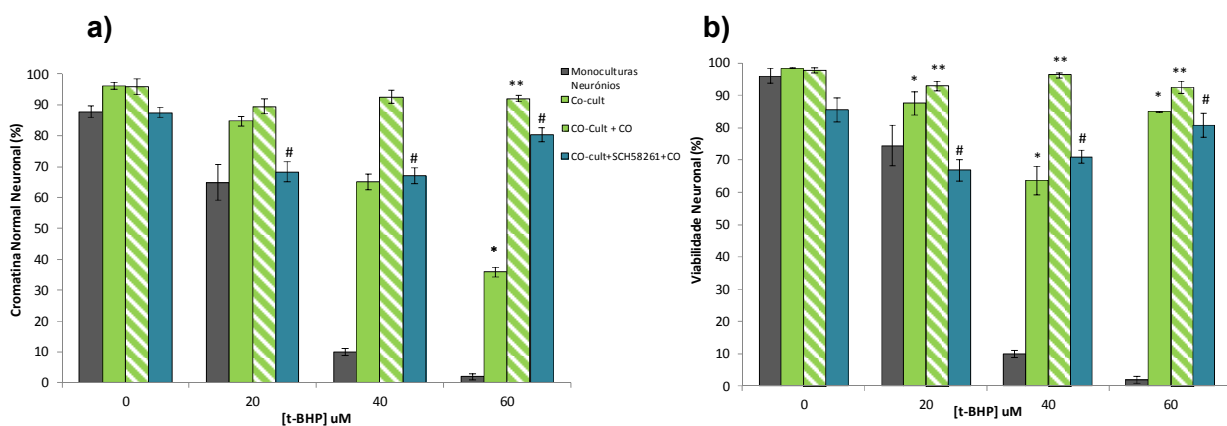
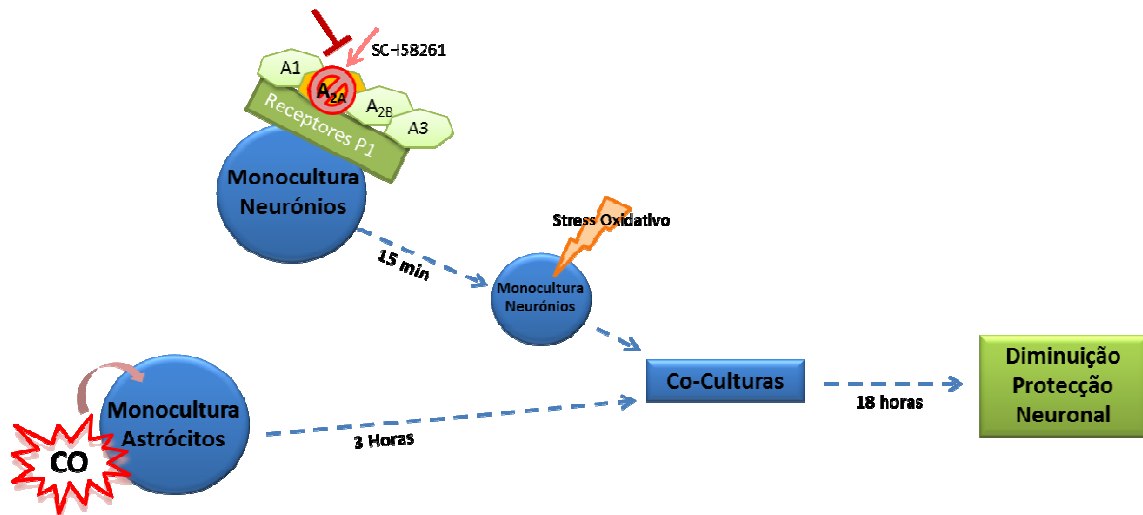


Gráfico 4 - Efeito do SCH58261, em sistema de co-culturas, na apoptose neuronal induzida por *stress oxidativo* (t-BHP). As culturas primárias de neurónios do cerebelo foram previamente tratadas com SCH58261 (1 µM), após 15 minutos foram adicionadas várias concentrações de t-BHP, que variam entre 0 e 60 µM e por fim são efectuadas às co-culturas. O indutor de morte fica a actuar por um período de 18 horas. Os parâmetros determinados por microscopia de fluorescência foram **a)** condensação da cromatina neuronal (hoechst a 2 µM); **b)** viabilidade celular neuronal (iodeto de propídio a 1 µM). *p < 0.05 comparado com monoculturas de neurónios, **p < 0.05 comparado com co-culturas e #p < 0.05 comparado com co-culturas + CO.

Foi possível observar que este reverte o efeito anti-apoptótico do CO em todas as concentrações de t-BHP. A ocorrência desta perda de viabilidade neuronal e a sua elevada diminuição em todas as concentrações de indutor de morte revelam a grande importância destes receptores (A_{2A}) no mecanismo em estudo.

Estes resultados vão confirmar e dar ênfase aos anteriormente obtidos e levam a crer que os receptores A_{2A} estão fortemente envolvidos nos mecanismos de protecção neuronal.



Esquema 7 - Mecanismo de protecção neuronal proposto, através do pré-condicionamento de astrócitos com CO, adição do agonista de receptores A_{2A} (SCH58261) e posterior co-cultura (neurónios - astrócitos).

4.2.4 Avaliação da inibição da ectonucleotidase em neurónios

A adenosina pode ser libertada pelos astrócitos para o meio extracelular de dois modos distintos: através de ENT's (equilibrativenucleoside transportes) e/ou através da degradação da molécula de ATP por acção do enzima ectonucleotidase (Sebastião & Ribeiro 2009).

A complexidade das funções inerentes aos receptores deve-se à presença de muitas enzimas na superfície da célula, que degradam rapidamente os nucleótidos, tal como é exemplo da degradação do ATP (Zimmermann, 2000). Portanto, um efeito aparentemente originado a partir do ATP pode, de facto, envolver o seu produto de hidrólise, a adenosina.

O ARL 67156 (6-N,N-diethyl-D-b-g-dibromomethylene adenosine triphosphate) está descrito como um inibidor selectivo da ecto-ATPase em vários tecidos de diferentes espécies, impedindo a degradação do ATP e consequente produção de adenosina

(Lévesque et al. 2007). Os resultados obtidos pela adição deste inibidor encontram-se no gráfico 5.

