



Vanessa Rebelo Anjos

**Modelo genético da doença de Parkinson
baseado na sobreexpressão estriatal de alfa-sinucleína**

2013



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

**Dissertação de Mestrado apresentada à
Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra,
2013**

Dissertação de candidatura ao grau de Mestre, sob orientação do Prof. Doutor Luís Pereira de Almeida e co-orientação do Prof. Doutor António Manuel Silvério Cabrita.

Apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, para dar cumprimento ao ponto b do nº2 do artigo 5º do Decreto-Lei Nº 216/92 de 13 de Outubro de 2005 (portaria Nº 107/97 de 17 de Fevereiro).

Trabalho experimental efectuado no Grupo de Vectores e Terapia Génica do Centro de Neurociências e Biologia Celular da Universidade de Coimbra.

Agradecimentos

É o meu dever expressar a minha gratidão a todos aqueles que contribuíram para a realização deste trabalho.

Agradeço ao meu orientador, Doutor Luís Almeida, por todos os ensinamentos que me facultou, pelo tempo despendido e pela exigência e conselhos.

Ao Doutor António Cabrita, co-orientador desta tese, agradeço todos os conhecimentos que me transmitiu nas aulas, assim como todo o entusiasmo pela ciência.

Ao Doutor Manuel Garrido, agradeço toda a colaboração, os ensinamentos e a paciência para comigo e por todo o trabalho elaborado. Sem o seu voto de confiança este trabalho não seria realizado.

Agradeço a todos os colegas de laboratório, especialmente ao Nélio Gonçalves, e colegas de mestrado pela ajuda prestada durante este trabalho.

Agradeço aos meus pais e irmão todo o apoio incondicional, carinho e paciência.

Agradeço também à minha cara-metade pela compreensão e companheirismo.

Por fim, agradeço a todos os meus amigos que de certa forma estiveram presentes ao longo desta etapa e me deram muita força para a acabar.

Dedico este trabalho à minha avó Manuela, que sempre acreditou em mim e sempre me quis ver crescer na vida!

Índice

Resumo	1
Abstract	3
I. Introdução	5
1. Doença de Parkinson	5
a. Contexto.....	5
b. Definição	6
c. Aspectos Históricos.....	8
d. Epidemiologia	10
e. Etiopatogenia.....	11
2. Dopamina e Vias Dopaminérgicas.....	12
3. Núcleos da Base e Vias Motoras	16
4. Alfa-Sinucleína (α -syn).....	19
5. Modelos Animais de DP.....	26
II. Objectivos	34
III. Metodologias	35
1. Animais	35
2. Vectores Virais.....	35
3. Procedimento cirúrgico / Grupos experimentais.....	36
4. Avaliação do comportamento rotatório	37
5. Sacrifício e análise histológica	38
6. Imunohistoquímica.....	39
7. Análise dos níveis proteicos por <i>Western Blot</i>	40
8. Determinação de Dopamina por HPLC.....	41
9. Análise de dados e estatística	41
IV. Resultados	42
1. Infecção estriatal com vírus adeno-associados.....	42
2. Transporte retrógrado de α -sinucleína	44
3. Comportamento rotatório após sobreexpressão intra-estriatal de α -syn.....	45

4. A sobreexpressão de α -syn no estriado altera os níveis de DA, mas não dos seus transportadores, nem receptores	46
5. A sobreexpressão de α -syn no estriado induz alterações de imunoreactividade das proteínas DARPP-32 e GFAP	48
6. Núcleos talâmicos afectados pela sobreexpressão de α -syn estriatal.....	51
V. Discussão.....	52
VI. Conclusões	58
VII. Bibliografia.....	59

Resumo

A doença de Parkinson (DP) é uma doença neurodegenerativa progressiva que se caracteriza, a nível neuropatológico, pela degeneração dos neurónios dopaminérgicos da substância negra *pars compacta*, conseqüente perda de dopamina no estriado, e pela presença de corpos de Lewy ricos em α -sinucleína, entre outras proteínas.

Estudos recentes em modelos celulares sugerem que a migração da α -sinucleína de célula para célula poderá contribuir para a progressão da doença. Neste trabalho avaliou-se o impacto da sobreexpressão e transporte da proteína α -sinucleína, *in vivo*, após transdução do cérebro de ratos, no estriado, com vectores virais adeno-associados que codificam para a α -sinucleína e para a proteína fluorescente verde (GFP).

Investigámos a localização e o transporte da α -sinucleína entre neurónios e avaliaram-se as alterações neuropatológicas e comportamentais. Para este efeito estudou-se o comportamento rotatório induzido por agonistas dopaminérgicos e mediram-se os níveis do neurotransmissor dopamina por HPLC. Efectuaram-se análises *post-mortem* por imunohistoquímica, avaliando marcadores da DP, tais como a tirosina hidroxilase; e por western blot avaliaram-se os níveis de transportadores e receptores de dopamina, bem como de GFAP.

Observámos que a presença de α -sinucleína não se circunscreveu aos neurónios transduzidos com os vectores, sendo detectada na substância negra *pars compacta* em células que não exibiam fluorescência para a proteína GFP, utilizada neste estudo como marcador de transdução. A expressão de α -sinucleína induziu alterações comportamentais após administração de anfetamina e apomorfina, resultando em rotação ipsilateral ao hemisfério transduzido com os VAA- α -syn+eGFP. Neste hemisfério observámos também uma tendência para aumento dos níveis de DA no estriado e aumento significativo no córtex motor. Em oposição, a imunoreactividade para a TH no estriado e substância negra *pars compacta* apresentou-se ligeiramente diminuída, acontecendo o mesmo aos níveis dos

receptores D₂ e à imunoreactividade para a VMAT-2 e significativamente diminuída para a proteína DARPP-32. Ao contrário, os níveis da proteína GFAP mostraram-se elevados em relação ao hemisfério contralateral.

Em resumo, observámos que a α -sinucleína é transportada de célula para célula, que a sua sobreexpressão no estriado causa alterações neuropatológicas moderadas nessa região, mas não na substância negra *pars compacta*, e que resulta em modificações funcionais ao nível do comportamento motor.

Os resultados obtidos sugerem que a estratégia desenvolvida permite produzir um modelo animal das fases iniciais da DP, que poderá contribuir para o esclarecimento dos mecanismos envolvidos na patogénese da doença e na avaliação de novas terapias para a mesma.

Palavras-chave: Doença de Parkinson, α -sinucleína, neurotoxicidade, comportamento rotacional, núcleos da base, via nigroestriatal.

Abstract

Parkinson's disease (PD) is a progressive neurodegenerative disorder that is characterized by degeneration of dopaminergic neurons of substantia nigra *pars compacta*, striatal loss of dopamine and presence of Lewy bodies rich in α -synuclein and other proteins.

Recent studies in cellular models suggest that migration of α -synuclein from cell to cell may contribute to disease development. Therefore, this study evaluated *in vivo* the impact of α -synuclein overexpression and transport in the rat brain. For this purpose we transduced the rat brain, within the striatum, with adeno-associated viral vectors encoding α -synuclein and green fluorescent protein (GFP).

We studied the localization and transmission of α -synuclein between neurons and assessed the impact of this transmission regarding the neuropathological and behavioral changes. To evaluate behavior we used rotational tests, induced by dopaminergic agonists, and the levels of the neurotransmitter dopamine were measured by HPLC. After the sacrifice of the animals some *post-mortem* analyzes were performed: by immunohistochemistry we looked for common markers of PD such as tyrosine hydroxylase; by western blot we evaluated the expression of some proteins such as dopamine transporters, dopamine receptors and also GFAP.

We observed that upon apomorphine and amphetamine administration rats exhibited ipsilateral rotation to the AAV- α -syn+eGFP transduced hemisphere, where we detected an increase in DA levels in striatum and motor cortex. TH immunoreactivity in striatum and substantia nigra *pars compacta* appeared slightly decreased as well as the D₂ receptors levels and VMAT-2, a decrease that was most pronounced regarding the DARPP-32 protein immunoreactivity. On the contrary, GFAP protein levels were increased compared to contralateral hemisphere.

In conclusion, we observed that α -synuclein is transported from cell to cell and its overexpression induces functional changes in behavior and neuropathological changes in striatum, but not in substantia nigra *pars compacta*, within the time frame of the study.

These results suggest that the strategy developed results in an animal model that mimics early stages of PD, which can contribute to elucidation of the mechanisms involved in the pathogenesis of the disease and evaluation of new therapies.

Keywords: Parkinson's disease, α -synuclein, neurotoxicity, rotational behavior, basal ganglia, nigrostriatal pathway.

I. Introdução

1. Doença de Parkinson

a. Contexto

Nos últimos anos vem-se a assistir a mudanças críticas na estrutura etária da população mundial, observando-se uma diminuição progressiva da população jovem e, em oposição, um aumento da população idosa. A diminuição da mortalidade e a diminuição dos níveis de fertilidade têm contribuído para o envelhecimento da população mundial.

Em meados do século XX havia 14 milhões de pessoas em todo o planeta com 80 anos ou mais. Em 2050, espera-se que este número passe para 400 milhões a nível mundial. Estima-se que em 2050, 2 mil milhões de pessoas terão 60 anos de idade ou mais (OMS, 2012).

Em Portugal, no ano 2002, a percentagem de idosos era superior à dos jovens, facto que explica o aumento do Índice de Envelhecimento (IE), que traduz o rácio entre a população idosa e a população jovem (INE, 2004). Em 2006 o panorama mantinha-se, sendo que a população idosa representava 17,3% da população total, face a 15,5% da população jovem (INE, 2007). Em 2006 por cada 100 jovens residiam em Portugal 112 idosos (INE, 2007). Estima-se que em 2060 residam no território nacional cerca de 3 idosos por cada jovem (INE, 2009).

Devido ao envelhecimento da população mundial prevê-se um aumento da prevalência de doenças degenerativas para as quais a idade é um factor de risco.

A Doença de Parkinson é uma destas doenças, em que dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) indicam que a prevalência desta doença irá continuar a aumentar e passará a tratar-se de um assunto importante de saúde pública (OMS, 1998).

De acordo com a Organização das Nações Unidas (ONU), existem pelo menos 4 milhões de pessoas no mundo com a Doença de Parkinson (ONU, 2012).

b. Definição

A Doença de Parkinson (DP) é uma das doenças neurológicas mais comuns na população idosa, sendo a segunda doença neurodegenerativa mais prevalente a seguir à doença de Alzheimer. A DP é uma doença progressiva predominantemente motora caracterizada por tremor em repouso, sendo este o sinal mais evidente da doença; por bradicinesia, que consiste na lentidão dos movimentos voluntários e é responsável pelo início da incapacidade do doente; por rigidez muscular, que pode ser definida como o aumento da resistência da articulação na execução de movimentos; e também por instabilidade postural, ou seja, o desequilíbrio que se torna patente durante a marcha ou quando o doente muda de direcção (Fig.1) (Okun *et al.*, 2009). Estes sintomas são designados de sinais cardinais. O fenótipo motor é resultado da degeneração dos neurónios dopaminérgicos localizados na substância negra (SN). A região possui este nome, porque apresenta coloração escura, que permite a sua identificação a olho nu em corte do cérebro e se deve à oxidação da dopamina gerando melanina, um pigmento de cor escura. A DP é também caracterizada pela presença de corpos de Lewy, os quais constituem uma mistura heterogénea de proteínas e lípidos. O núcleo lipídico destas inclusões é rodeado por elementos filamentosos os quais são constituídos por uma variedade de proteínas, entre as quais a ubiquitina e a α -sinucleína (Singh, 2007).

Os sintomas manifestam-se após degeneração de aproximadamente 50-60% dos neurónios dopaminérgicos da SN e quando existe, em simultâneo, uma perda de 70-80% de dopamina no estriado.

Contudo, outras populações neuronais também são afectadas pela DP, tais como os neurónios catecolaminérgicos, serotoninérgicos e noradrenérgicos. Pensa-se que estas alterações estejam ligadas aos défices cognitivos assim como aos sintomas psiquiátricos da doença.

Apesar de ser classicamente considerada uma doença do sistema motor, os doentes com DP também apresentam outros sintomas como perda de olfacto, distúrbios do sono, depressão e declínio cognitivo, que podem manifestar-se nos

estágios iniciais da doença, antes mesmo de aparecerem os sinais motores da mesma (Yanagisawa, 2006).

O tratamento disponível é apenas sintomático (Lev *et al.*, 2003), assentando no fármaco levodopa (Abbott, 2010) associado a inibidores da metabolização de dopamina e agonistas dopaminérgicos. Estes tratamentos não permitem bloquear a progressão da doença e causam efeitos secundários indesejáveis pelo que a investigação de tratamentos alternativos é motivo de intensa actividade de investigação para a DP (Williams, 2010). Nos últimos anos, a estimulação cerebral dos núcleos profundos passou a ser usada na clínica nos casos mais graves. Outras estratégias diversas, como a terapia celular e a terapia génica, ainda se encontram em fases experimentais, mas têm produzido resultados promissores (Smith, 2010).



Figura 1. Representação da sintomatologia e evolução da mesma na Doença de Parkinson. Sinais cardinais característicos da doença: tremor em repouso, bradicinesia, rigidez muscular e instabilidade postural. Adaptado das ilustrações de www.jieun-kim.com.

c. Aspectos Históricos

A DP foi descrita pela primeira vez em 1817 por um médico inglês de nome James Parkinson no seu livro intitulado *An essay on the Shaking Palsy* (Fig.2). Parkinson definiu os sintomas, o diagnóstico diferencial e fez considerações sobre a etiologia. A patologia, que foi definida pelo mesmo como *paralysis agitans* (paralisia agitante), foi caracterizada pela presença de movimentos tremulares involuntários, com diminuição da força muscular, tendência de inclinação do tronco para a frente e alteração da marcha. Para além da descrição das alterações motoras típicas, Parkinson afirmou que “os sentidos e o intelecto não estão afectados”, o que se comprovou mais tarde não corresponder inteiramente à realidade (Parkinson, 1817).