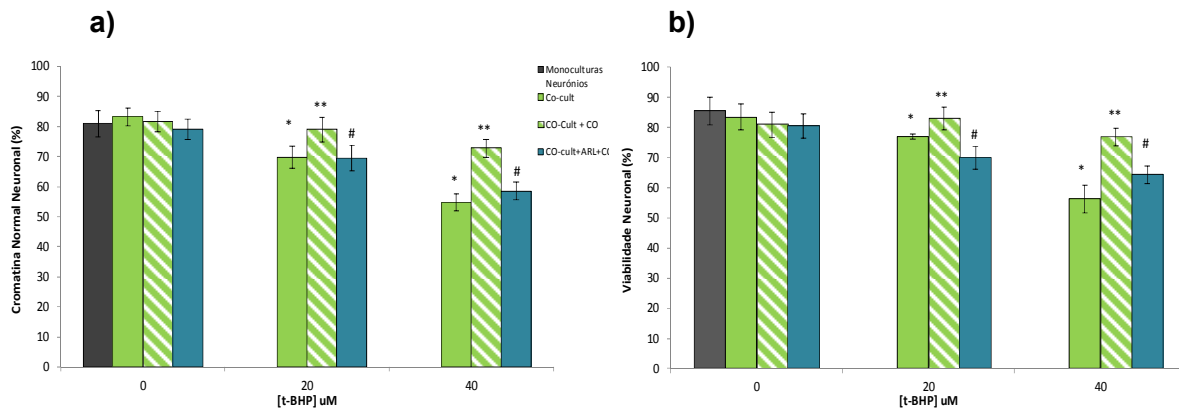


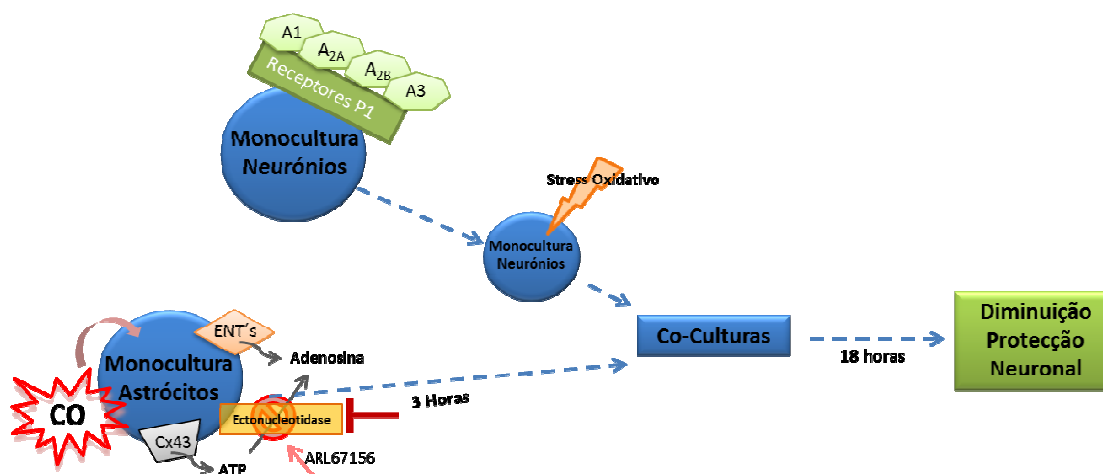
Gráfico 5 - Efeito do inibidor ARL67156, em sistema de co-culturas, na apoptose neuronal induzida por *stress* oxidativo (*t*-BHP). As culturas primárias de neurónios do cerebelo são previamente tratadas com ARL67156 (50 μM), após 5 minutos foram adicionadas várias concentrações de *t*-BHP, que variam entre 0 e 40 μM e por fim foram efectuadas as co-culturas. O indutor de morte actuou por um período de 18 horas. Os parâmetros determinados por microscopia de fluorescência foram **a)** condensação da cromatina neuronal (hoechst a 2 μM); **b)** viabilidade celular neuronal (iodeto de propídio a 1 μM). * $p < 0.05$ comparado com monoculturas de neurónios, ** $p < 0.05$ comparado com co-culturas e # $p < 0.05$ comparado com co-culturas+CO.

Ao impedir a degradação do ATP, através da inibição do efeito da ectonucleotidase pela acção do composto ARL67156, é possível observar que ocorre uma diminuição da viabilidade celular (gráfico 5), indicando que parte da adenosina que protege os neurónios é proveniente da degradação do ATP.

É de salientar que o efeito do composto ARL67156, apenas limita a produção de adenosina pela inibição do efeito do enzima ectonucleotidase. No entanto, no meio extracelular continua a existir adenosina, que é libertada a partir dos ENT's.

O facto de existir esta adenosina no meio extracelular significa que a diminuição da viabilidade celular, observada no gráfico 5, não ocorre devido à inibição total mas sim devido a uma redução na concentração de adenosina. Deste modo, todas as conclusões retiradas pela inibição da ectonucleotidase não podem ser generalizadas à molécula em questão (adenosina) mas apenas a uma parte da concentração de adenosina existente no meio extracelular.

Pelos resultados obtidos podemos especular que, se a libertação de adenosina, pelo referido transportador (ENT's), fosse também inibida juntamente com o bloqueio da ectonucleotidase, a percentagem de células apoptóticas seria razoavelmente mais elevada.



Esquema 8 - Mecanismo de protecção neuronal proposto, através do pré-condicionamento de astrócitos com CO, inibição da degradação do ATP em adenosina pelo enzima ectonucleotidase utilizando o antagonista ARL67156 e posterior co-cultura (neurónios - astrócitos).

4.3 Estudo do papel do ATP e seus receptores na comunicação astrócito - neurónio e na sobrevivência neuronal

4.3.1 Avaliação do efeito do ATP em monoculturas de neurónios

Após se ter observado o efeito da adenosina e dos seus receptores específicos na sobrevivência dos neurónios e tal como é objectivo deste trabalho, foi então testar-se qual o efeito do ATP na protecção das referidas células.

Testes anteriormente efectuados mostraram que, tal como observado para a adenosina, o CO influencia a concentração de ATP intracelular nos astrócitos (Almeida et al., 2011). Por sua vez, foi também observado que, após a adição de CO, a concentração de ATP libertado para o meio extracelular é muito superior ao que se observa em condição normais (sem adição de CO) (dados não apresentados).

Estes dados, juntamente com os dados obtidos para a adenosina, foram o ponto de partida para o estudo da intervenção destas moléculas na comunicação entre astrócitos e neurónios.

O composto $\alpha\beta\text{meATP}$ (α,β -Methyleneadenosine 5'-triphosphate lithium salt) é uma forma sintética de ATP que não se degrada, não permitindo deste modo a sua passagem a adenosina. Activa receptores purinérgicos P2, apresentando uma maior potência do que o ATP para o subtipo P2X.

O referido composto foi, por isso, utilizado com o objectivo de estudar o efeito do ATP na protecção dos neurónios (gráfico 6).

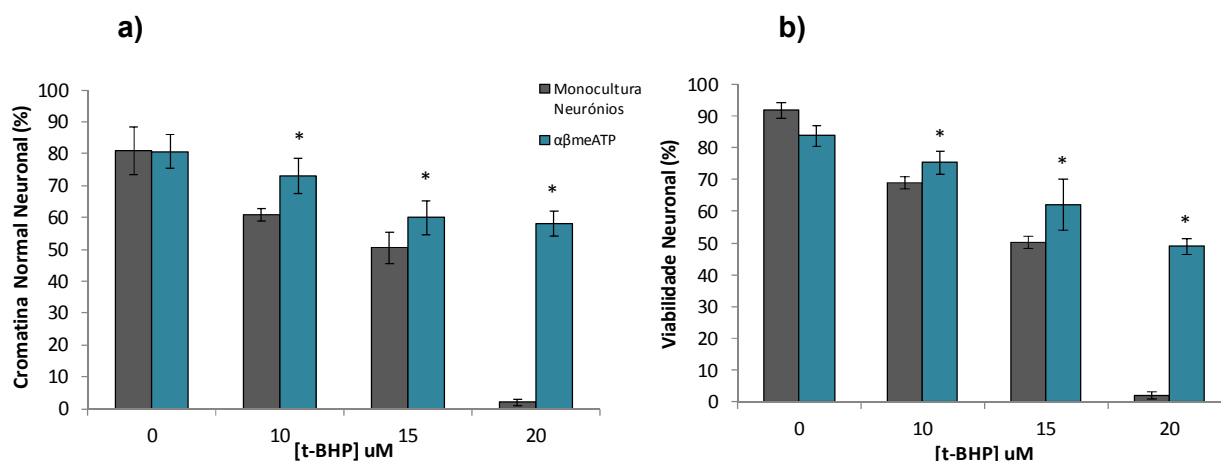
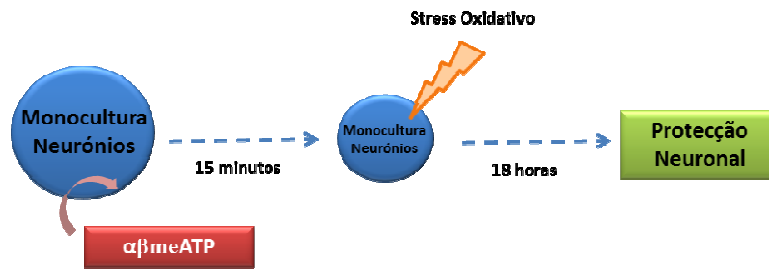


Gráfico 6 - Efeito do $\alpha\beta\text{meATP}$ (ATP que não se degrada) na apoptose neuronal induzida por *stress oxidativo* (*t*-BHP). As culturas primárias de neurónios do cerebello foram previamente tratadas com a $\alpha\beta\text{meATP}$ (10 μM) e após 15 minutos foram adicionadas várias concentrações de *t*-BHP, que variam entre 0 e 20 μM por período de 18 horas. Os parâmetros determinados por microscopia de fluorescência foram **a)** condensação da cromatina neuronal (hoechst a 2 μM); **b)** viabilidade celular neuronal (iodeto de propídio a 1 μM). * $p < 0.05$ comparado com monocultura de neurónios.

É possível constatar que a adição de $\alpha\beta\text{meATP}$ às culturas de neurónios leva a uma redução da morte neuronal nas diferentes concentrações de indutor de morte (gráfico 6). Os efeitos do $\alpha\beta\text{meATP}$ tornaram-se mais proeminentes à medida que as concentrações de indutor de morte são mais elevadas.

Tal como referido anteriormente, quando não foi adicionado indutor de morte ([*t*-BHP]=0), os neurónios com e sem adição de $\alpha\beta\text{meATP}$ não apresentam diferenças significativas. As células vivas encontram-se em valores na ordem dos 80 a 90% o que indica que o efeito observado pela adição de $\alpha\beta\text{meATP}$ não é tóxico para as células e que tal como aconteceu por adição de adenosina, estas morreram apenas e só devido ao efeito do indutor de morte.

Em comparação com os dados obtidos para a adenosina, é possível observar que ambas as moléculas promovem um aumento na viabilidade celular, o que sugere que ambas estão envolvidas no processo de sobrevivência neuronal. No entanto, é de salientar que os neurónios tratados com adenosina apresentam uma taxa de protecção neuronal mais elevada do que o ATP.



Esquema 9 - Mecanismo de protecção neuronal proposto, através da adição de $\alpha\beta$ meATP ao meio neuronal e posterior indução de morte.

4.3.2. Avaliação do efeito do antagonista de receptores P2 em co-culturas

O PPADS (pyridoxalphosphate-6-azophenyl-2',4'-dissulfónico ácido) é um antagonista selectivo que bloqueia os purinoreceptores P2. Nos últimos anos, este antagonista tem vindo a ser utilizado no estudo farmacológico de co-transmissores em tecidos onde o ATP e os neuro-transmissores agem em conjunto (Lin et al. 2005).

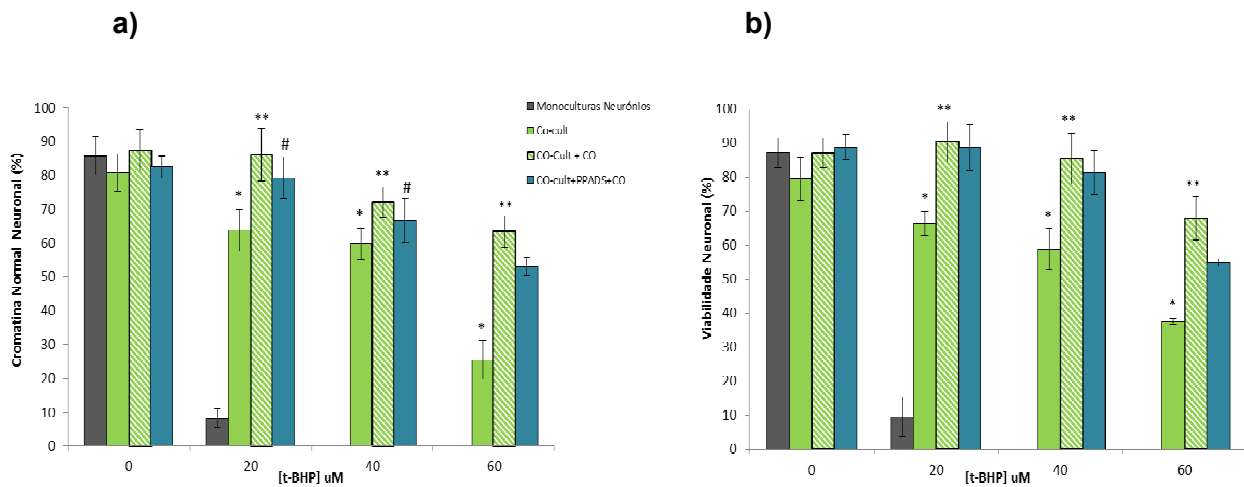


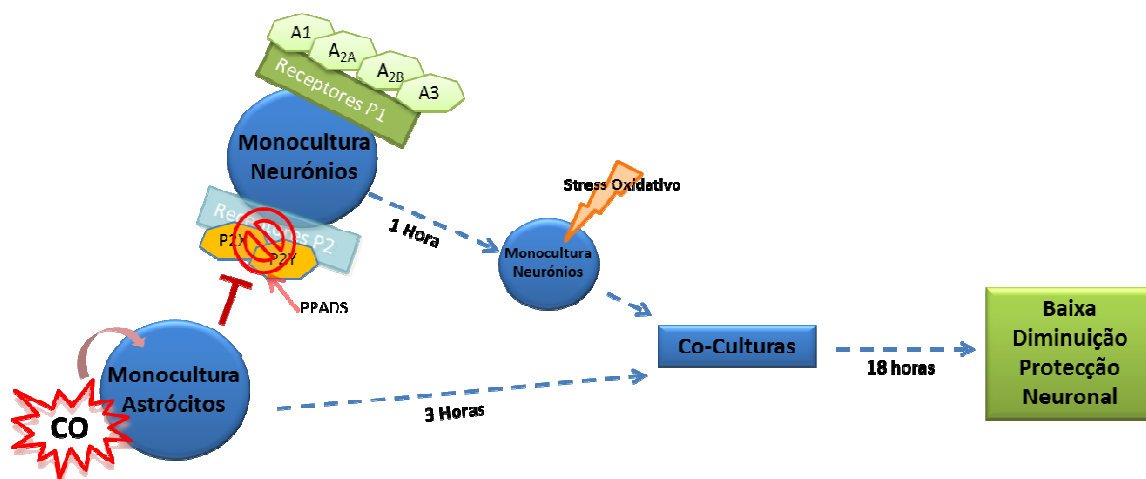
Gráfico 7 - Efeito do PPADS, em sistema de co-culturas, na apoptose neuronal induzida por *stress oxidativo* (*t*-BHP). As culturas primárias de neurónios do cerebelo são previamente tratadas com PPADS (10 μ M), após 1 hora são adicionadas várias concentrações de *t*-BHP, que variam entre 0 e 60 μ M e por fim são efectuadas as co-culturas. O indutor de morte fica a actuar por um período de 18 horas. Os parâmetros determinados por microscopia de fluorescência foram **a)** condensação da cromatina neuronal (hoechst a 2 μ M); **b)** viabilidade celular neuronal (iodeto de propídio a 1 μ M). * $p < 0.05$ comparado com monoculturas de neurónios, ** $p < 0.05$ comparado com co-culturas e # $p < 0.05$ comparado com co-culturas+CO.

A adição do antagonista PPADS reverte ligeiramente o efeito protector do CO nas co-culturas em todas as concentrações de *t*-BHP (gráfico 7). Quando observamos a viabilidade celular (células marcadas com PI) no gráfico 7B, as diferenças entre co-culturas com CO e co-culturas com CO + PPADS, não são significativas. O mesmo é observado para

concentrações de indutor de morte mais elevadas (t-BHP= 60 μ M) no gráfico 7A. Embora alguns apresentem diferenças significativas estas diferenças não são muito grandes.

Estes resultados quando comparados com os resultados obtidos para o antagonista dos receptores de adenosina (SCH58261), mostram que o bloqueio dos receptores A_{2A} promove o aumento da percentagem de morte celular de um modo bastante mais consistente e elevado que o PPADS (antagonista geral de receptores P2). Esta pode também ser uma evidência de que são os receptores A_{2A} (mais específicos) os principais envolvidos no mecanismo de transporte de CO que levam à protecção neuronal.

Tendo em conta que o PPADS é um antagonista geral de receptores P2, o efeito aqui observado pode estar diluído em comparação com os receptores de adenosina. Assim, considerou-se necessário proceder a um bloqueio de receptores P2 mais específicos de modo a verificar se o mesmo efeito ocorre.



Esquema 10 - Mecanismo de protecção neuronal proposto, através do pré-condicionamento de astrócitos com CO, inibição dos receptores P2 através do antagonista PPADS e posterior co-cultura (neurónios - astrócitos).

4.3.3 Avaliação do efeito do antagonista de receptores P2X em co-culturas

Após se ter procedido ao bloqueio dos receptores P2 e se ter verificado que os mesmos, apesar de baixas percentagens, podem estar envolvidos na protecção neuronal. E, de modo a perceber se o efeito observado está relacionado com o facto de o PPADS ser o antagonista geral de receptores P2, decidiu-se aprofundar mais o estudo. Para tal recorreu-se ao bloqueio de subtipos de receptores P2, os receptores P2X que são mais específicos.