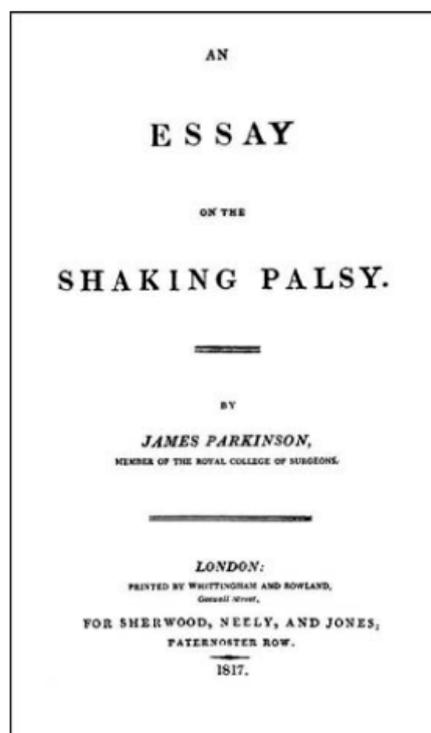


Figura 2. Página frontal da publicação *An Essay on the Shaking Palsy* de James Parkinson. Parkinson descreve uma pequena série de temas com distintivas características. Apesar de ter tido a oportunidade de examinar indivíduos em estudo, algumas das suas reflexões foram baseadas apenas em observações. Adaptado de *Handbook of Parkinson's Disease*, 2007.

Anteriormente a James Parkinson, a literatura médica cita descrições parciais da doença, como aquelas realizadas por Galeno e por Leonardo da Vinci. Descrições de sintomas parkinsonianos aparecem também em textos egípcios e indianos da antiguidade.

Por volta de 1875, o neurologista francês Jean Martin Charcot (considerado o “pai da neurologia”) sugeriu o nome Doença de Parkinson (*la maladie de Parkinson*) para sua introdução na literatura médica, reconhecendo o mérito daquele que tão bem havia descrito a doença. Charcot também contribuiu de forma notável para uma melhor definição e conhecimento da doença. É a Charcot que se deve a definição dos quatro sinais cardinais da doença, a apresentação de critérios para o diagnóstico diferencial e a sugestão do primeiro tratamento para a doença.

Apesar da compreensão dos aspectos clínicos e da evolução da DP, foi somente a partir da metade do século XX que ocorreram avanços mais significativos no conhecimento da patologia da doença e no tratamento dos seus sintomas. Em 1919, Tretiakoff descreveu a redução no número de neurónios na substância negra de doentes com DP (Kapp, 1992). Em 1967, Carlsson descobriu que a administração de levodopa, precursor da dopamina, permitia reverter os sintomas motores de ratos tratados com reserpina, fármaco que inibe o transporte de catecolaminas (Carlsson, 1967). Em 1968 são publicados os primeiros resultados positivos desta terapêutica.

d. Epidemiologia

A DP é observada em todos os países, grupos étnicos e classes socio-económicas (Ropper; Brown, 2005). É uma doença do envelhecimento, com uma prevalência gradualmente maior a partir dos 60 anos de idade. A doença atinge aproximadamente 1% da população mundial com idade superior a 65 anos e prevê-se que com o envelhecimento da população os valores da incidência e da prevalência tendam a aumentar significativamente nas próximas décadas (Levy & Ferreira, 2003). Os estudos divergem quanto ao predomínio de género, mas na maioria desses estudos é frequente observar-se a doença no sexo masculino, numa razão de 2:1 em relação ao sexo feminino (Van Den Eeden *et al.*, 2003). Há evidências que esta diferença se deve, sobretudo, às hormonas sexuais, nomeadamente o estrogénio, hormona identificada em vários estudos como sendo neuroprotectora (Gillies *et al.*, 2004). Estima-se que, em termos globais, entre 12.000 a 15.000 pessoas sejam afectadas pela doença em Portugal.

e. Etiopatogenia

A etiologia e patogenia da DP ainda são obscuras, o que leva, por parte de alguns autores, à sua classificação como Doença de Parkinson Idiopática. No entanto, existem alguns casos genéticos da DP com causas já identificadas.

Diversas hipóteses têm sido propostas para explicar a sua origem e para cada uma delas existem evidências experimentais a favor e contra, sugerindo que esta doença se deva a uma combinação de factores já conhecidos e de outros que ainda possam ser descobertos. Alguns dos factores que estarão relacionados com a sua génese poderão ser as alterações genéticas, factores ambientais, excitotoxicidade, neuroinflamação, défices mitocondriais e stresse oxidativo. A hipótese que é consensualmente aceite é de que a DP é uma doença multifactorial com determinantes genéticos, ambientais e relacionados com o envelhecimento (Shannon, 2004). Embora a DP de causa estritamente genética seja uma ocorrência bastante rara, verifica-se uma tendência para a agregação familiar de casos. A evidência acerca da existência de uma componente genética na DP é crescente. Contudo, a DP herdada de forma dominante não representará mais de 5% dos casos no contexto da população em geral (Tanner *et al.*, 1999). As mutações da α -sinucleína não foram, ainda, identificadas na DP esporádica. Muita da investigação actual nesta área vai no sentido de compreender de que forma estas mutações estão implicadas no processo neuropatológico e na morte neuronal que conduzem às manifestações clínicas da DP.

Têm sido relacionados factores epidemiológicos como exposições ambientais, ocupacionais e estilos de vida com o desenvolvimento de DP. Estudos epidemiológicos confirmam que a exposição a metais pesados ou toxinas orgânicas está associada ou a um maior risco de DP ou a um início mais precoce da doença (Tsai *et al.*, 2002). Por outro lado, um papel protector foi sugerido para as dietas ricas em antioxidantes bem como para a cafeína e nicotina.

2. Dopamina e Vias Dopaminérgicas

A dopamina (DA) é um neurotransmissor predominante no cérebro, onde controla uma grande variedade de funções tais como as actividades locomotora, cognitiva e emocional e a regulação endócrina, entre outros. Esta catecolamina também desempenha um papel importante na função cardiovascular, na libertação de catecolaminas, secreção de hormonas, função renal e gastrointestinal (Missale *et al.*, 1998).

O sistema dopaminérgico tem sido estudado por vários investigadores nos últimos 30 anos, principalmente devido ao envolvimento da desregulação da transmissão de dopamina em patologias como a Doença de Parkinson, Esquizofrenia e Síndrome de Tourette (Missale *et al.*, 1998).

A dopamina é sintetizada no cérebro através da actividade da enzima tirosina hidroxilase (TH), que converte o aminoácido tirosina, captado para o interior do terminal adrenérgico, em L-DOPA, que por sua vez é descarboxilado para formar a DA e posteriormente a noradrenalina (Fig.3). A taxa de síntese de DA é modulada pela actividade da TH e pode ser atenuada pela activação dos auto-receptores localizados nos terminais pré-sinápticos (Jang, 2011).

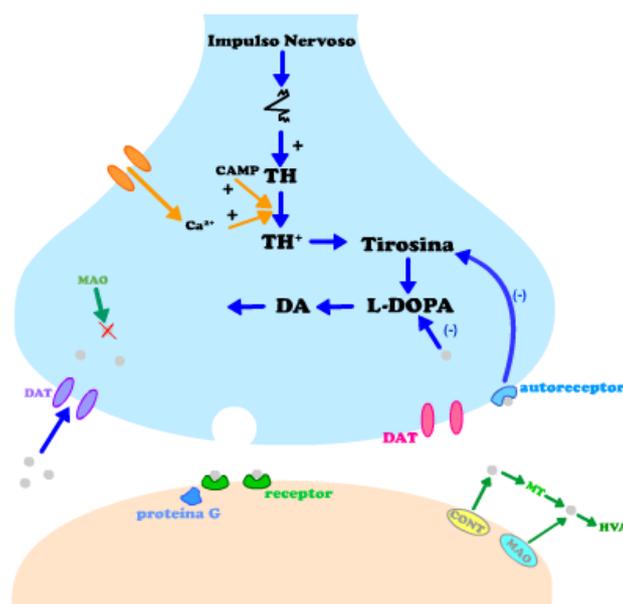


Figura 3. Produção e libertação de dopamina. Após impulso nervoso há activação da enzima TH e esta vai converter o aminoácido tirosina em L-DOPA e este será convertido em DA. A DA é libertada e captada por receptores pré-sinápticos. As enzimas COMT e MAO vão converter a DA em DOPAC e HVA. O excesso de DA é recaptado pelo neurónio pré-sináptico através da DAT. Adaptado de www.biomedicinapadiao.com.

A DA é armazenada pelas vesículas sinápticas e libertada por exocitose quando existe um estímulo por um impulso nervoso. Actua em receptores específicos presentes no sistema nervoso central (SNC), conhecidos como receptores dopaminérgicos. A nível pós-sináptico, a DA pode actuar em receptores das famílias D₁ (D₁ e D₅) ou D₂ (D₂, D₃ e D₄). Existem também receptores pré-sinápticos inibitórios, do tipo D₂, que estão localizados tanto nos terminais como nos corpos celulares. A identificação destes receptores transformou profundamente os conhecimentos anatómicos e farmacológicos da acção da DA, sendo que têm apresentado algumas alterações em situações patológicas. Na Esquizofrenia, os transportadores de dopamina (DAT) e de receptores D₁ têm níveis normais, no entanto os de receptores D₂ encontram-se consideravelmente elevados (Salum, 2008). A perda de DA mesencefálica na doença de Parkinson é acompanhada por uma perda de DAT e um aumento dos níveis de ambos os receptores D₁ e D₂ (Jang, 2011).

Existem quatro vias dopaminérgicas principais que partem de neurónios localizados na substância negra *pars compacta* (SNpc) e na área tegmentar ventral (ATV): nigroestriatal, mesolímbica, mesocortical e tuberoinfundibular (Fig.4). A via nigroestriatal é a maior e concentra cerca de 80% da DA encefálica. Projecta-se da SNpc do mesencéfalo para o estriado dorsal, em particular, núcleo caudado e *putamen* e está envolvida no controlo motor. A via mesolímbica tem origem em corpos celulares da ATV. Estas células projectam-se para várias zonas do sistema límbico, incluindo o núcleo *accumbens*, amígdala, hipocampo, córtex cingulado e córtex entorrinal. Os neurónios dopaminérgicos mesolímbicos estão relacionados com as propriedades robustas de várias drogas de abuso, incluindo os psicoestimulantes, tais como a cocaína e anfetamina. Os corpos celulares dos neurónios do sistema mesocortical também estão localizados na ATV. Os seus axónios enviam projecções excitatórias para o córtex pré-frontal, afectando funções como a formação de memória de curto prazo, motivação, atenção e planeamento de estratégias para resolução de problemas. Na via tuberoinfundibular, os neurónios dopaminérgicos são projectados do hipotálamo para a eminência mediana e para a hipófise, cujas secreções são por eles

reguladas. Detectou-se a co-localização com vários neuropeptídeos e com o neurotransmissor GABA (Siegel, 2006) e há evidências que a actividade dopaminérgica hipotalâmica pode estar relacionada com a regulação neuroendócrina (Vallone *et al.*, 2000)

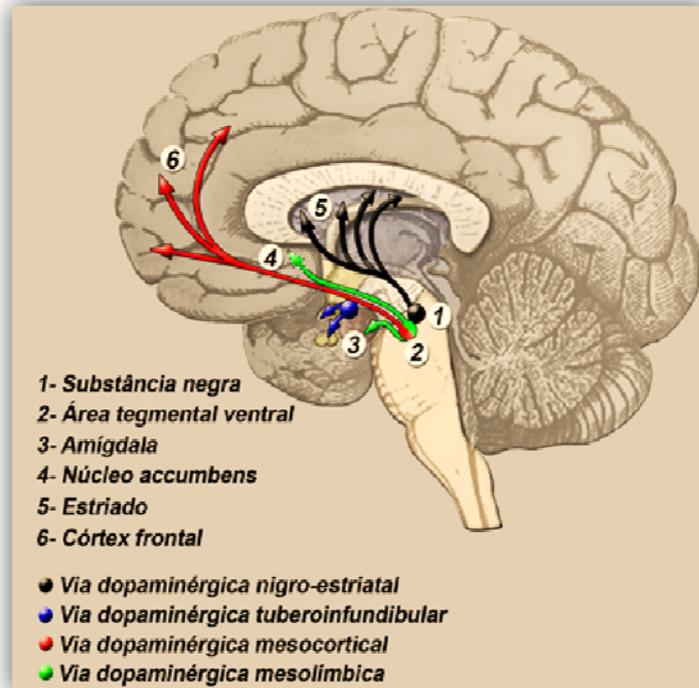


Figura 4. Localização das vias dopaminérgicas no cérebro e estruturas associadas. A via nigroestriatal parte da SNpc até ao estriado dorsal, estando envolvida no controlo motor. A via tuberoinfundibular tem início no hipotálamo e projecta-se até à hipófise, regulando as suas secreções. A via mesocortical inicia-se na ATV enviando projecções para o córtex pré-frontal, afectando a memória a curto prazo, motivação e atenção. A via mesolímbica também se inicia na ATV projectando-se para o núcleo *accumbens*, amígdala, hipocampo e córtex. Adaptado das ilustrações de www.pinterest.com.

A extinção da acção da DA (e de outras catecolaminas) no cérebro envolve a sua recaptção pelos terminais nervosos através dos transportadores de dopamina (DAT) e a sua metabolização por parte das enzimas monoaminoxidase (MAO) e catecol-O-metiltransferase (COMT).

Após a libertação da DA, esta é convertida em ácido dihidroxifenilacético (DOPAC) pela enzima MAO depois de ser recaptada pelo terminal nervoso, assim como em ácido homovanílico (HVA), provavelmente no espaço extraneuronal, através da acção sequencial da COMT e da MAO. Os principais metabolitos da DA no SNC são o HVA, DOPAC e em pequena quantidade a 3-metoxitiramina (3-MT) que são indicativos dos níveis de dopamina. A DAT é uma proteína integral da membrana do terminal nervoso dopaminérgico que tem uma função crítica de finalização da actividade de DA através da recaptção pré-sináptica desse neurotransmissor. A DAT é um alvo importante da acção de drogas psicoestimulantes e do peroxinitrito (ONOO^-) (Kandal, 2000; Siegel, 2006).

3. Núcleos da Base e Vias Motoras

Os núcleos da base (NB), também designados por gânglios da base, exercem um papel fundamental no controlo dos movimentos voluntários, especificamente pelas conexões com o córtex motor (Redgrave & Gurney, 2008). Os NB são compostos por um conjunto de estruturas subcorticais que se localizam na base do cérebro e tronco encefálico. Fazem parte dos NB: o estriado, subdividido em núcleo caudado e *putamen* (em roedores designa-se de estriado dorsal ou neostriado); núcleo *accumbens* e tubérculo olfativo (em conjunto formam o estriado ventral nos roedores); globo pálido externo e interno (GPe e GPi, sendo o GPi correspondente ao núcleo entopeduncular nos roedores); substância negra *pars compacta* e *pars reticulata* (SNpc e SNpr) e o núcleo subtalâmico (NST) (Parent & Hazrati, 1995). O circuito dos núcleos da base tem como principal função um sistema de referência que impede ou estimula uma determinada acção. Dessa forma, servem como coordenadores ou gerenciadores de processos (movimentos e cognição) como se aprovassem ou não uma determinada acção. O córtex (centro efector) envia a informação desejada ao estriado. O resultado do complexo circuito de inibição e estimulação é justamente a aprovação ou não de determinada acção num circuito de retroalimentação (negativa ou positiva) do tálamo para o córtex (Redgrave & Gurney, 2008).

Do estriado partem duas vias de saída para o tálamo: a directa e a indirecta. Na via directa, o córtex envia projecções glutamérgicas (de glutamato – Glu) e o estriado, que recebe aferências do córtex, liberta o neurotransmissor inibitório ácido- γ -aminobutírico (GABA – a sua formação ocorre por descarboxilação do glutamato, sendo esta reacção catalisada pela enzima glutamato descarboxilase) inibindo os neurónios GABAérgicos localizados no GPi e SNpr. Com a inibição destes neurónios, há uma desinibição dos núcleos do tálamo e libertam-se assim os movimentos. Na via indirecta, o córtex envia projecções glutamérgicas e o estriado envia projecções GABAérgicas para o GPe, ficando este inibido. Como o GPe também possui neurónios GABAérgicos, estes vão ficar inibidos e vão permitir que o núcleo subtalâmico liberte o aminoácido excitatório Glu para o GPi e a SNpr,

excitando assim estes neurónios GABAérgicos, que posteriormente vão inibir os neurónios do tálamo, impedindo ou cessando deste modo os movimentos (Fig.5) (Alexander & Crutcher, 1990).

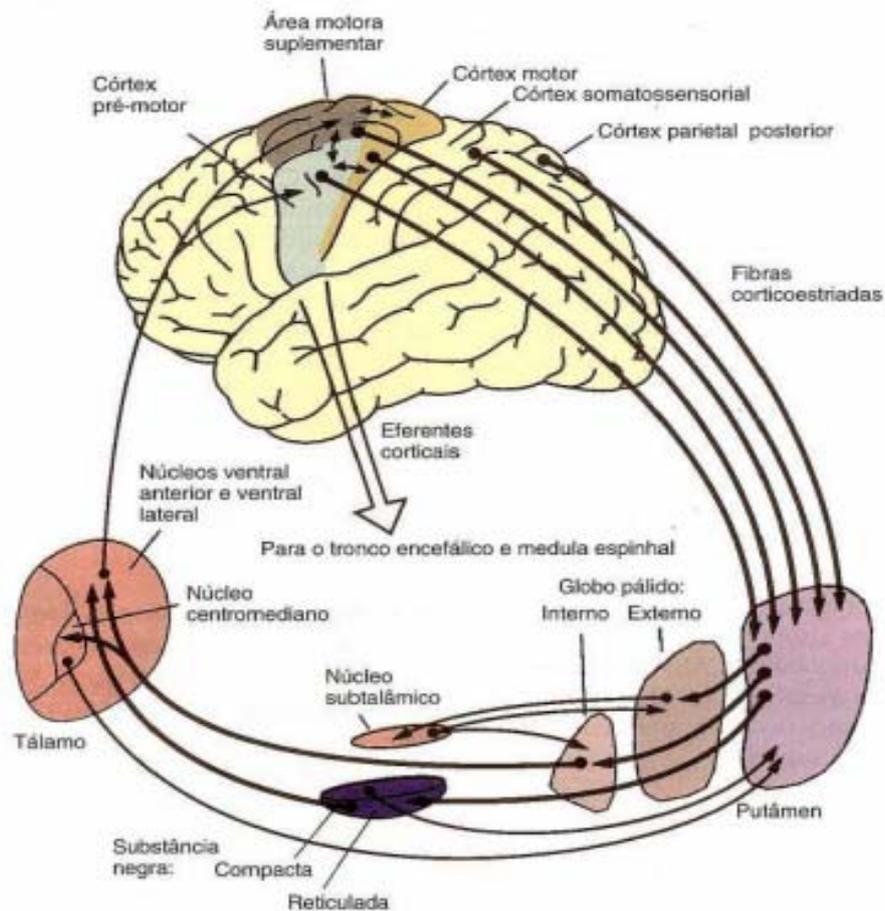


Figura 5. Representação dos circuitos motores – via directa e via indirecta dos núcleos da base. Na via directa, o córtex envia projecções glutamérgicas e o estriado, que recebe aferências do córtex, liberta o neurotransmissor inibitório GABA inibindo os neurónios GABAérgicos localizados no GPI e SNpr. Com esta inibição há uma desinibição dos núcleos do tálamo e libertam-se os movimentos. Na via indirecta, o córtex envia projecções glutamérgicas e o estriado envia projecções GABAérgicas para o GPe, ficando este inibido. O núcleo subtalâmico liberta glutamato para o GPI e a SNpr, excitando estes neurónios GABAérgicos, inibindo os neurónios do tálamo, impedindo os movimentos. Adaptado das ilustrações de www.tabers.com.

4. Alfa-Sinucleína (α -syn)

A primeira associação entre a doença de Parkinson e a alfa-sinucleína foi também a primeira demonstração conclusiva de um defeito genético que conduz à doença e, por estas razões, tem um valor histórico e conceptual (Stefanis, 2012).

Esta proteína foi descrita pela primeira vez por Maroteaux *et al.*, em 1988, como uma proteína específica de neurónios, localizada nos terminais nervosos pré-sinápticos e nos núcleos. A α -syn é expressa abundantemente no sistema nervoso, constituindo 1% do total de proteínas citoplasmáticas. Apesar de esta proteína ser o foco de muitos estudos e pesquisas laboratoriais, a sua função exacta permanece desconhecida.

A α -syn pertence a uma família de proteínas expressas no cérebro de humanos e roedores (Giasson *et al.*, 2001; Galvin, 2001), com aproximadamente 15 kDa e 140 aminoácidos e inclui três formas: α -syn, β -syn e γ -syn (Clayton & George, 1998). A sua localização subcelular ainda não foi estabelecida em detalhe. No entanto, são sugeridos como locais de acção os terminais pré-sinápticos, o núcleo e o citoplasma (Maroteaux & Scheller, 1991; Lavedan, 1998). Pensa-se que, em condições fisiológicas, a α -syn deverá actuar a nível da modulação do *turnover* das vesículas sinápticas e na plasticidade sináptica (Clayton & George, 1998). Contudo, ainda não são conhecidas as substâncias responsáveis pela regulação da ligação e da dissociação da α -syn com as vesículas sinápticas.

Vários estudos mostram que a agregação anormal da α -syn forma o maior componente filamentosos dos corpos de Lewy, afectando não só os neurónios mas também as células da glia, os astrócitos e os oligodendrócitos (Takahashi & Wakabayashi, 2001). Sob condições normais, a α -syn apresenta propriedades neuroprotectoras (Seo *et al.*, 2002). Em concentrações nanomolares, ela protege os neurónios, em culturas de células neuronais primárias, contra o stresse oxidativo e excitotoxicidade, através do mecanismo de sinalização, por outro lado, em concentrações na ordem dos micromolares, exerce um efeito neurotóxico nas culturas (Seo *et al.*, 2002). Estes resultados sugerem que os neurónios dopaminérgicos da substância negra são vulneráveis a níveis elevados de α -syn.

Contudo, ainda não foi possível concluir se são os elevados níveis de α -syn solúvel ou os corpos de inclusão positivos para a α -syn que causam morte celular no sistema nervoso.

Uma visão mais recente dos mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento da DP aponta a formação de oligómeros solúveis (protofibrilhas) de α -syn (e não as suas fibras amilóides) como as espécies citotóxicas responsáveis pela morte dos neurónios dopaminérgicos (Cabin *et al.*, 2002; Mazzulli *et al.*, 2006). Famílias que apresentam uma mutação no gene da α -syn desenvolvem Parkinson precoce o que se poderá dever à maior facilidade das formas mutantes de α -syn formarem protofibrilhas ou falha na acção protectora/sinalizadora da α -syn (Giasson *et al.*, 1999; Greenbaum *et al.*, 2005; Tsika *et al.*, 2010). Por outro lado, foi demonstrado que as catecolaminas (como a dopamina ou a levodopa) são agentes estabilizadores das protofibrilhas, o que pode explicar porque são os neurónios dopaminérgicos os afectados na DP, visto que a α -syn é expressa em vários tecidos (Conway *et al.*, 2001).

O gene da α -syn, *PARK1*, foi o primeiro gene identificado como causador de uma forma hereditária de DP (Polymeropoulos *et al.*, 1996). Após a primeira descrição deste gene causador de DP familiar, a pesquisa de mutações em inúmeras famílias no mundo demonstrou que esta é uma causa pouco frequente da doença. As formas mutantes da α -syn conhecidas e estudadas são A53T e A30P (Tabela 1) e a tendência é para se localizarem no núcleo (Mazzulli *et al.*, 2006). Porém, tanto em doentes com ou sem mutações, formas de α -syn oxidadas e fosforiladas e com tendência a formar oligómeros são encontradas no citoplasma, agregadas, formando os corpos de Lewy (Mazzulli *et al.*, 2006). Tal facto sugere que o mau processamento desta proteína, causado por alterações na sequência de aminoácidos, por modificações pós-translacionais, por degradação ineficiente ou pela maior expressão, possui um papel importante na fisiopatologia da DP, tanto nas formas raras como nas suas formas mais comuns (Klein & Lohmann-Hedrich, 2007).

Tabela 1. Esquema resumido das formas mutantes de α -syn e suas implicações. Existem 3 formas mutantes conhecidas de α -syn: A53T, A30P e E46K, sendo que as duas primeiras são as mais estudadas.

Formas mutantes de α -syn	Implicações
A53T	<ul style="list-style-type: none"> • Capacidade de auto-agregação em fibrilhas elevada quando comparada com A30P e WT; • Causa stresse do retículo endoplasmático; • Causa disfunção do armazenamento vesicular da dopamina; • Provoca stresse oxidativo.
A30P	<ul style="list-style-type: none"> • Capacidade de auto-agregação em fibrilhas; • Contribui para redistribuição da α-syn para fora do terminal pré-sináptico.
E46K	<ul style="list-style-type: none"> • Mutação de α-syn menos estudada; • Aumenta a formação de agregados de α-syn; • Tem maior capacidade de se ligar a lipossomas carregados negativamente.

Adaptado de Perfeito e Rego, 2011

Os corpos de Lewy (CL) são inclusões intracitoplasmáticas eosinofílicas hialinas de composição bioquímica complexa (Fig.7). Apresentam um núcleo denso, circundado por um halo de filamentos radiados. O núcleo do CL é composto sobretudo por duas proteínas: a ubiquitina e a α -syn. Também é composto por proteínas dos neurofilamentos e enzimas como a protease multicatalítica e a proteína precursora do peptídeo β -amilóide (Braak *et al.*, 1998). A α -syn parece exercer uma actividade antagonista em relação à ubiquitina (Gay *et al.*, 2000). Os CL exibem uma vasta gama de padrões para a α -syn e a ubiquitina, que variam desde uma forma homogénea, na qual ambas estão distribuídas de forma dispersa e sobrepostas ao longo da inclusão, até uma forma concêntrica, na qual estão parcialmente segregadas, com a α -syn concentrada na periferia e a ubiquitina na região central do CL. A segregação da α -syn para a periferia do CL é consistente com a hipótese de que esta proteína é depositada de forma constante (Gay *et al.*, 2000; Mukaetova-Ladinska *et al.*, 2000).

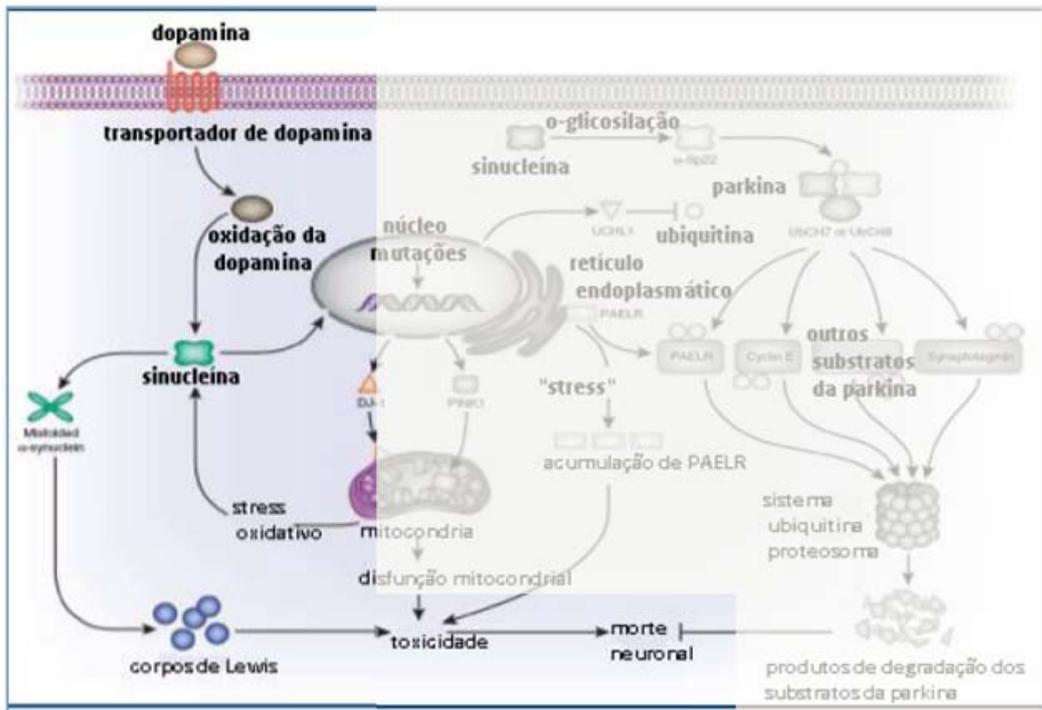


Figura 7. Resumo esquemático dos mecanismos etiopatogénicos e interações das células dopaminérgicas na substância negra, durante a DP. Em destaque, formação dos corpos de Lewy. A dopamina entra na célula através da DAT e sofre oxidação, que por sua vez vai ter influência na conformação da α -syn, levando à conformação anormal da proteína (*misf- α -syn*). Esta conformação leva a uma agregação anormal da proteína, formando assim os corpos de Lewy (CL). Os CL geram toxicidade para as células e levam à morte neuronal. Adaptado de Obeso *et al.*, 2010.