A suramina (suramin sodium salt) é conhecida por interagir com enzimas ligadas ao ATP. É um antagonista de receptores P2X que bloqueia receptores purinérgicos ligados à proteína G (Sanada et al. 2002, Vavra et al. 2011).

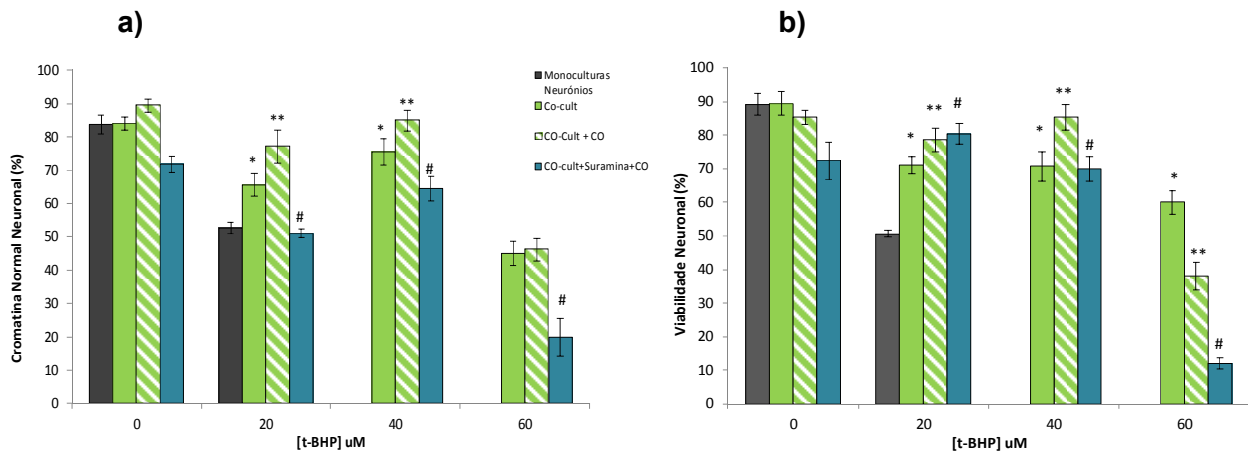
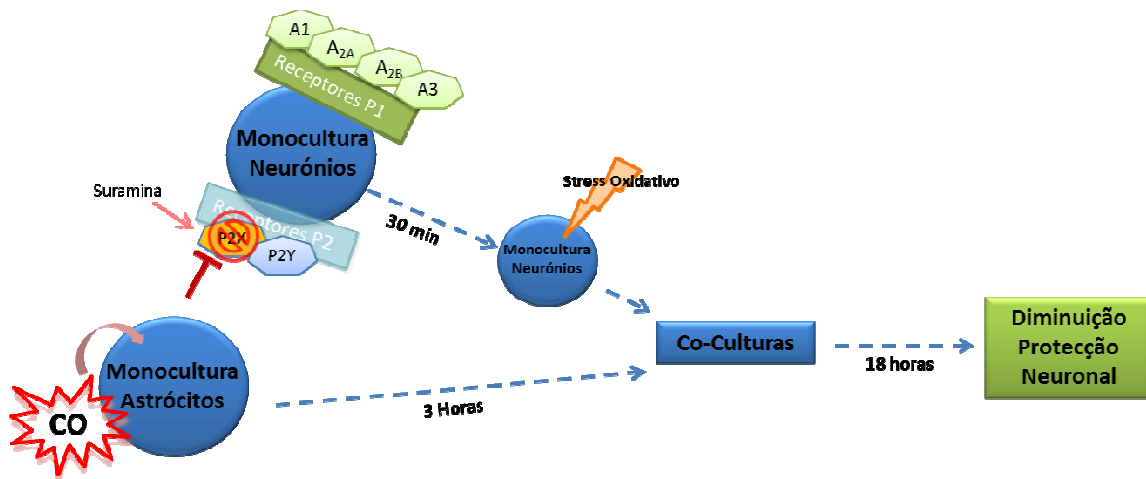


Gráfico 8 - Efeito do antagonista Suramina, em sistema de co-culturas, na apoptose neuronal induzida por *stress* oxidativo (t-BHP). As culturas primárias de neurónios do cerebelo são previamente tratadas com Suramina (30 μM), após 5 minutos foram adicionadas várias concentrações de t-BHP, que variam entre 0 e 60 μM e por fim foram efectuadas as co-culturas. O indutor de morte actuou por um período de 18 horas. Os parâmetros determinados por microscopia de fluorescência foram **a)** condensação da cromatina neuronal (hoechst 2 μM); **b)** viabilidade celular neuronal (iodeto de propídio 1 μM). * $p < 0.05$ comparado com monoculturas de neurónios, ** $p < 0.05$ comparado com co-culturas e # $p < 0.05$ comparado com co-culturas+CO.

É possível verificar que em condições controlo (culturas não sujeitas a *stress* oxidativo no qual t-BHP=0 μM) a adição de suramina promove, só por si, uma diminuição da viabilidade celular. Este facto pode ser indicador de alguma toxicidade, possivelmente pelo facto da sinalização purinérgica ser de extrema importância para a manutenção celular (resultados não apresentados). A adição de suramina levou a uma reversão do efeito protector do CO em todas as concentrações de indutor de morte (gráfico 8). Este resultado pode ter duas interpretações: (i) como numa situação controlo a suramina já promove a morte neuronal, o facto de este em co-culturas reverter o efeito do CO pode estar relacionado com o facto de a própria Suramina ser só por si tóxica, (ii) pode dar a entender que também estes receptores estão envolvidos na protecção neuronal.

Quando comparado com o antagonista de receptores P2 (PPADS), a suramina reverte com maior proeminência o efeito protector do CO, com uma percentagem de morte e níveis de significância mais acentuados. Visto que os receptores P2X são uma subclasse mais restrita é normal que o efeito protector seja diluído quando comparado com um antagonista mais geral P2. Isto é indicador de que, apesar de ser em proporções diferentes, ambos os receptores se encontram envolvidos no mecanismo de protecção pelo CO, sendo este efeito mais evidente no caso dos receptores P2X.



Esquema 11 - Mecanismo de protecção neuronal proposto, através do pré-condicionamento de astrócitos com CO, inibição dos receptores P2x através do antagonista Suramina e posterior co-cultura (neurónios - astrócitos).

4.3.4 Avaliação da inibição da conexina 43 em astrócitos

A conexina 43 (Cx43) encontra-se em diversos de tecidos permitindo trocas moleculares entre o citoplasma da célula e o meio extracelular (Retamal et al. 2007). No sistema nervoso a conexina 43 é expressa nos astrócitos (Li et al. 2005) tendo um papel importante na manutenção das funções neuronais normais através da libertação do ATP. De modo a reforçar as evidências que os resultados anteriores indicam fomos investigar qual o efeito do bloqueio destes hemicanais, impedindo a libertação do ATP para o meio extracelular, na protecção neuronal.