♣ Transferência de α -syn entre neurónios

Nos últimos anos, mais de 300 doentes com DP receberam transplantes estriatais de tecidos do mesencéfalo, isolados de fetos abortados. Muitos destes doentes beneficiaram de uma melhoria transiente dos sintomas motores, no entanto a discinesia manteve-se, sendo que em alguns casos apareceram outras discinesias, efeito secundário preocupante e de causa obscura. Por outro lado, curiosamente, uma década depois do uso de transplantes fetais, foram observadas em análise *post mortem* inclusões de Lewy em células dos enxertos. Estas descobertas levaram à hipótese arrojada e actual que a proteína α -syn pode ser transmitida entre neurónios de forma semelhante às proteínas tipo prião, conduzindo a um alastramento da patologia na DP e noutras α -sinucleinopatias (Hansen and Angot *et al.*, 2011; Yasuda *et al.*, 2012).

Braak (Braak *et al.*, 2003; Hawkes *et al.*, 2007) propôs que eventos desconhecidos, por exemplo infecções virais, poderão iniciar o processo de perda de conformação normal ou *misfolding* da α -syn no intestino e no sistema olfactivo. De acordo com as sugestões de Braak, a proteína alastrar-se-ia a partir dos nervos entéricos para o tronco cerebral através do nervo vago e simultaneamente para as regiões do cérebro ligadas ao sistema olfactivo. Vários anos após este desencadeamento inicial, a patologia de Lewy atingiria o mesencéfalo, incluindo a substância negra e depois, lentamente, espalhar-se-ia para as áreas neocorticais (Braak *et al.*, 2003; Braak *et al.*, 2004; Del Tredici & Braak, 2004).

Foi sugerido que a propagação do tipo prião da α -syn poderá ocorrer no cérebro dos doentes com DP (Brundin *et al.*, 2008). As doenças causadas por priões, como por exemplo a doença de Creutzfeldt-Jacob, são doenças neurodegenerativas transmissíveis. A isoforma anormal da proteína prião (PrP^{Sc}) actua como um agente infeccioso que se propaga através da imposição da sua conformação na proteína prião celular do hospedeiro (PrP^C). A ideia fundamental é que a proteína α -syn de conformação anormal (em analogia à PrP^{Sc}) é transmitida de uma célula dadora com CL para uma célula receptora

“saudável” e age como um modelo para a conversão da α -syn nativa (em analogia à PrP^C) da célula receptora numa conformação patogénica do tipo β . Este processo tem sido designado de *seeding*, porque os efeitos da proteína de conformação anormal podem ser comparados a uma “semente” que recruta a proteína nativa da célula receptora, iniciando a agregação subsequente (Brundin *et al.*, 2008; Angot & Brundin, 2009).

Assumindo que a propagação de CL no SNC depende da transmissão directa de célula para célula, este processo é susceptível de ocorrer em três etapas (Fig. 8). Primeiro, a libertação de α -syn de conformação alterada (*misf*- α -syn) das células dadoras para o meio extracelular. Segue-se a captação desta α -syn alterada pelas células receptoras. Numa terceira etapa, a *misf*- α -syn recruta a α -syn nativa do citoplasma da célula receptora, dando origem à nucleação de agregados patogénicos e eventualmente a formação de CL (Brundin *et al.*, 2008; Angot & Brundin, 2009).

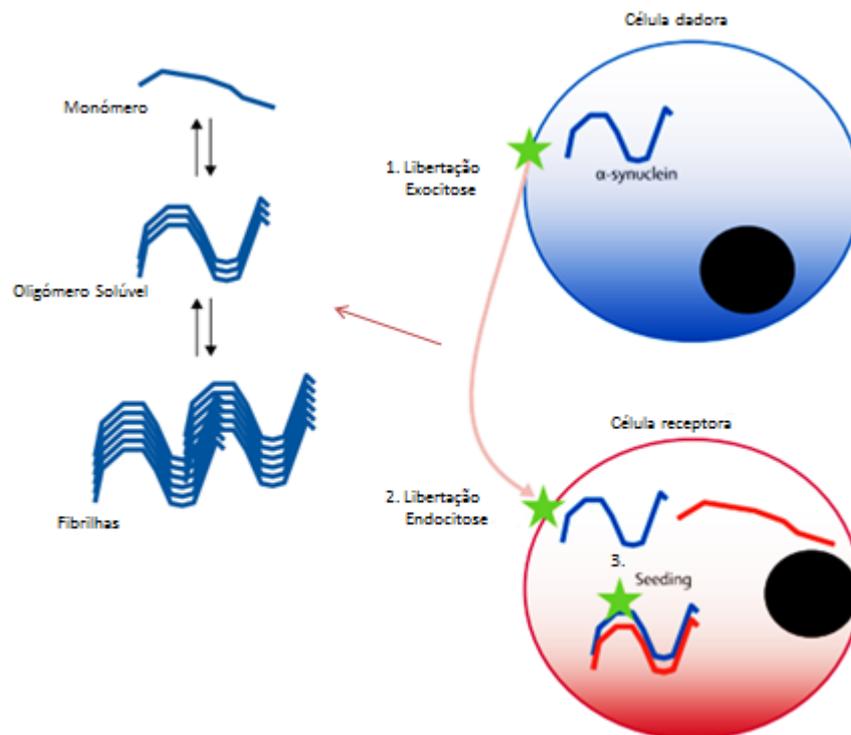


Figura 8. Modelo para transferência de α -syn de célula para célula. 1. Libertação da α -syn de conformação alterada (*misf*- α -syn) da célula dadora para o meio exterior possivelmente por exocitose; 2. Entrada da α -syn na célula receptora possivelmente por endocitose; 3. Após entrada da *misf*- α -syn na célula receptora, esta deverá provocar a agregação da α -syn intracelular. Esta terceira etapa conta com o recrutamento da α -syn nativa a partir da célula receptora e a sua conversão em *misf*- α -syn. O tipo de espécie de α -syn (monómero, oligómero ou fibrilha) que actua como molde ainda não foi determinado. Adaptado de Angot & Brundin, 2009.

Há evidências que as células podem libertar α -syn para o meio extracelular tendo sido detectadas baixas concentrações, na gama nanomolar de α -syn monomérica e oligomérica no líquido céfalo-raquidiano e em amostras de plasma de doentes com DP (Dunning *et al.*, 2011). Lee e colaboradores têm implicado a exocitose como um mecanismo de libertação de α -syn em culturas celulares de neuroblastoma, sobreexpressando α -syn. Estes autores descreveram que a libertação pode ser bloqueada pela temperatura, uma abordagem correntemente usada para inibir a exocitose. A α -syn também foi detectada no meio de cultura quando sobreexpressa em culturas de neurónios corticais primários de rato, sugerindo que a libertação da α -syn não é um artefacto (Lee *et al.*, 2005). Curiosamente a α -syn intravesicular parece ser mais propensa à agregação quando comparada com a proteína citoplasmática (Lee *et al.*, 2005).

Qualquer que seja o mecanismo de libertação da α -syn, o modelo de transporte de célula para célula pressupõe que esta tem de ser internalizada pelas células vizinhas para iniciar o processo de nucleação (Angot & Brundin, 2009). A sequência de repetições imperfeitas de 11 aminoácidos na α -syn tem um papel importante na translocação desta proteína através da membrana plasmática (Ahn *et al.*, 2006). Foi descrito que este processo ocorre de forma rápida, pode ser monitorizado em células expostas a α -syn monomérica, não é sensível às temperaturas baixas e não é inibido pelos clássicos marcadores de endocitose (Ahn *et al.*, 2006). Embora a translocação membranar passiva contribua para a penetração da α -syn monomérica nas células, para espécies com maior peso molecular o mecanismo de penetração parece ser outro. Após adição de diferentes espécies de oligómeros nas culturas celulares, Danzer e colaboradores, observaram que nem todos os oligómeros conseguiam penetrar, causando por vezes um aumento de cálcio intracelular e morte celular (Danzer *et al.*, 2007). Por outro lado, a captação de espécies oligoméricas é reduzida por exposição a baixas temperaturas e a inibidores dinâmicos, sugerindo assim um mecanismo de endocitose clássico (Lee, 2008).

5. Modelos Animais de DP

As doenças neurológicas humanas podem ser reproduzidas em modelos animais utilizando procedimentos que reproduzem os eventos patológicos e comportamentais. Além de constituírem uma ferramenta indispensável para pesquisa básica, os modelos animais que simulam doenças humanas permitem investigar estratégias terapêuticas como condições prévias para se testar novos fármacos em doentes. A possibilidade de se realizar a infusão intracerebral de toxinas, com o auxílio de aparelhos estereotáxicos, permite o desenvolvimento de modelos animais mais específicos em relação ao local e ao tipo de lesão.

Têm sido desenvolvidos modelos experimentais da DP que reproduzem a degeneração dopaminérgica com o objectivo de estudar a fisiopatologia da doença e analisar a eficácia de novas terapias (Dauer *et al.*, 2003). A DP é uma doença humana que não se manifesta naturalmente em animais, somente é observada nestes aquando da administração de agentes neurotóxicos que selectivamente interrompem ou destroem o sistema catecolaminérgico, tais como a 6-hidroxidopamina (6-OHDA), o 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), entre outros (Betarbet *et al.*, 2002). Alguns agentes químicos ou farmacológicos, como a rotenona e a reserpina, respectivamente, quando administrados podem também induzir aspectos específicos da DP. Os modelos que envolvem lesão neurotóxica são muito utilizados por serem facilmente reprodutíveis e apresentarem custos menores quando comparados por exemplo com os modelos genéticos (Tabela 2).

Contudo, os modelos animais descritos na literatura visam principalmente tratamentos que revertam os sinais motores já numa fase tardia da doença e poucos são os modelos para estudos de fases iniciais, antes do aparecimento dos sinais da doença (Blesa *et al.* 2012).

Tabela 2. Modelos animais usados para estudar a DP.

Exemplos de alguns modelos animais	Efeitos na via nigroestriatal	Agregados de α -syn / corpos de Lewy	Principal objectivo para uso dos modelos	Desvantagens
6-OHDA	Perda de inervação dopaminérgica no sítio da injeção (estriado).	Negativo para inclusões.	Investigar terapias que melhorem os sintomas da DP; Estudar os mecanismos de morte celular.	Requer injeção intracerebral; Tem um envolvimento com a sinucleína muito baixo.
MPTP	Perda de neurónios dopaminérgicos, dependendo da dose usada, chegando a 95% de perda com altas concentrações; Reduz os níveis de dopamina estriatal e provoca perda de neurónios dopaminérgicos.	As inclusões não são prevalentes; Existem poucos casos de agregação de sinucleína em primatas e de aumento de imunoreactividade em roedores.	Investigar terapias que melhorem os sintomas de DP; Estudar os mecanismos de morte celular.	Não é um modelo progressivo da morte neuronal; As inclusões são muito raras.
Rotenona	Perda de neurónios dopaminérgicos acompanhada pela inervação dopaminérgica no estriado.	Agregação de α -syn nos neurónios dopaminérgicos.	Testar compostos neuroprotectores.	Morbilidade e mortalidade substanciais; Trabalho intenso e demorado.
Paraquat	Diminui a imunoreactividade de TH no estriado.	Não estão presentes inclusões, mas há um aumento de imunoreactividade de α -syn nos neurónios dopaminérgicos da SN.	Testar estratégias neuroprotectoras.	Não é muito testado; Tem efeito noutros sistemas de neurotransmissão.
α -sinucleína	No geral não se observa degeneração de neurónios dopaminérgicos (usando modelos com α -syn mutante).	Agregados de α -syn nos neurónios dopaminérgicos, geralmente associados ao modelo A53T.	Estudar o papel da α -syn e dos agregados da α -syn na DP.	No geral não há morte de neurónios dopaminérgicos em modelos de sinucleína (os mais usados são os modelos mutantes).
LRRK2	Níveis mínimos de degeneração; Não tem efeitos no desenvolvimento ou manutenção da dopamina.	Não observados.	Estudar o papel das mutações LRRK2 relacionadas com a DP.	Falha geral de degenerescência e agregados de sinucleína.

Adaptado de Blesa *et al.*, 2012

→ Modelo MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina)

O uso do MPTP na indução da DP experimental em animais surgiu quando se descobriu que esta neurotoxina produzia em humanos alterações bioquímicas, histológicas e patológicas encontradas na doença. Esta descoberta acidental ocorreu em 1982, após o uso ilícito, por jovens, de uma substância derivada da heroína, o 1-metil-4-fenilpropionoxypiperidina (MPPP), um potente agente analgésico estruturalmente relacionado com a meperidina, o qual continha MPTP, um produto formado durante a síntese do MPPP. Após a auto-administração, os jovens apresentaram sintomas clássicos da DP, tais como tremor, rigidez e bradicinesia.

Em estudos posteriores, Langston *et al.* (1984) confirmaram a neurotoxicidade selectiva do MPTP sobre as células da SNpc, após a administração intraperitoneal desta substância em macacos, enquanto Heikkila *et al.* (1984) demonstraram que o MPTP apresentava acção neurotóxica em neurónios dopaminérgicos nigroestriatais de rato, após a administração intraperitoneal dessa substância. O MPTP é um composto altamente lipofílico e por isso aquando da sua administração sistémica atravessa facilmente a barreira hematoencefálica, atingindo rapidamente o SNC. Como ratos e murganhos são menos sensíveis ao MPTP a administração sistémica não é eficaz na reprodução das lesões observadas no homem sendo necessário recorrer a cirurgia estereotáxica, injectando assim o MPTP ou o seu metabolito 1-metil-4-fenilpiridina (MPP⁺).

Sob acção da enzima monoaminoxidase B (MAO-B) o MPTP é convertido nos astrócitos em MPP⁺, uma potente neurotoxina que causa destruição das fibras dopaminérgicas em células produtoras de DA, com conseqüente diminuição dos níveis deste neurotransmissor (Nicklas *et al.*, 1985). Como o MPP⁺ é uma molécula polar, não pode entrar livremente no espaço intracelular, porém, através do sistema de recaptação da DA, é transportado e acumula-se nas células dopaminérgicas (Fig.9). Nos neurónios dopaminérgicos, o MPP⁺ pode seguir três rotas diferentes: (1) pode-se ligar ao transportador vesicular da monoamina tipo 2 (VMAT-2); (2) pode-se concentrar dentro da mitocôndria bloqueando o complexo

I, interrompendo a transferência de electrões e ubiquinona; (3) pode permanecer no citoplasma e interagir com as enzimas citoplasmáticas, em particular as que têm carga negativa (Dauer *et al.*, 2003).

A administração de MPTP na SNpc de ratos ocasiona perdas específicas de DA no estriado e no córtex pré-frontal. Esta substância apresenta uma grande afinidade pelos neurónios da SNpc, não afectando significativamente os demais neurónios dopaminérgicos, sendo esta afinidade devida ao transporte de MPTP através dos DAT. Porém, uma das desvantagens deste modelo animal é não reproduzir a presença de corpos de Lewy, característicos da DP.

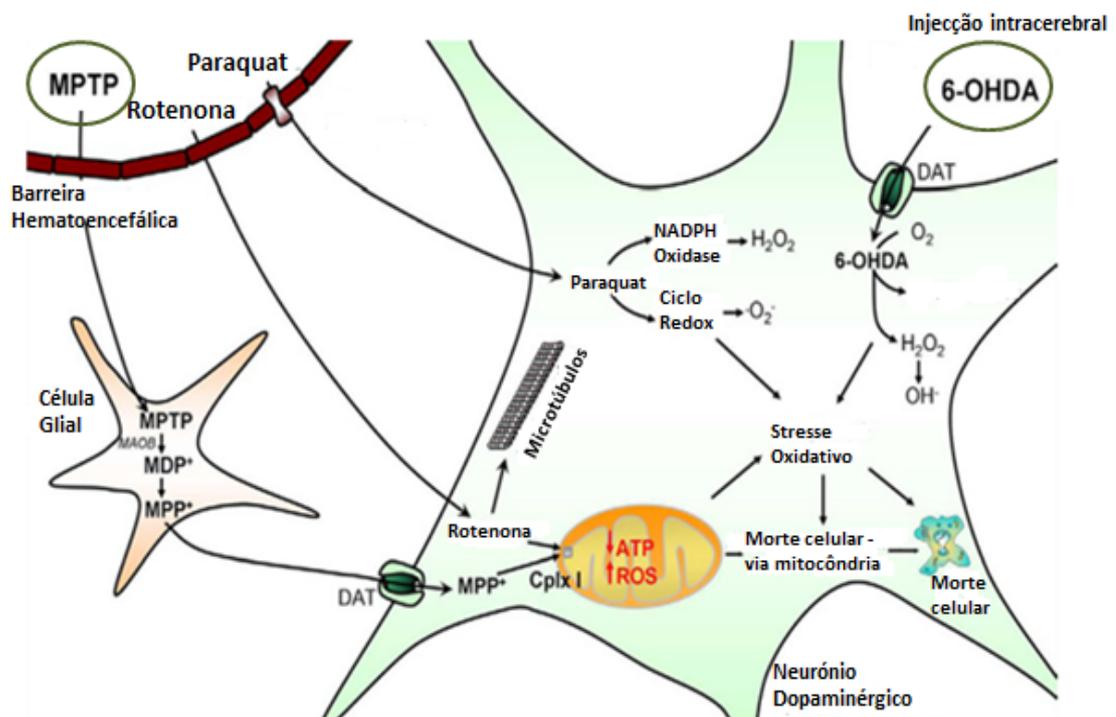


Figura 9. Mecanismos de acção das neurotoxinas – MPTP e 6-OHDA – usadas nos modelos animais da doença de Parkinson. A 6-OHDA entra nos neurónios através da DAT. Após reacções consecutivas é oxidada produzindo peróxido de hidrogénio (H₂O₂) e para-quinona. Através da produção de espécies reactivas de oxigénio (ROS) induz a morte neuronal. A MPTP consegue atravessar a barreira hematoencefálica e uma vez no interior do cérebro é metabolizada pela enzima MAOB dando origem ao MPP⁺. O MPP⁺ entra nas células dopaminérgicas através da DAT, inibe o complexo I na mitocôndria e conduz à diminuição dos níveis de ATP e ao aumento de ROS, levando à morte celular. Adaptado de Bové e Perier, 2012.

→ Modelo 6-OHDA (6-hidroxidopamina)

Outro modelo neurotóxico usa a 6-OHDA e é muito utilizado experimentalmente em modelos de degeneração da SNpc, tanto *in vivo* como *in vitro*. Muitas informações sobre os efeitos da dopamina no SNC, incluindo dados comportamentais, bioquímicos ou fisiológicos, foram obtidas neste modelo.

A 6-OHDA é incapaz de atravessar a barreira hematoencefálica, sendo necessária a sua administração directamente na estrutura cerebral que se deseja lesar, tal como a SNpc ou o estriado (Przedborski, 1995). A injeção bilateral de 6-OHDA na SNpc ou noutras zonas do cérebro provoca uma elevada perda neuronal, principalmente a destruição de neurónios catecolaminérgicos (Fig.9) (Ungerstedt, 1968).

A 6-OHDA é usualmente injectada unilateralmente, onde o hemisfério intacto funciona como um controlo interno, constituindo um modelo de hemiparkinsonismo, que é caracterizado por um comportamento motor assimétrico após administração de drogas dopaminérgicas, devido a um desequilíbrio entre o lado lesado e o não-lesado.

A injeção unilateral de 6-OHDA na SNpc destrói aproximadamente 60% dos neurónios que contêm TH e leva a uma perda de TH nos terminais estriatais (Blandini, 2008). Em diversos estudos tem-se injectado o composto directamente no estriado para assim testar a hipótese da degeneração retrógrada, ou seja, os terminais estriatais positivos para TH degeneram antes dos neurónios positivos para TH na SNpc, à semelhança do que acontece na DP em humanos.

Este modelo tem sido muito utilizado associado a estudos de comportamento, em particular de comportamento rotatório. Os animais injectados unilateralmente com 6-OHDA apresentam comportamento rotatório contralateral em relação à lesão quando estimulados com agonistas D_1/D_2 da dopamina, tais como a apomorfina, cujo comportamento pode ser explicado pela hiperexpressão dos receptores dopaminérgicos na porção lesada do estriado. Substâncias que induzem a libertação de dopamina, tais como a anfetamina, causam rotações ipsilaterais à lesão. O modelo rotatório foi utilizado para investigar os efeitos de

agonistas ou antagonistas dopaminérgicos, em estudos de alterações motoras que mimetizam os sintomas da DP, assim como de estratégias terapêuticas diversas incluindo as baseadas na terapia génica (Gerlach, 1996). Neste modelo a administração de apomorfina é o teste padrão da literatura para verificar a estimulação de receptores dopaminérgicos. A origem do comportamento rotatório parece estar relacionada com o desequilíbrio entre as sinapses dopaminérgicas nigroestriatais entre os hemisférios. Este desequilíbrio afecta os impulsos para iniciar os movimentos promovidos pela conexão estriado – tálamo – córtex motor, os quais são modulados pela via nigroestriatal (Nicola, 2000). Um ponto crítico para definir o aparecimento e a direcção das rotações parece ser o local de injeção da toxina.

No entanto, o modelo da 6-OHDA não mimetiza todos os aspectos clínicos da DP. Apesar de reproduzir a perda de DA nigral e deficiências comportamentais, não reproduz outras características, tais como a formação de agregados proteicos ou os corpos de Lewy, para além do que não foi identificada interacção da 6-OHDA com a α -syn (Blandini, 2008).

→ Modelos Genéticos

O princípio subjacente ao uso de modelos genéticos da DP é a crença de que as formas herdadas e esporádicas da doença compartilham um mecanismo comum que pode levar à identificação de vias moleculares e bioquímicas envolvidas na patogénese da doença.

As mutações genéticas na DP são raras e representam 10% do total de casos (Dauer & Przedborski, 2003). Existem seis causas genéticas claramente definidas (Tabela 3) associadas aos genes da α -sinucleína (PARK1) (Polymeropoulos *et al.*, 1996), Parkina (PARK2) (T Kitada *et al.* 1998), UCHL-1 (PARK5) (Leroy *et al.*, 1998), PINK1 (PARK6) (Valente *et al.*, 2004), DJ-1 (PARK7) (Bonifati *et al.*, 2003) e LRRK2 (PARK8) (Zimprich *et al.*, 2004; Thomas & Beal 2007).

As mutações do gene α -syn, que se pensa terem uma ligação às vesículas sinápticas, foram as primeiras evidências das formas genéticas na DP. Duas mutações no gene α -syn (A53T e A30P) causam uma forma dominante herdada de DP (Kruger *et al.*, 1998) e têm sido usadas para criar murganhos transgénicos num esforço de recapitular a fisiopatologia da DP. Estudos realizados com murganhos transgénicos para a α -syn mostram que as mutações A53T podem resultar num fenótipo motor severo, que eventualmente pode levar à paralisia e morte (Giasson *et al.*, 2002). As mutações do gene α -syn em murganhos produzem inclusões que se assemelham aos corpos de Lewy (Masliah *et al.*, 2000). No entanto, este fenótipo é geralmente limitado à mutação A53T e não é encontrado em murganhos transgénicos A30P. Curiosamente, estudos realizados em *Drosophila* que expressa α -syn mutante mostraram perdas de células dopaminérgicas, redução de TH na SN e défices motores (Feany & Bender, 2000). Outro estudo mais recente observou estas mesmas características, entre outras, num modelo de rato que sobreexpressa α -syn na SNpc (Decressac *et al.*, 2011).

Em geral, os modelos genéticos em murganhos têm sido capazes de recapitular aspectos específicos da DP, embora nenhum consiga reproduzir a degeneração neuronal que ocorre na doença, pelo que tem havido um esforço de aperfeiçoamento destes modelos.

Tabela 3. Loci envolvidos na genética da DP, localização cromossómica, gene e possível função.

Locus	Cromossoma	Gene	Possível função
PARK1	4q21.3	α -sinucleína	Proteína pré-sináptica/ Chaperone
PARK2	6q25.2-27	Parkina	Ligase E3 ubiquitina
PARK5	4p14	UCH-L1	Hidrolase c-terminal ubiquitina
PARK6	1p35-36	PINK-1	Cinase
PARK7	1p36	DJ-1	Chaperone
PARK8	12p11.2q-13.1	LRRK2	Cinase

Adaptado de Gil, 2009

II. Objectivos

Pretende-se com este trabalho:

1. Investigar as recentes e controversas evidências de transporte retrógrado da α -sinucleína (Hansen and Angot *et al.*, 2011; Yasuda *et al.*, 2012) e respectiva contribuição para o alastramento e acumulação noutras regiões cerebrais, assim como a sua contribuição para a progressão da doença.
2. Desenvolver e validar um novo modelo genético da doença de Parkinson baseado na sobreexpressão da proteína α -sinucleína normal humana na região estriatal do cérebro do rato, mediada por vectores virais.

Espera-se que este trabalho permita estabelecer um novo modelo genético da doença de Parkinson que reproduza o transporte de α -sinucleína, deposição e acumulação nos neurónios dopaminérgicos da substância negra *pars compacta* e que assim permita estudar novas estratégias terapêuticas para esta doença.

III. Metodologias

1. Animais

Foram utilizados ratos fêmea, da estirpe Wistar, com idades compreendidas entre 8 e 10 semanas e peso aproximado de 200g.

Os animais foram mantidos a temperatura constante ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e ciclo claro/escuro de 12 horas, com alimentação e água à descrição.

Foi aplicada a Directiva 86/609/CEE, do Conselho de 24 de Novembro de 1986, que estabelece as normas mínimas relativas à protecção dos animais utilizados para fins experimentais e outros fins científicos, transposta para a ordem jurídica interna pelo DL 129/92 de 6 de Junho, regulamentado pela Portaria 1005/92 de 23 de Outubro.

2. Vectores Virais

Os vírus adeno-associados recombinantes (VAAr) utilizados codificam para a proteína fluorescente verde (VAA-eGFP) isoladamente ou associada à α -syn humana (VAA- α -syn+eGFP) (Garrido *et al.*, 2011). Este último vector viral possui dois promotores independentes para cada um dos transgenes que codifica (α -syn e eGFP), o que permite a produção em simultâneo das duas proteínas (Fig.10).

Estes vectores combinam as cápsides do serotipo 2 e do serotipo 1 dos vírus adeno-associados (VAA $\frac{1}{2}$).

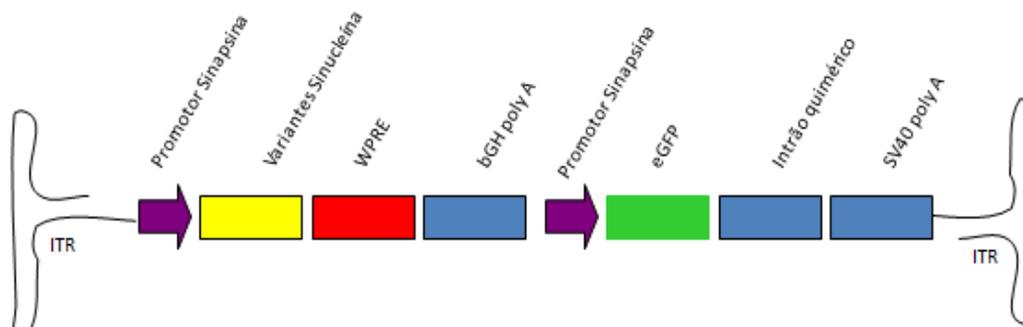


Figura 10. Construção Viral: Vírus adeno-associado que expressa α -syn e eGFP. Construção composta pelo promotor da sinapsina para cada um dos transgenes – α -syn e eGFP; pelo elemento regulatório pós-transcricional (WPRE); pela sequência de poliadenilação da hormona de crescimento de bovino (bGH poly A); pela sequência de poliadenilação do intrão quimérico e pelo vírus vacuolante símio 40 (SV40 poly A).

3. Procedimento cirúrgico / Grupos experimentais

Os animais foram anestesiados com 300 μ l de uma mistura de 75mg/ml de quetamina com 5mg/ml de xilazina, por via intraperitoneal.

Depois da certificação de ausência de reflexos dolorosos pelo animal, imobilizou-se a cabeça no aparelho estereotáxico (Fig.11) através da inserção de duas barras intra-auriculares no meato auditivo externo e uma barra de fixação nos incisivos. Após a tricotomia, assepsia e incisão da região superior da cabeça com bisturi, expuseram-se as suturas ósseas cranianas com o objectivo de se localizarem o bregma e o lambda. Fez-se um orifício no hemisfério esquerdo do crânio dos animais, com uma broca eléctrica para permitir a entrada de uma seringa Hamilton, veiculando os vírus VAA- α -syn+eGFP e VAA-eGFP. Em cada animal foi feita uma injeção unilateral no hemisfério estriatal esquerdo com as coordenadas antero-posterior: +1mm, médio-lateral: +2.6mm, dorso-ventral: -5.6mm, com um volume de 2 μ l a uma concentração de 0.7x10⁸ tu/ μ l (“tu” corresponde a unidades de transfecção). Após as injeções, suturaram-se as feridas cirúrgicas com sutura de propileno. Os animais foram sacrificados às 6 e 12 semanas após as cirurgias.