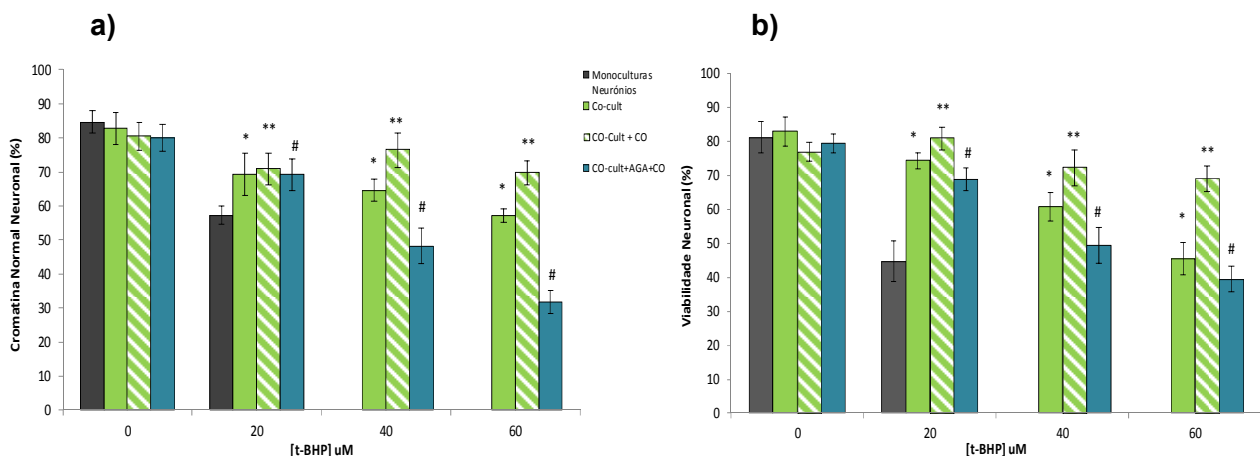


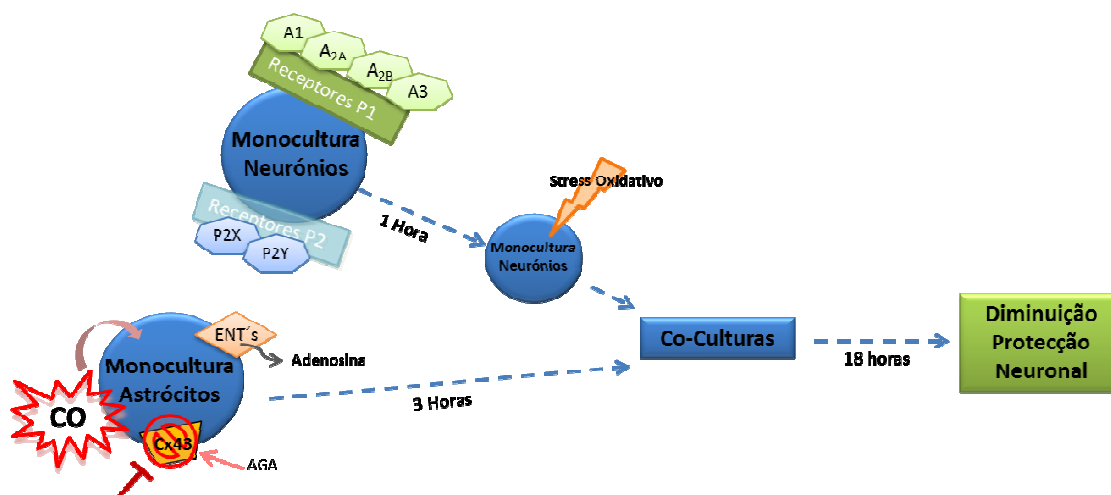
Gráfico 9 - Efeito do inibidor AGA, em sistema de co-culturas, na apoptose neuronal induzida por *stress* oxidativo (*t*-BHP). As culturas primárias de astrócitos corticais são inicialmente tratadas com AGA (15 µM). Após 5 minutos foram adicionadas várias concentrações de *t*-BHP às culturas de neurónios do cerebelo (0 e 60 µM) e por fim foram efectuadas as co-culturas. O indutor de morte actuou por um período de 18 horas. Os parâmetros determinados por microscopia de fluorescência foram **a)** condensação da cromatina neuronal (hoechst a 2 µM); **b)** viabilidade celular neuronal (iodeto de propídio a 1 µM). **p*<0.05 comparado com monoculturas de neurónios, ***p*<0.05 comparado com co-culturas e #*p*<0.05 comparado com co-culturas+CO

É possível observar que em condição de *stress*, a baixa concentração de ATP extracelular promove o aumento da apoptose com diminuição da viabilidade celular. Este efeito é mais evidente em concentrações de indutor de morte elevadas. A adição de AGA reverte com uma elevada relevância o efeito protector no monóxido de carbono (gráfico 9).

Estes resultados encontram-se em congruência com os indicados no gráfico 7, onde se pode observar que o ATP extracelular está extremamente envolvido na protecção neuronal.

Por outro lado, a inibição da libertação de ATP pelos astrócitos faz com que com os níveis de adenosina extracelular sejam também menores. Sendo a adenosina um produto da degradação do ATP, e devido ao facto de este não ser libertado para o meio extracelular, a sua degradação através do enzima ectonucleotidase não vai ocorrer. Como consequência deste efeito, a aquisição de adenosina pelos neurónios vai ser muito inferior ao normal (há ainda adenosina a ser libertada pelos ENT's), o que não vai conferir às células um nível de protecção tão elevado.

Estes resultados poem em consideração o papel das moléculas, ATP e adenosina, na protecção neuronal levando a acreditar que estão ambas envolvidas neste mecanismo. Acreditada-se ainda que , apesar da importância do ATP, a adenosina é molécula alvo no que respeita ao estudo da protecção neuronal através do CO, visto que apresenta duas formas de libertação (via degração do ATP e libertação a partir das ENT's).



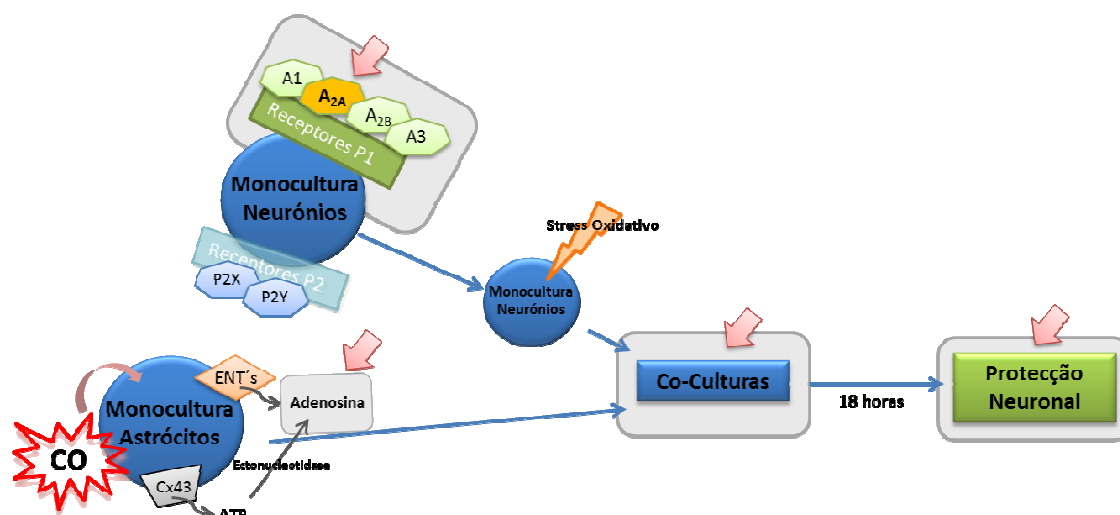
Esquema 12 - Mecanismo de protecção neuronal proposto, através do pré-condicionamento de astrócitos com CO, inibição da saída de ATP pela conexina 43 através do antagonista Suramina e posterior co-cultura (neurónios - astrócitos).

Nos estudos efectuados com adenosina, o agonista do receptor A_{2A} actua provavelmente em sinergia com CO e o antagonista do receptor A_{2A} reverte o efeito protector do CO em co-culturas. O mesmo acontece nos estudos efectuados com ATP, nos quais o agonista dos receptores P2 actua de modo protector e os antagonistas dos receptores gerais (P2) e mais específicos P2X revertem o efeito protector do CO.

Em suma, pode concluir-se que tanto o ATP como a adenosina estão envolvidos na inibição da morte neuronal pelo monóxido de carbono sendo esta mediada via astrócitos.

De entre as duas moléculas estudadas aquela que apresenta efeitos mais proeminentes é a adenosina, nomeadamente ao nível dos receptores A_{2A} , o que nos leva a acreditar que é esta a molécula chave na inibição da morte neuronal através do CO no sistema estudado.

De acordo com os resultados obtidos é proposto um modelo possível do mecanismo de protecção neuronal (esquema 13)



Esquema 13 - Mecanismo de protecção neuronal final proposto. A molécula de adenosina é libertada pelos astrócitos para o meio extracelular, actua nos neurónios através dos receptores A_{2A} promovendo a protecção neuronal contra a Hipóxia- Isquémia e Reperfusão.