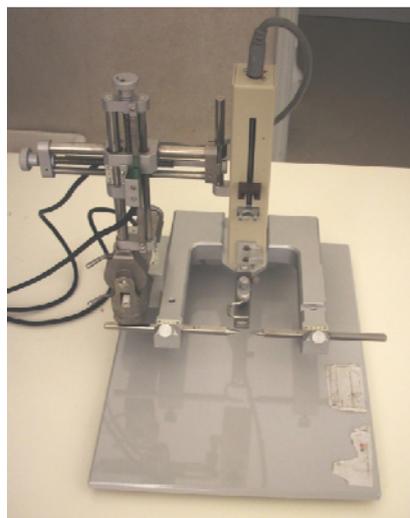


Figura 11. Aparelho estereotáxico usado no ensaio.

4. Avaliação do comportamento rotatório

Um a três dias antes da injeção de VAAs e de 3 em 3 semanas, todos os animais foram sujeitos a uma injeção subcutânea de 0.5mg/kg de apomorfina com 0.1% de ácido ascórbico em solução tampão fosfato (PBS). Em paralelo alguns animais foram sujeitos a uma injeção subcutânea de 3mg/kg de D-anfetamina em PBS. Em seguida foram colocados, durante 60 min, num recipiente circular automatizado, acoplado ao *software Rotameter* (LE 3806 Multicounter) (Fig.12). O comportamento rotatório foi avaliado pelo registo de rotações induzidas por apomorfina e por D-anfetamina, discriminando o número de rotações na direcção contrária à da lesão (contralateral) e o número de rotações em direcção à lesão (ipsilateral).

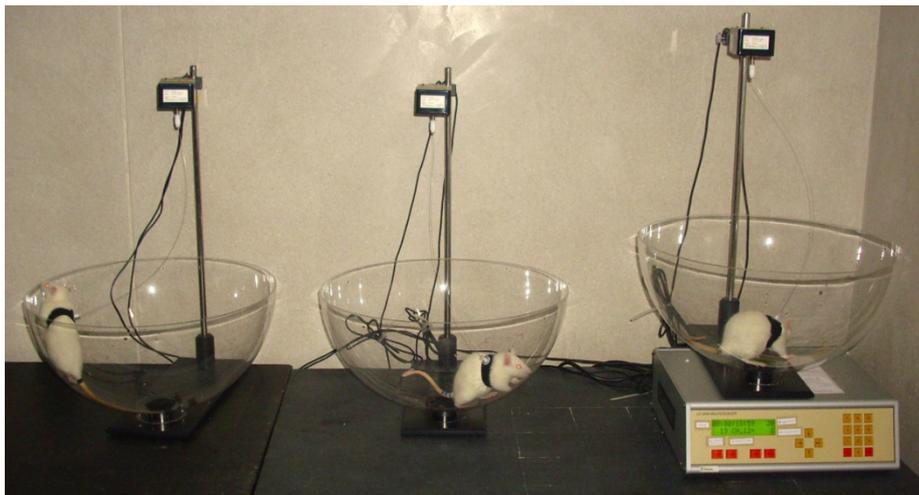


Figura 12. Recipiente circular usado no teste de rotação e equipamento de registo.

5. Sacrifício e análise histológica

Os animais foram sacrificados com dose letal de tiopental (0.5g/10ml) por via intraperitoneal e de seguida perfundidos pela artéria aorta ascendente, com 200 mL de solução tampão fosfato (PBS) 0.1M, pH 7.2-7.4, seguido de 200 mL de uma solução a 4% de paraformaldeído (PFA) diluída em PBS 0.1M, pH 7.2-7.4, a 4°C.

Após a craniotomia, o cérebro foi removido e pós-fixado 48 horas em 4% PFA, seguido de 72 horas de imersão em solução crioprotectora de 30% de sacarose em PBS. De seguida os cérebros foram congelados a -80°C até o seu seccionamento.

Os cortes coronais, de 30µm de espessura, foram feitos utilizando-se um crióstato (Leica CM3050S). As secções foram recolhidas em série e em “*free-floating*” em placas de 48 poços, e armazenadas a 4°C, em solução de PBS com 0.05% de azida de sódio, até posterior utilização para imunohistoquímica.

6. Imunohistoquímica

O procedimento imunohistoquímico foi realizado em séries de secções de estriado (Str) e SNpc, distanciadas de 200 μ m entre si. Foram realizadas marcações histológicas em fluorescência e em visível de acordo com os correspondentes protocolos.

Para a detecção de α -syn humana, eGFP, fosfoproteína regulada por dopamina e AMP cíclico (DARPP-32), transportador vesicular de catecolaminas do tipo 2 (VMAT-2) e tirosina hidroxilase (TH), incubaram-se as secções numa solução de fenil-hidrazina em PBS (1:1000) durante 30min, a 37°C, seguido de incubação 1h em solução de bloqueamento (PBS, 10% de soro de cabra [NGS] e 0.3% Triton X-100) e nos anticorpos primários: α -syn 211 (1:1000, Santa Cruz Biotechnology); GFP (1:1000, Roche); DARPP-32 (1:1000, Millipore); VMAT-2 (1:1000, Abcam) e TH (1:1000, Millipore); solubilizados em solução de bloqueamento durante a noite, a 4°C. De seguida incubaram-se as secções 2h à temperatura ambiente em anticorpo secundário biotinilado anti-imunoglobulina de rato ou de coelho (1:200, Vector Laboratories) diluídos em solução de bloqueamento. Por fim, procedeu-se a uma incubação de 30min à temperatura ambiente com uma solução de PBS com avidina conjugada a peroxidase (Vectastain, Elite ABC Kit, Vector Laboratories). A peroxidase degrada a diaminobenzidina (DAB) originando um composto de cor acastanhada facilmente detectado a olho nu. Os cortes foram montados em lâminas gelatinadas, desidratados e cobertos com o meio de montagem Eukitt (Fluka).

Para as marcações proteicas em fluorescência, utilizaram-se os mesmos anticorpos primários e nas mesmas diluições e condições tendo sido seguidas de uma incubação de 2h à temperatura ambiente, ao abrigo da luz, nos respectivos anticorpos secundários anti-imunoglobulina de rato e de coelho Alexa 488, 594 e 633 (1:250, Life Technologies). Os cortes histológicos foram montados em lâminas gelatinadas e cobertos com meio de montagem Mowiol (Sigma).

7. Análise dos níveis proteicos por *Western Blot*

Os níveis proteicos de α -syn humana, eGFP, TH, transportador de dopamina (DAT), receptor dopaminérgico D₂ e proteína glial fibrilar ácida (GFAP) foram determinados a partir de tecidos homogeneizados em 200 μ l de uma solução de lise RIPA (Tris 1M [pH 8.0], NaCl 1M, 10% NP-40, 5% desoxicolato de sódio e 10% SDS). Para recolha dos tecidos estriatal e da substância negra foram feitas punções de 3mm e de 2mm de espessura, respectivamente, e ambos com 2mm de diâmetro. As amostras foram sonicadas 4 vezes num sonicador de sonda a 30-40%, durante 5 segundos com um arrefecimento intermédio em gelo. As amostras homogeneizadas foram centrifugadas 20min a 12.000 g, a 4°C, e foi recolhido o seu sobrenadante. Para a determinação da concentração de proteína das amostras foi utilizado o método de Bradford utilizando-se a albumina sérica de bovino (BSA) para traçar a recta de calibração. Seguiu-se a electroforese unidimensional, em gel de SDS-PAGE e electrotransferência para uma membrana de difluoreto de polivinildieno (PVDF – Amersham Life Sciences), previamente activada por imersão sequencial em metanol (5 seg), água (5 min), e tampão de electrotransferência (10mM CAPS e 20% Metanol diluídos em água [pH 8.4]) (20 min). Seguiu-se o bloqueio 1h à temperatura ambiente em solução de 5% de leite ou BSA em TBS-T (20mM de Tris, 0.1% de Tween 20 e 137mM de NaCl) e incubação das membranas durante a noite, a 4°C, com os anticorpos primários: α -syn 211 (1:1000, Santa Cruz Biotechnology); GFP (1:1000, Roche); TH (1:1000, Millipore); DAT (1:500, Chemicon); D₂ (1:500, Millipore) e GFAP (1:1000, Dako); diluídos na solução de bloqueamento. Após 3 lavagens de 15min em TBS-T, as membranas foram incubadas 2h, à temperatura ambiente, com os anticorpos secundários anti-imunoglobulinas de coelho ou de rato produzidos em cabra, e conjugados à fosfatase alcalina (1:10000, Amersham Biosciences), diluídos na solução de bloqueamento. As membranas foram incubadas 5min com o substrato da fosfatase alcalina ECF (ECF Western Blotting Reagent Packs, Amersham) e visualizadas de seguida no Versa-Doc (Biorad).

8. Determinação de Dopamina por HPLC

Para avaliar os níveis de dopamina foi usado o método de cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) de fase reversa com detecção electroquímica (amperométrica). O equipamento utilizado inclui uma bomba Gilson (modelo 307), um auto-injector Gilson (modelo 234; *loop* 50 μ L), um detector Gilson (modelo 142) e *software* UniPoint v5.11.

Os tecidos estriatais, SN e córtex previamente removidos, foram tratados com uma solução 0.4M de ácido perclórico (50 μ L/mg de tecido), seguido de sonicação durante alguns segundos e centrifugação de 20min a 15.700 g. Os sobrenadantes foram recolhidos e conservados a -80°C até posterior utilização. Para a separação e quantificação da dopamina utilizou-se uma coluna ODS 2 Waters Spherisorb® (4.6x250mm; tamanho das partícula: 5 μ m). A fase móvel, desgaseificada e filtrada, foi composta por acetato de sódio trihidratado (0,1M), ácido cítrico monohidratado (0,1M), octilsulfato de sódio (0,5mM), EDTA (0,15mM), dibutilamina (1mM) e metanol (10%) (pH 3,8). O fluxo foi de 1 ml/minuto e a sensibilidade foi mantida a 2nA/V. A concentração de dopamina em cada amostra foi calculada tendo como referência a curva padrão da dopamina e os resultados foram apresentados em pmol/mg de tecido.

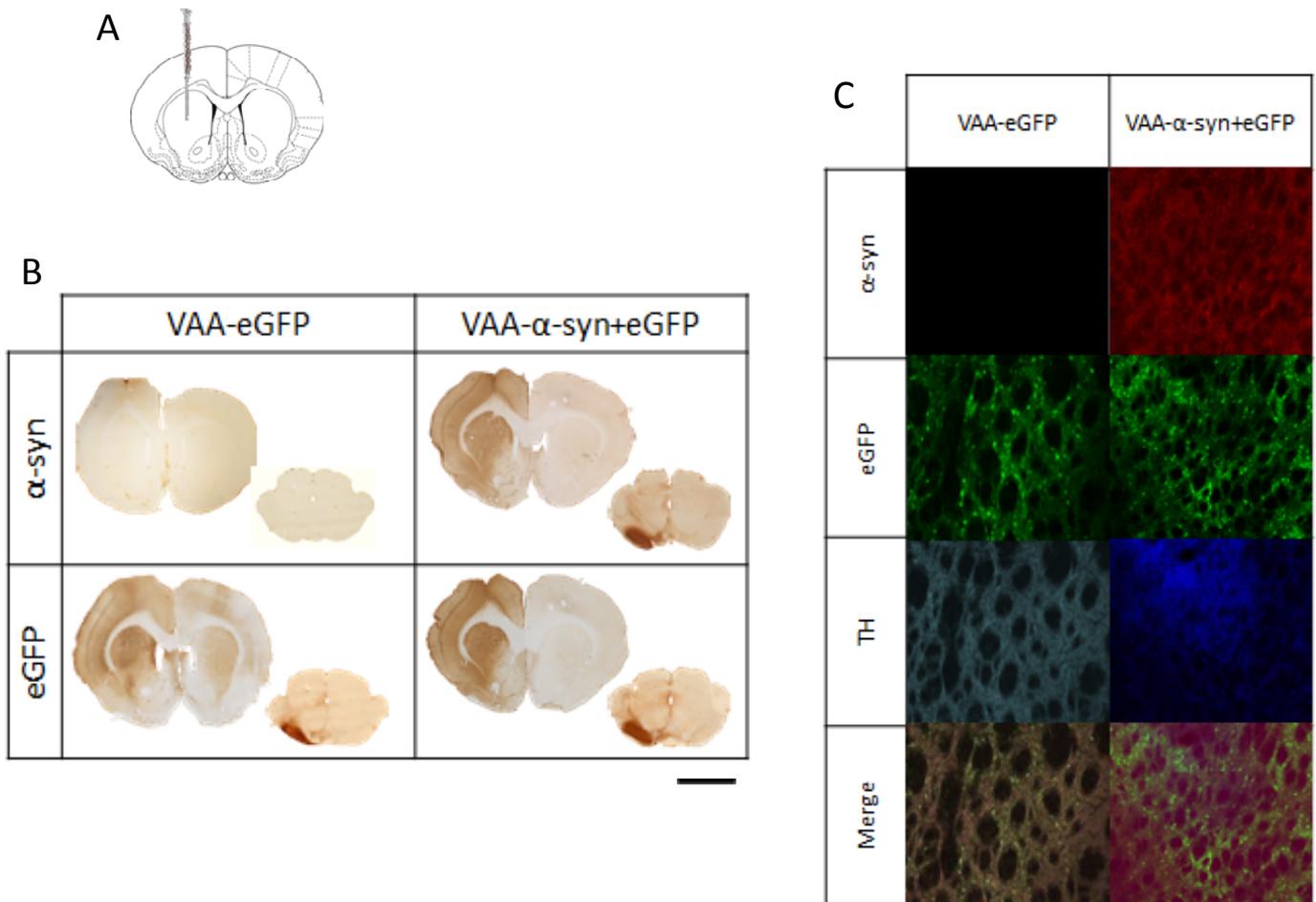
9. Análise de dados e estatística

As imagens de microscopia foram recolhidas com o *software* AxioVision Rel. 4.7; a quantificação de DARPP-32 e TH por densidade óptica foi efectuada com recurso ao *software* ImageJ. A recolha, análise e quantificação das bandas proteicas obtidas por Western blot foi feita utilizando-se o *software* Quantity One; os dados foram expressos como percentagem de valores obtidos relativamente aos respectivos controlos (mínimo n=3) e foram representados como média \pm erro padrão da média (SEM). Para a análise estatística dos dados foi efectuado o teste *t*-student ou análise de variância com dois factores (two-way ANOVA), consoante mencionado no texto, com recurso ao *software* GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). Consideraram-se valores estatisticamente diferentes quando $p < 0.05$.

IV. Resultados

1. Infecção estriatal com vírus adeno-associados

Com o objectivo de validar os vírus adeno-associados injectados no estriado (Fig.13-A) avaliámos por análise histológica a presença das proteínas α -syn e eGFP codificadas pelos mesmos. Observámos uma elevada imunoreactividade da eGFP e/ou α -syn nos hemisférios injectados com VAA-eGFP e VAA- α -syn+eGFP, respectivamente, quer no estriado (Str), quer na substância negra (SN), não tendo estas sido detectadas nos hemisférios contralaterais (Fig.13-B). A dupla marcação por imunofluorescência para a α -syn ou eGFP e em simultâneo para a TH, confirma que os terminais dopaminérgicos positivos para TH no estriado foram transduzidos (Fig.13-C). A avaliação por *western blot* (Fig.13-D) confirmou a presença robusta de ambas as proteínas nas diferentes regiões (Str e SN) nos hemisférios correspondentes às infecções virais ($p < 0.001$).



D

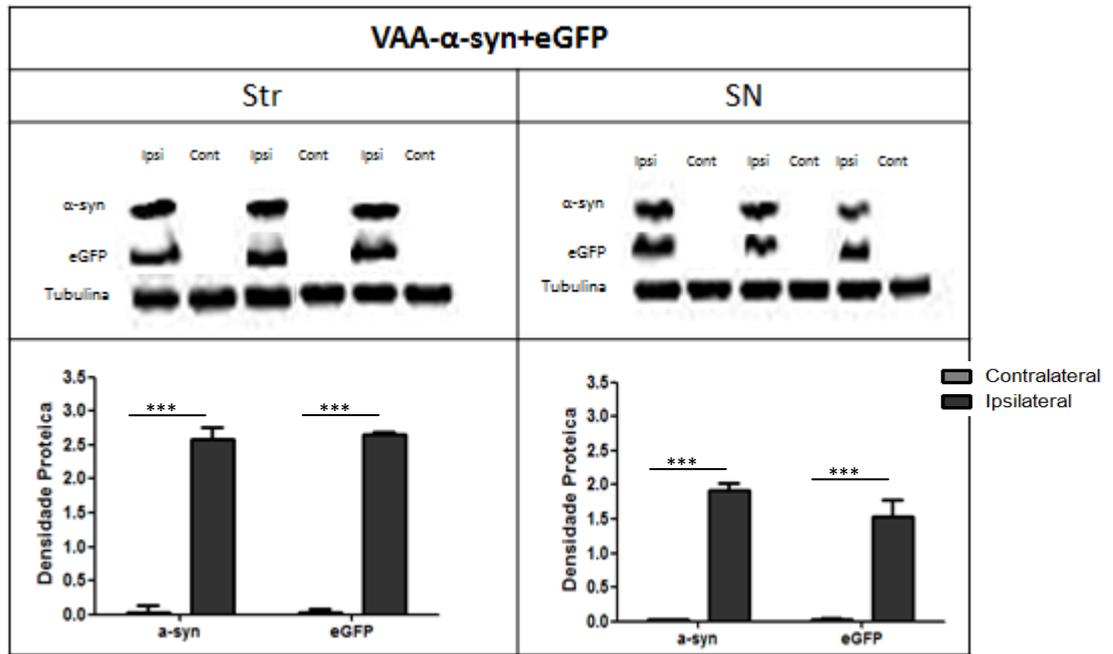


Figura 13. Níveis de α -syn e eGFP transgênicas no sistema nigroestriatal, 6 semanas após as cirurgias. (A) Representação esquemática do procedimento cirúrgico com injeção intra-estriatal de VAA-eGFP ou VAA- α -syn+eGFP. (B e C) Imunoreactividade da α -syn e do eGFP no estriado (Str) e na substância negra (SN). (D) Níveis proteicos da α -syn e do eGFP no Str e na SN (n=3). Os dados representam a média \pm SEM (***) $p < 0.001$; teste two-way ANOVA). Imagens de microscopia confocal (C). Escala: 500 μ m (B) e 200 μ m (C).

2. Transporte retrógrado de α -sinucleína

De forma a avaliarmos se a α -syn é transportada de forma retrógrada, investigámos por imunohistoquímica associada a microscopia confocal se após injeção dos vectores no estriado se detectava a α -syn nas secções nigrais de rato às 6 e 12 semanas após cirurgias. Observámos que na SN *pars compacta* (SNpc) alguns dos neurónios dopaminérgicos TH expressavam α -syn humana, mas não a eGFP (Fig. 14, marcação assinalada com a seta branca) e por outro lado alguns dos neurónios expressavam as duas proteínas (Fig.14, marcação assinalada com a seta laranja). Estes resultados são sugestivos da existência de um transporte retrógrado de α -syn dos neurónios GABAérgicos estriatais para os terminais pré-sinápticos dopaminérgicos, bem como da migração do vector viral VAA para a SNpc, que levou à infecção de algumas células dopaminérgicas, produzindo estas as duas proteínas, sendo que em células que não foram infectadas podemos observar a α -syn captada das células infectadas.

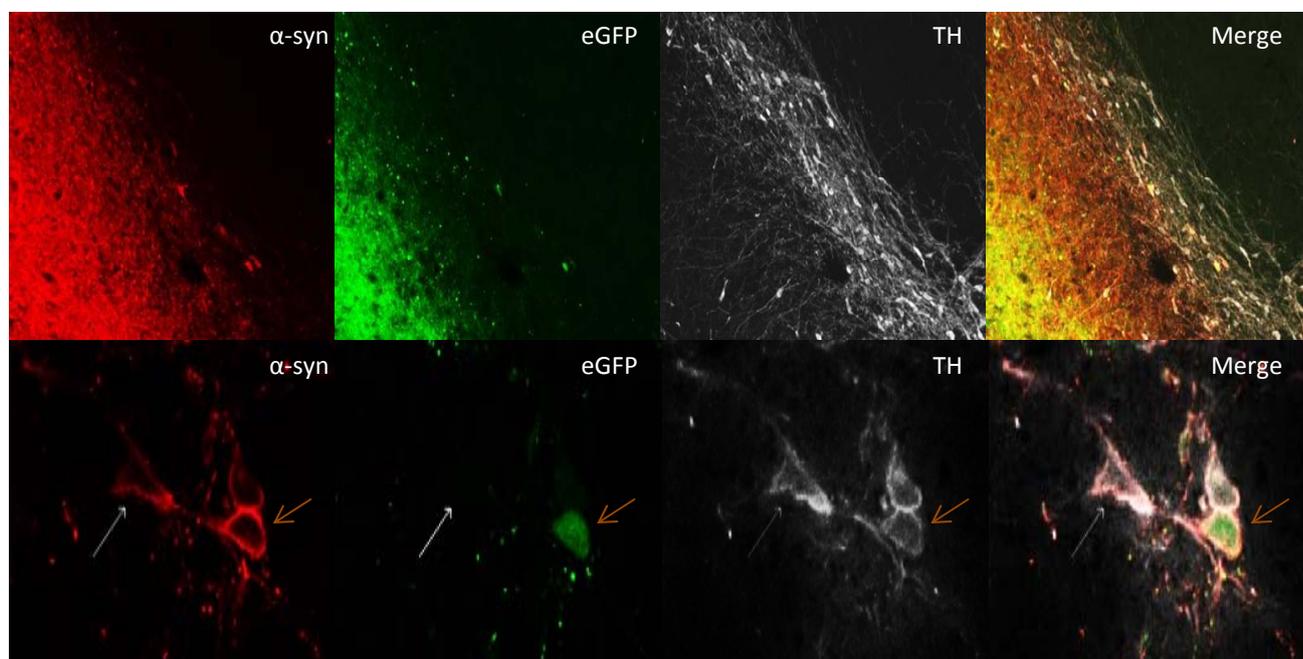


Figura 14. Presença de α -syn e eGFP na SN *pars compacta*, 6 semanas após as cirurgias. Imunoreactividade da α -syn e eGFP em neurónios TH positivos. A seta branca representa neurónios dopaminérgicos positivos para α -syn e negativos para eGFP; a seta laranja representa neurónios dopaminérgicos positivos para α -syn e positivos para eGFP. Imagens de microscopia confocal. Escalas: 200 μ m (painel superior) e 20 μ m (painel inferior).

3. Comportamento rotatório após sobreexpressão intra-estriatal de α -syn

De forma a avaliarmos se a expressão de α -syn recorrendo aos VAAs induziria alterações comportamentais, estimulámos os animais com apomorfina e anfetamina, uma estratégia que permite quantificar défices motores em modelos unilaterais de DP (Gerlach, 1996). A apomorfina originou um comportamento rotatório ipsilateral significativo nos animais injectados com VAA- α -syn+eGFP, às 3 semanas após a cirurgia. A anfetamina induziu um comportamento rotatório semelhante, embora apenas às 6 semanas pós-cirurgia se tenha tornado significativamente diferente (Fig.15). Nem a apomorfina nem a anfetamina induziram modificações assinaláveis às 6 e 12 semanas após as cirurgias nos animais controlo injectados com VAA-eGFP (Fig.15). Estes dados demonstram-nos que a sobreexpressão de α -syn estriatal terá provocado alterações nos circuitos cerebrais directo ou indirecto e/ou na libertação de neurotransmissores.

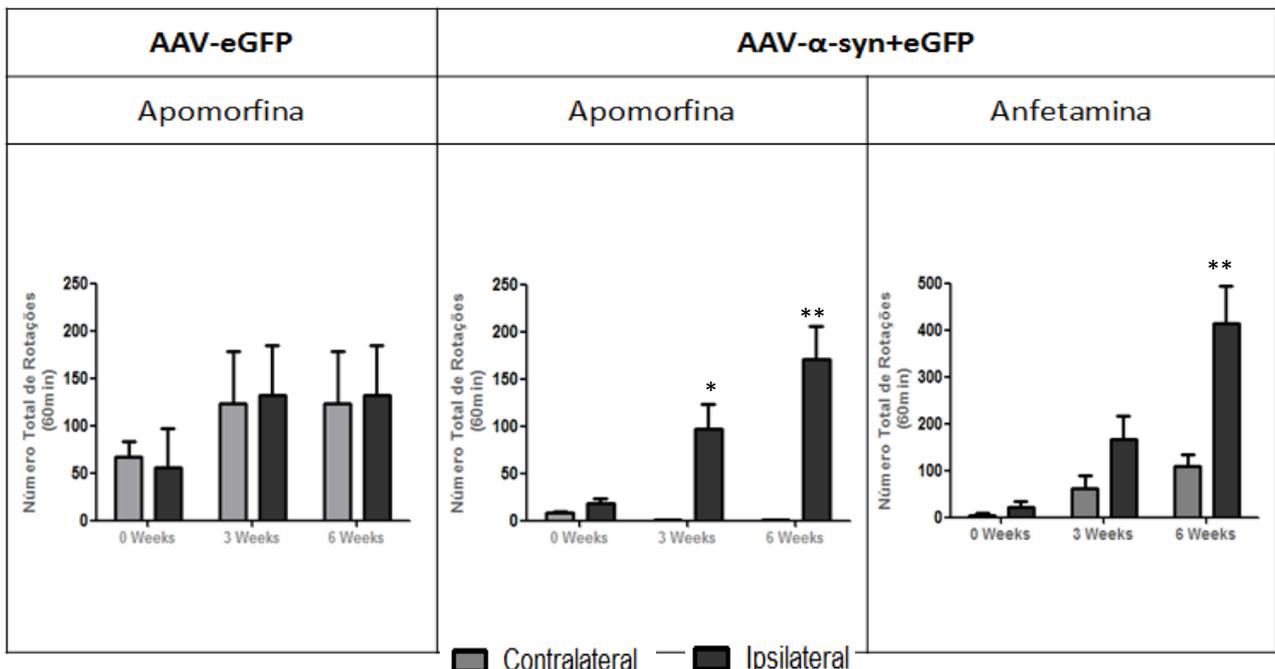


Figura 15. A expressão de α -syn no estriado induz comportamento rotatório ipsilateral. Efeito das injeções intra-estriatais de VAA-eGFP e VAA- α -syn+eGFP sobre o comportamento rotatório dos animais. (Esquerda) Número total de rotações ipsi- e contralaterais nos animais injectados com VAA-eGFP, após estimulação por apomorfina (n=6). (Centro e Direita) Número total de rotações ipsi- e contralaterais nos animais injectados com VAA- α -syn+eGFP após estimulação por apomorfina (n=4) (Centro) ou por anfetamina (n=9) (Direita). Os dados representam a média \pm SEM (* p <0.05 e ** p <0.01; teste two-way ANOVA).

4. A sobreexpressão de α -syn no estriado altera os níveis de DA, mas não dos seus transportadores, nem receptores

Para melhor percebermos a origem do comportamento rotatório ipsilateral após estimulação com apomorfina e anfetamina investigámos os níveis de DA estriatal, nigral e cortical. Os resultados sugerem uma tendência para um ligeiro aumento (não significativo) nos níveis de DA estriatal no hemisfério injectado, 6 semanas após injeção estriatal de VAA- α -syn+eGFP, sendo que na SN se mantiveram inalterados. Curiosamente, no córtex motor observaram-se níveis de DA mais elevados no hemisfério que expressava α -syn, significativamente diferentes quando comparados com o hemisfério não injectado ($p < 0.05$) (Fig.16).

Investigámos também possíveis alterações nos transportadores de DA, recorrendo à quantificação dos níveis proteicos de DAT no estriado e na SN e da imunoreactividade estriatal para o VMAT-2. Verificámos que para o DAT existe um ligeiro aumento no hemisfério injectado, em ambas as estruturas cerebrais, e uma ligeira diminuição de imunoreactividade estriatal de VMAT-2, quando comparado com o hemisfério não injectado, sendo que estas diferenças não foram significativas (Fig.17-A e B). Ainda com o mesmo propósito, avaliámos os níveis proteicos dos receptores dopaminérgicos D_2 , tanto no estriado como na SN, mas mais uma vez não foram observadas diferenças significativas entre os dois hemisférios (Fig.17-C).