Resumidamente, o CO aplicado no astrócitos aumenta a libertação de adenosina e ATP para o meio extracelular. Após um insulto por *stress* oxidativo nos neurónios, ambas as moléculas são assimiladas por receptores específicos nos neurónios. A protecção neuronal ocorre preferencialmente através dos receptores de adenosina A_{2A} , pois apresentam diversas características que levam a considerar a sua grande importância neste mecanismo.

5. Conclusões

A maioria das manifestações celulares de hipóxia isquemia e reperfusão cerebral são iniciadas a partir de uma obstrução vascular, causada pelo baixo teor de oxigénio e nutrientes transportados até às células.

No sistema nervoso central a hipóxia isquémica e reperfusão leva à perda das funções neuronais devido à morte dos neurónios. O monóxido de carbono é, desde há algum tempo, conhecido como sendo uma molécula citoprotectora com uma alta capacidade de sinalização em sistemas fisiológicos e situações fisiopatológicas, como é o caso da HIR. Assim, o trabalho desenvolvido nesta tese baseou-se no uso da molécula CO, de modo a contribuir para a elucidação do mecanismo de protecção neuronal efectuado pelos astrócitos.

A adopção de um sistema *in vitro* de co-culturas (neurónios - astrócitos) revelou-se um meio de estudo altamente eficiente, pois retrata de uma forma mais aproximada que as monoculturas aquilo que ocorre *in vivo*. Testou-se o efeito do pré-condicionamento de astrócitos (células que já por si estão envolvidas no mecanismo de protecção física e estrutural dos neurónios) com CO. Verificou-se que esta molécula promoveu uma cascata de sinalização que levou a um aumento da protecção das células neuronais. Foi deste modo, pela primeira vez testado, o efeito do CO na protecção neuronal, não de um modo directo, mas sim através de outras células: os astrócitos. E os resultados obtidos puseram pela primeira vez em destaque a importância do CO nas interações astrócito-neurónio e a sua capacidade em modelar cascatas de sinalização astrocítica em prol da sobrevivência neuronal. De modo a verificar como este mecanismo de protecção celular ocorre, foi testado o papel de dois intervenientes-chave, o ATP e a adenosina. Tal como anteriormente referido, ambas as moléculas são libertadas pelos astrócitos após a ocorrência de episódios de HIR, aumentando a sua concentração extracelular.

Os estudos efectuados envolveram a utilização de agonistas e antagonistas dos receptores de ATP e adenosina, de modo a inibir ou exacerbar o efeito destas moléculas nas células neuronais após o tratamento dos astrócitos com CO.

Os efeitos da inibição dos receptores de adenosina (receptores P1) foram testados essencialmente através de um dos seus receptores mais específicos, os ADORA2a, visto serem conhecidos como tendo alta afinidade para a adenosina no cérebro. O antagonista utilizado, SCH59261 (7-(2-phenylethyl)-5-amino-2-(2-furyl)-pyrazolo-[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidine), promoveu uma evidente e exacerbada diminuição na viabilidade neuronal revertendo o efeito do CO em todas as concentrações de indutor de morte. Já o

agonista do mesmo receptor, o CGS21680 (2-p-(2Carboxyethyl) phenethylamino-5'-N ethylcarboxamido adenosine hydrochloride hydrate) vai dar ênfase às evidências anteriormente referidas pois promove um aumento da viabilidade neuronal por acção do CO em co-culturas.

Relativamente aos receptores de ATP (receptores P2) foram utilizados como antagonistas os compostos, PPADS (pyridoxalphosphate-6-azophenyl-2',4'-dissulfónico ácido) e a Suramina (suramin sodium salt). Foi possível verificar que a inibição dos receptores P2X promoveu uma maior taxa de mortalidade das células, revertendo o efeito protector do CO. A inibição da saída de ATP dos astrócitos, através da obstrução da conexina 43, levou uma diminuição na percentagem de células neuronais vivas, o que é explicado pela baixa concentração de ATP extracelular e conseqüente diminuição de adenosina. Isto acontece pois não há degradação de ATP e apenas uma porção de adenosina é expelida para o meio através dos ENT's.

Um facto evidente nos resultados obtidos respeitantes à adição de ATP ao meio neuronal, através do $\alpha\beta$ meATP (α,β -Methyleneadenosine 5'-triphosphate lithium salt), um composto que não se degrada, e de adenosina (9- β -D-Ribofuranosyladenine), é que ambas as moléculas promovem o aumento da viabilidade celular. Tais evidências levam a acreditar que estão ambas envolvidas na protecção das células neuronais e são essenciais à inibição da morte por apoptose. A obtenção destes resultados não é surpreendente, pois está em concordância com o que está descrito na literatura e que refere que ambas as moléculas apresentam propriedades neuroprotectoras.

Não obstante existe uma forte evidência de que os receptores A_{2A} , por apresentarem efeitos mais consistentes na prevenção da morte neuronal, sejam os receptores chave envolvidos na protecção neuronal, através dos astrócitos. Assim este trabalho revela não só a importância do CO como molécula endógena e promissora no que respeita à neuroprotecção em episódios de HIR, como também evidência a importância da comunicação e do tráfego metabólico entre as células. É assim necessário prosseguir com o desenvolvimento de novas técnicas e aprofundar os estudos até aqui efectuados.

6. Perspectivas Futuras

Na necessidade de desenvolver novas terapias que envolvam a diminuição dos danos causados por HIR, é necessário proceder ao estudo mais aprofundado de todos os mecanismos inerentes a este tipo de patologia.

Neste trabalho foi observado que a comunicação célula-célula é um aspecto de elevada relevância. Foram analisados diversos aspectos, nomeadamente a contribuição da adenosina e dos seus receptores. Contudo, os testes efectuados basearam-se na aplicação de inibidores farmacológicos. Um passo importante para validar os resultados até aqui obtidos será a utilização de ferramentas de engenharia genética, nomeadamente a inibição genética dos receptores ou do silenciamento da sua expressão.

O primeiro passo a tomar, e tendo em conta o seguimento do que até então foi estudado, será proceder ao bloqueio dos transportadores de adenosina (ENT's) em simultâneo com a inibição da acção do enzima ectonucleotidase verificando assim qual a sua relevância em relação ao bloqueio da saída de ATP (através da inibição da Cx43).

Também interessante será avaliar o efeito conjunto dos vários receptores envolvidos no pré-condicionamento isquémico. Assim propõe-se ainda o aprofundamento do estudo de outros receptores de adenosina, como é o caso dos receptores A₁ e A_{2B} que apesar de baixa afinidade e distribuição estão indicados como envolvidos no pré-condicionamento cerebral isquémico.

Por outro lado, visto que os receptores de adenosina A_{2A} revelaram um grande envolvimento na sobrevivência neuronal, no seguimento deste trabalho, é essencial investigar mais a fundo todo o mecanismo celular e bioquímico que envolve este tipo de receptores em específico.

Alguns estudos indicam que as neurotrofinas (uma família de factores de crescimento), como é o exemplo do BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*), podem ser protectores contra a perda de tecido neuronal (Almli et al. 2000). O BDNF aumenta a transmissão sináptica e regula a proliferação e sobrevivência neuronal (Potenza et al. 2007). E, como as interacções funcionais entre os receptores A_{2A} e o BDNF são bastante conhecidas (Assaife-Lopes et al. 2010), torna-se importante estudar de um modo mais aprofundado, qual o efeito da inibição do BDNF na transmissão sináptica e quais as consequências na sobrevivência neuronal em episódios de HIR por pré-condicionamento com CO.

É de salientar que os resultados obtidos/discutidos nesta tese dizem respeito a estudos *in vitro*. Recorrendo às limitações que estas técnicas possuem, é indiscutível a validação destes resultados em modelos de HIR *in vivo*.

De facto, o CO é uma molécula quimicamente muito estável e reage com substratos. A grande desvantagem é que necessita de ser incorporada a ligações muito fortes, como é o exemplo do carbono e hemoglobina, formando a carboxihemoglobina em maiores concentrações, o que limita a sua potencial aplicação na clínica (Alberto & Motterlini 2007). A substituição de tais condições desvantajosas com uma fonte de CO abre novos caminhos. As CORM's (*CO-releasing molecules*) são um grupo de compostos farmacológicos que se aproximam aos efeitos do CO gasoso mas com a particularidade de libertarem doses controladas de CO no tecido desejado, e são compatíveis com o ambiente fisiológico (Alberto & Motterlini 2007, Zimmermann et al. 2007). Assim, na validação dos testes *in vivo*, para além de se testar o gás em si serão também testadas as reacções subsequentes a este tipo de aplicação, de modo a melhor compreender o seu efeito a longo prazo. Assim sendo, as CORM's são também, em conjunto o uso de engenharia genética, uma excelente perspectiva para fins medicinais e na minimização das consequências da HIR.

Bibliografia

- Abbraccio, Maria P, Boyer, L. et al., 2003. Characterization of the UDP-glucose receptor (re-named here the P2Y14 receptor) adds diversity to the P2Y receptor family. *Trends in pharmacological sciences*, 24(2), pp.52-5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12559763>.
- Abbraccio, M.P. et al., 2009. Purinergic signalling in the nervous system: an overview. *Trends in neurosciences*, 32(1), pp.19-29. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19008000> [Accessed January 2, 2011].
- Abdul, H.M. et al., 2006. Acetyl-L-Carnitine-Induced Up-Regulation of Heat Shock Proteins Protects Cortical Neurons Against Amyloid-Beta Peptide 1 – 42-Mediated Oxidative Stress and Neurotoxicity : Implications for Alzheimer ' s Disease. *Journal of Neuroscience Research*, 408(April), pp.398-408.
- Agnati, L.F. et al., 2010. Receptor-receptor interactions: A novel concept in brain integration. *Progress in neurobiology*, 90(2), pp.157-75. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19850102>.
- Alberto, R. & Motterlini, R., 2007. Chemistry and biological activities of CO-releasing molecules (CORMs) and transition metal complexes. *Dalton transactions (Cambridge, England : 2003)*, (17), pp.1651-60. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17443255> [Accessed June 28, 2011].
- Almli, C.R. et al., 2000. BDNF protects against spatial memory deficits following neonatal hypoxia-ischemia. *Experimental neurology*, 166(1), pp.99-114. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15476265>.
- Alvarez-Maubecin, V. et al., 2000. Functional coupling between neurons and glia. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 20(11), pp.4091-8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10818144>.
- Aschner, M., Sonnewald, U. & Tan, K.H., 2002. Astrocyte modulation of neurotoxic injury. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*, 12(4), pp.475-81. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12408234>.
- Assaife-Lopes, N. et al., 2010. Activation of adenosine A2A receptors induces TrkB translocation and increases BDNF-mediated phospho-TrkB localization in lipid rafts: implications for neuromodulation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 30(25), pp.8468-80. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20573894> [Accessed August 5, 2011].
- Bauer, M. et al., 2008. The heme oxygenase-carbon monoxide system: regulation and role in stress response and organ failure. *Intensive care medicine*, 34(4), pp.640-8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18286266> [Accessed May 31, 2011].
- Bazan, N.G., Marcheselli, V.L. & Cole-Edwards, K., 2005. Brain Response to Injury and. *New York*, 147, pp.137-147.
- Bilban, M. et al., 2008. Heme oxygenase and carbon monoxide initiate homeostatic signaling. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, 86(3), pp.267-79. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18034222> [Accessed August 16, 2010].
- Boczkowski, J., Poderoso, J.J. & Motterlini, R., 2006. CO – metal interaction : vital signaling from a lethal gas. *Trends in biochemical sciences*, 31(11).

- Burnstock, Geoffrey, 2004. Introduction: P2 receptors. *Current topics in medicinal chemistry*, 4(8), pp.793-803. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15078211>.
- Chang, E.F. et al., 2005. Heme regulation in traumatic brain injury: relevance to the adult and developing brain. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 25(11), pp.1401-17. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15917748>.
- Dirnagl, U., Becker, K. & Meisel, A., 2009. Preconditioning and tolerance against cerebral ischemia. *Lancet Neurolog*, 8(4), pp.398-412.
- Doble, a, 1999. The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease: implications for therapy. *Pharmacology & therapeutics*, 81(3), pp.163-221. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10334661>.
- Fields, R.D. & Stevens-Graham, B., 2002. New insights into neuron-glia communication. *Science (New York, N.Y.)*, 298(5593), pp.556-62. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1226318&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Fields, R.D., Burnstock & Geoffrey, 2006. Purinergic signalling in neuron–glia interactions. *Nat Rev Neurosci*, 7(6), pp.423-436.
- Fiskum, G. et al., 2004. Protection against ischemic brain injury by inhibition of mitochondrial oxidative stress. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 36(4), pp.347-52. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15377870>.
- Foresti, R., Bani-Hani, M.G. & Motterlini, R., 2008. Use of carbon monoxide as a therapeutic agent: promises and challenges. *Intensive care medicine*, 34(4), pp.649-58. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18286265> [Accessed August 4, 2010].
- Franke, H. & Illes, P., 2006. Involvement of P2 receptors in the growth and survival of neurons in the CNS. *Pharmacology & therapeutics*, 109(3), pp.297-324. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16102837> [Accessed December 18, 2010].
- Frenguelli, B.G. et al., 2007. Temporal and mechanistic dissociation of ATP and adenosine release during ischaemia in the mammalian hippocampus. *Journal of Neurochemistry*, 101(5), pp.1400-1413. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1471-4159.2006.04425.x> [Accessed September 22, 2011].
- Friberg, H. & Wieloch, T., 2002. Mitochondrial permeability transition in acute neurodegeneration. *Biochimie*, 84(2-3), pp.241-50. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12022955>.
- Friedlander, R.M., 2003. Apoptosis and caspases in neurodegenerative diseases. *The New England journal of medicine*, 348(14), pp.1365-75. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12672865>.
- Galluzzi, L. et al., 2007. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death and Differentiation*, 14(7), pp.1237-1243. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/sj.cdd.4402148> [Accessed August 12, 2010].
- Giffard, R.G. & Swanson, R. a, 2005. Ischemia-induced programmed cell death in astrocytes. *Glia*, 50(4), pp.299-306. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15846803>.
- Gottlieb, R. a et al., 1994. Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes. *The Journal of clinical investigation*, 94(4), pp.1621-8. Available at:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=295322&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

- Gozzelino, R., Jeney, V. & Soares, M.P., 2010. Mechanisms of cell protection by heme oxygenase-1. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 50, pp.323-54. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20055707> [Accessed May 19, 2011].
- Guthrie, P.B. et al., 1999. ATP released from astrocytes mediates glial calcium waves. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 19(2), pp.520-8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9880572>.
- Hu, B.R. et al., 2000. Involvement of caspase-3 in cell death after hypoxia-ischemia declines during brain maturation. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 20(9), pp.1294-300. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10994850>.
- Kroemer, G., 2003. Mitochondrial control of apoptosis: an introduction. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 304(3), pp.433-435. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X03006144> [Accessed January 12, 2011].
- Lee, S.Y. et al., 2003. P2Y receptors modulate ion channel function through interactions involving the C-terminal domain. *Molecular pharmacology*, 63(4), pp.878-85. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12644589>.
- Li, W., Hertzberg, E.L. & Spray, D.C., 2005. Regulation of connexin43-protein binding in astrocytes in response to chemical ischemia/hypoxia. *The Journal of biological chemistry*, 280(9), pp.7941-8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15618229> [Accessed July 12, 2011].
- Lin, Y. et al., 2005. P2 receptor antagonist PPADS confers neuroprotection against glutamate/NMDA toxicity. *Neuroscience letters*, 377(2), pp.97-100. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15740844> [Accessed February 9, 2011].
- Lévesque, S. a et al., 2007. Specificity of the ecto-ATPase inhibitor ARL 67156 on human and mouse ectonucleotidases. *British journal of pharmacology*, 152(1), pp.141-50. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1978278&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 28, 2011].
- Majumder, P. et al., 2007. New insights into purinergic receptor signaling in neuronal differentiation, neuroprotection, and brain disorders. *Purinergic signalling*, 3(4), pp.317-31. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2072925&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed August 23, 2010].
- Mancuso, C. et al., 2006. Mini-Review Heme Oxygenase and Cyclooxygenase in the Central Nervous System : A Functional Interplay. *Journal of Neuroscience Research*, 1391(May), pp.1385-1391.
- Mattson, M., 2003. Mitochondria in cell death: novel targets for neuroprotection and cardioprotection. *Trends in Molecular Medicine*, 9(5), pp.196-205. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471491403000467> [Accessed February 8, 2011].
- Maycotte, P., Guemez-Gamboa, A. & Moran, J., 2010. Apoptosis and autophagy in rat cerebellar granule neuron death: Role of reactive oxygen species. *Journal of neuroscience research*, 88(1), pp.73-85. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19598251> [Accessed September 27, 2010].
- Mehta, A., Flora, S.J.S. & Saxena, G., 2007. Reversal of Lead-Induced Neuronal Apoptosis by Chelation Treatment in Rats : Role of Reactive Oxygen Species and Intracellular Ca²⁺. *Pharmacology*, 322(1), pp.108-116.

- Morest, D.K. & Silver, J., 2003. Precursors of neurons, neuroglia, and ependymal cells in the CNS: what are they? Where are they from? How do they get where they are going? *Glia*, 43(1), pp.6-18. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12761861>.
- Motterlini, R. & Otterbein, L.E., 2010. The therapeutic potential of carbon monoxide. *Nature Publishing Group*, 9(9), pp.728-743. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nrd3228>.
- Nalivaeva, N.N. et al., 2004. Effect of hypoxia/ischemia and hypoxic preconditioning/reperfusion on expression of some amyloid-degrading enzymes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1035, pp.21-33. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15681798> [Accessed February 8, 2011].
- Nicholas, R a, 2001. Identification of the P2Y(12) receptor: a novel member of the P2Y family of receptors activated by extracellular nucleotides. *Molecular pharmacology*, 60(3), pp.416-20. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11502870>.
- Ongini, E. et al., 1997. Adenosine A2A receptors and neuroprotection. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 825, pp.30-48. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9369973>.
- Panickar, K.S. & Norenberg, M.D., 2005. Astrocytes in cerebral ischemic injury: morphological and general considerations. *Glia*, 50(4), pp.287-98. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15846806>.
- Petrache, I. et al., 2011. Heme oxygenase-1 inhibits TNF- α -induced apoptosis in cultured fibroblasts
Heme oxygenase-1 inhibits TNF- α -induced apoptosis in cultured fibroblasts.
- Potenza, R.L. et al., 2007. Adenosine A(2A) receptors modulate BDNF both in normal conditions and in experimental models of Huntington's disease. *Purinergic signalling*, 3(4), pp.333-8. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2072926&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed September 7, 2011].
- Pérez-Pinzón, M.A., 2004. Neuroprotective Effects of Ischemic Preconditioning in Brain Mitochondria Following Cerebral Ischemia. *Journal Of Bioenergetics*, 36(4), pp.323-327.
- Queiroga, C.S.F. et al., 2010. Glutathionylation of adenine nucleotide translocase induced by carbon monoxide prevents mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *The Journal of biological chemistry*, 285(22), pp.17077-88. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2878049&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed February 8, 2011].
- Ralevic, V. & Burnstock, G, 1998. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacological reviews*, 50(3), pp.413-92. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12889142>.
- Ren, J. & Bertrand, P.P., 2008. Purinergic receptors and synaptic transmission in enteric neurons. *Purinergic signalling*, 4(3), pp.255-66. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2486344&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed August 21, 2010].
- Retamal, M. a et al., 2007. Cx43 hemichannels and gap junction channels in astrocytes are regulated oppositely by proinflammatory cytokines released from activated microglia. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 27(50), pp.13781-92. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18077690> [Accessed July 12, 2011].
- Ridet, J.L. et al., 1997. Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends in neurosciences*, 20(12), pp.570-7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9416670>.

- Ryter, S.W. & Otterbein, L.E., 2004. Carbon monoxide in biology and medicine. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 26(3), pp.270-80. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14988928> [Accessed September 2, 2010].
- Sanada, M. et al., 2002. Increase in intracellular Ca(2+) and calcitonin gene-related peptide release through metabotropic P2Y receptors in rat dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience*, 111(2), pp.413-22. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11983326>.
- Sattler, R. et al., 2000. Distinct roles of synaptic and extrasynaptic NMDA receptors in excitotoxicity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 20(1), pp.22-33. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10627577>.
- Schaller, B. & Graf, R., 2002. Cerebral ischemic preconditioning. An experimental phenomenon or a clinically important entity of stroke prevention? *Journal of neurology*, 249(11), pp.1503-11. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12420088> [Accessed February 9, 2011].
- Schulz, J.B., Weller, M. & Moskowitz, M. a, 1999. Caspases as treatment targets in stroke and neurodegenerative diseases. *Annals of neurology*, 45(4), pp.421-9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10211465>.
- Sebastião, A.M. & Ribeiro, J. a, 2009. Triggering neurotrophic factor actions through adenosine A2A receptor activation: implications for neuroprotection. *British journal of pharmacology*, 158(1), pp.15-22. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2795259&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Sei, Y. et al., 1997. Adenosine A3 receptor agonist-induced neurotoxicity in rat cerebellar granule neurons. *Drug Development Research*, 40(3), pp.267-273. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/%28SICI%291098-2299%28199703%2940%3A3%3C267%3A%3AAID-DDR7%3E3.0.CO%3B2-I>.
- Simonian, N.A. & Coyle, J.T., 1996. Oxidative stress in the neurodegenerative diseases. *Annual review of pharmacological Toxicology*, 106(3), p.36:83. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21259049>.
- Takano, T. et al., 2009. Astrocytes and ischemic injury. *Stroke; a journal of cerebral circulation*, 40(3 Suppl), pp.S8-12. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2653262&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Turrens, J.F., 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of physiology*, 552(Pt 2), pp.335-44. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14561818>.
- Vannucci, S.J. & Hagberg, H., 2004. Hypoxia-ischemia in the immature brain. *The Journal of experimental biology*, 207(Pt 18), pp.3149-54. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15299036> [Accessed September 26, 2010].
- Vavra, V., Bhattacharya, a & Zemkova, H., 2011. Facilitation of glutamate and GABA release by P2X receptor activation in supraoptic neurons from freshly isolated rat brain slices. *Neuroscience*, 188, pp.1-12. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21575687> [Accessed July 11, 2011].
- Victorino, G.P. et al., 2009. the Effect of Hypoxia, Reoxygenation, Ischemia, and Reperfusion on Hydraulic Permeability in Rat Mesenteric Venules. *Shock*, 31(3), pp.317-321. Available at: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00024382-200903000-00015> [Accessed May 31, 2011].

- Vieira, H.L. et al., 2000. Permeabilization of the mitochondrial inner membrane during apoptosis: impact of the adenine nucleotide translocator. *Cell death and differentiation*, 7(12), pp.1146-54. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11175251>.
- Vieira, H.L. a, Queiroga, C.S.F. & Alves, P.M., 2008. Pre-conditioning induced by carbon monoxide provides neuronal protection against apoptosis. *Journal of neurochemistry*, 107(2), pp.375-84. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18691384> [Accessed February 8, 2011].
- Wasserfuhr, D. et al., 2008. Protection of the right ventricle from ischemia and reperfusion by preceding hypoxia. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 378(1), pp.27-32. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18488199> [Accessed May 31, 2011].
- Watkins, L.R. & Maier, S.F., 2003. Glia: a novel drug discovery target for clinical pain. *Nature reviews. Drug discovery*, 2(12), pp.973-85. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14654796>.
- Zhang, Y. & Barres, B. a, 2010. Astrocyte heterogeneity: an underappreciated topic in neurobiology. *Current opinion in neurobiology*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20655735> [Accessed August 11, 2010].
- Zimmermann, A. et al., 2007. Cerebroprotective effects of the CO-releasing molecule CORM-A1 against seizure-induced neonatal vascular injury. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 293(4), pp.H2501-7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17630349> [Accessed September 12, 2011].
- Zuckerbraun, B.S. et al., 2007. Carbon monoxide signals via inhibition of cytochrome c oxidase and generation of mitochondrial reactive oxygen species. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 21(4), pp.1099-106. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17264172> [Accessed July 24, 2010].