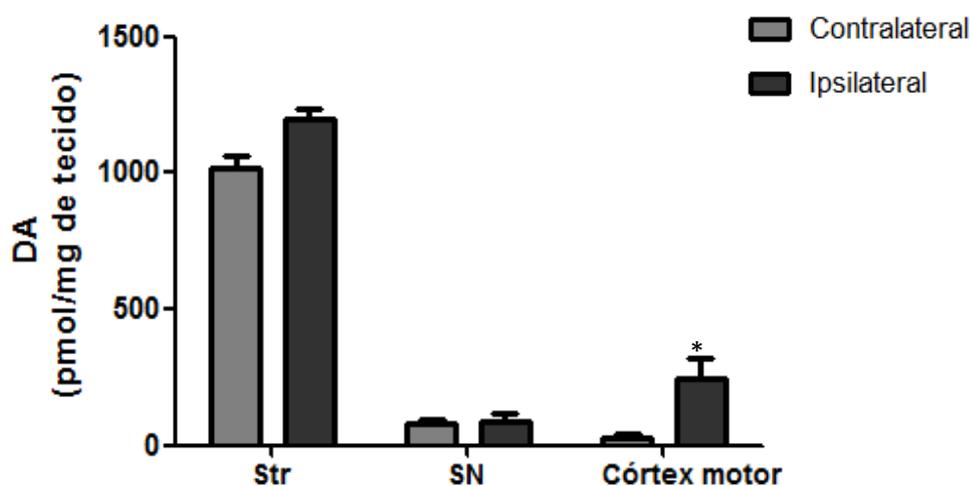


Figura 16. Níveis de DA no Str, SN e Córtex motor, 6 semanas após injeção dos vectores que expressavam α -syn. Os valores apresentam-se em pmol/mg de tecido (n=3). Os dados representam a média \pm SEM (* $p < 0.05$; teste two-way ANOVA).

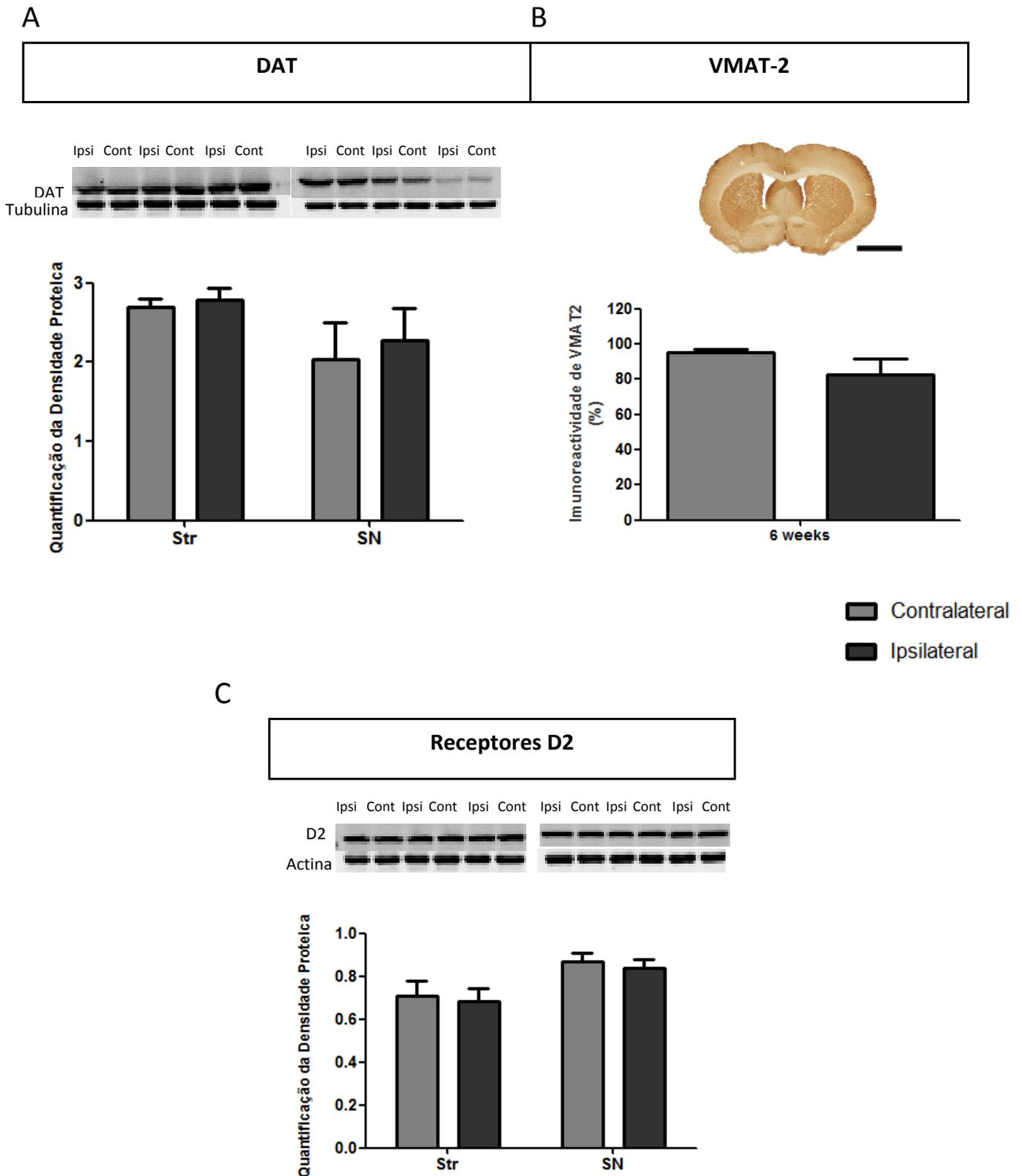


Figura 17. Níveis de transportadores e receptores dopaminérgicos, 6 semanas após injeção dos vectores codificando α -syn. (A) Níveis proteicos de DAT no Str e SN (n=3). (B) Densitometria óptica de VMAT2 no Str (n=4). (C) Níveis proteicos de receptores D₂ no Str e SN (n=3). Os dados representam a média \pm SEM ($p > 0.05$; teste *t*-student; teste two-way ANOVA). Escala: 500 μ m (B).

5. A sobreexpressão de α -syn no estriado induz alterações de imunoreactividade das proteínas DARPP-32 e GFAP

De forma a explicarmos os resultados iniciais do estudo de comportamento animal, avaliámos o impacto da sobreexpressão da α -syn na neuropatologia estriatal. Para este efeito procedemos à análise imunohistoquímica da proteína DARPP-32 às 6 e 12 semanas após injeções de VAA-eGFP e VAA- α -syn+eGFP em secções estriatais. Avaliámos também a imunoreactividade de TH e os níveis proteicos de GFAP às 6 semanas após injeção de VAA- α -syn+eGFP em secções estriatais e ainda em secções da SN para a proteína TH.

Observámos modificações significativas no estriado, com perda de imunoreactividade para a proteína DARPP-32 às 6 semanas (Fig.18-A;B, $p<0.05$), após transdução com VAA- α -syn+eGFP, sendo que esta perda se acentuou às 12 semanas ($p<0.01$), quando comparada com os animais do grupo controlo, injectados com VAA-eGFP (Fig.18). Relativamente aos níveis proteicos da GFAP, observámos um aumento significativo no hemisfério injectado ($p<0.05$), quando comparado com o hemisfério não injectado, após transdução com VAA- α -syn+eGFP (Fig.19). Após marcação das secções para TH, a análise histológica indicou-nos que houve uma ligeira perda (não significativa) de corpos celulares na SNpc e também de fibras estriatais no hemisfério injectado, às 6 semanas, em comparação com o hemisfério contralateral, tendo-se observado resultados similares às 12 semanas (Fig.20).

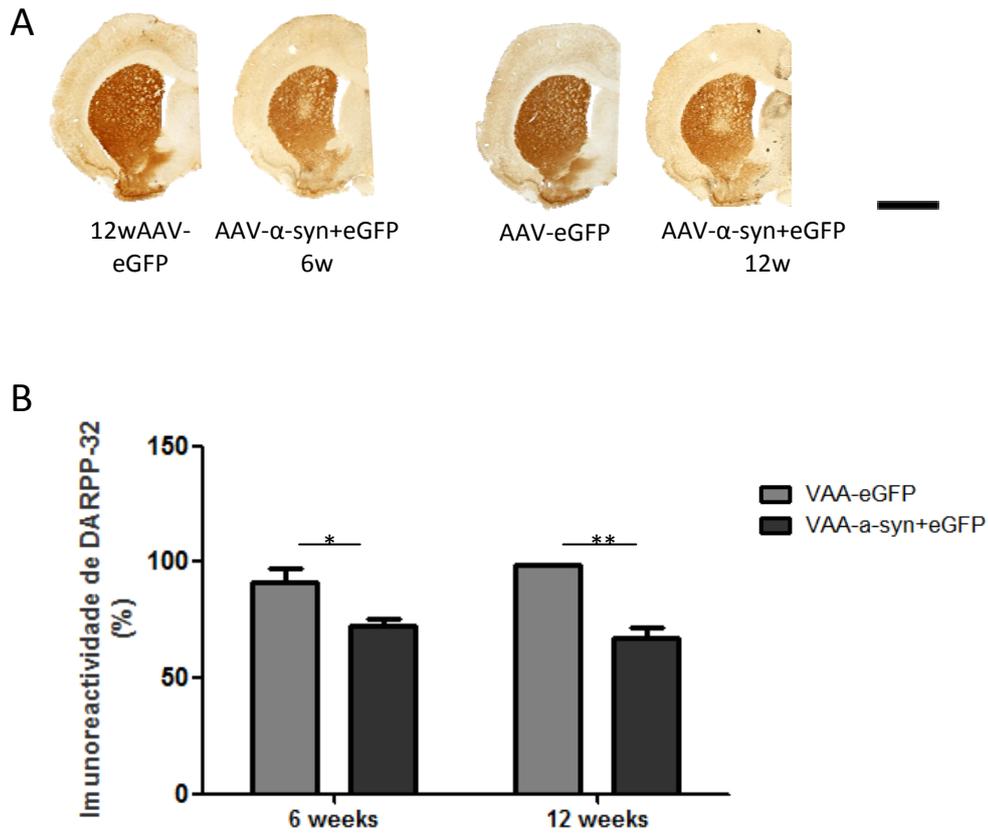


Figura 18. Análise da densitometria óptica estriatal para DARPP-32, 6 e 12 semanas após injeção de VAAs codificando para α -syn. (A e B) Imunoreactividade de DARPP-32 no estriado com injeção de VAA-eGFP ou VAA- α -syn+eGFP (n=4). Os dados representam a média \pm SEM (* p <0.05 e ** p <0.01; teste 2-way ANOVA).

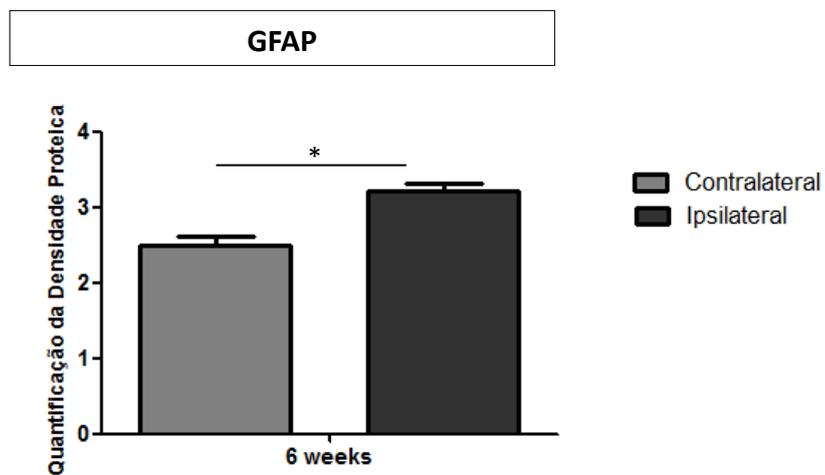


Figura 19. Níveis proteicos de GFAP no Str (n=3), às 6 semanas. Os dados representam a média \pm SEM (* p <0.05; teste *t-student*).

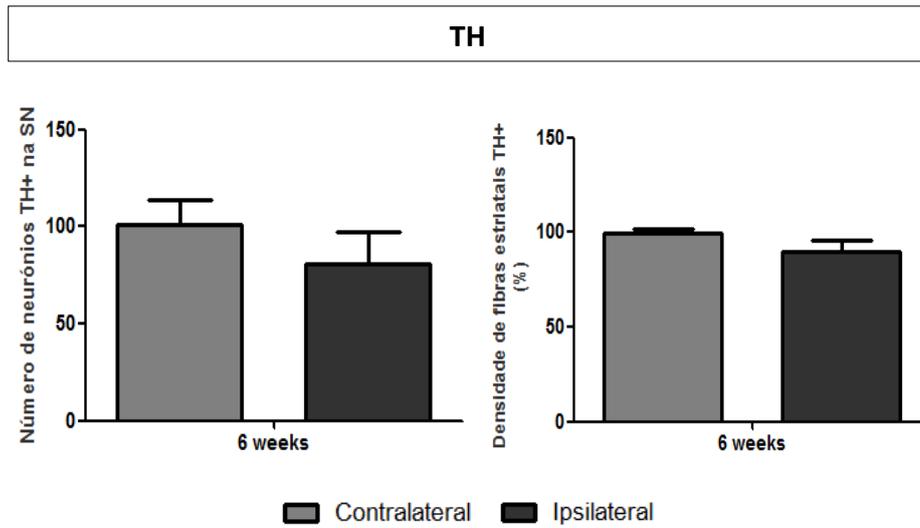


Figura 20. Quantificação de corpos celulares TH+ na SNpc e densidade de fibras estriatais TH+ (n=4). Os dados representam a média \pm SEM ($p > 0.05$; teste *t-student*).

6. Núcleos talâmicos afectados pela sobreexpressão de α -syn estriatal

A análise histológica das secções do cérebro dos animais após infecção estriatal com VAAs revelou que tanto o estriado como a SN apresentavam elevada imunoreactividade para a α -syn humana e eGFP (Fig.13-B). Nas mesmas secções observámos que o córtex motor também apresentava imunoreactividade para estas proteínas o que nos levou a investigar a localização da α -syn e eGFP noutras regiões cerebrais além das já referidas. Em secções colhidas 6 semanas após injeção dos VAA- α -syn+eGFP, onde é clara a imunomarcção para a α -syn na SN, observámos imunomarcção também na zona dos núcleos do tálamo, sendo que esta diminui à medida que nos aproximamos da SN e nos afastamos do tálamo (Fig.21). O mesmo foi observado para a imunomarcção de eGFP, sendo que esta proteína também se encontra no estriado, SN, córtex motor e no tálamo do hemisfério injectado.

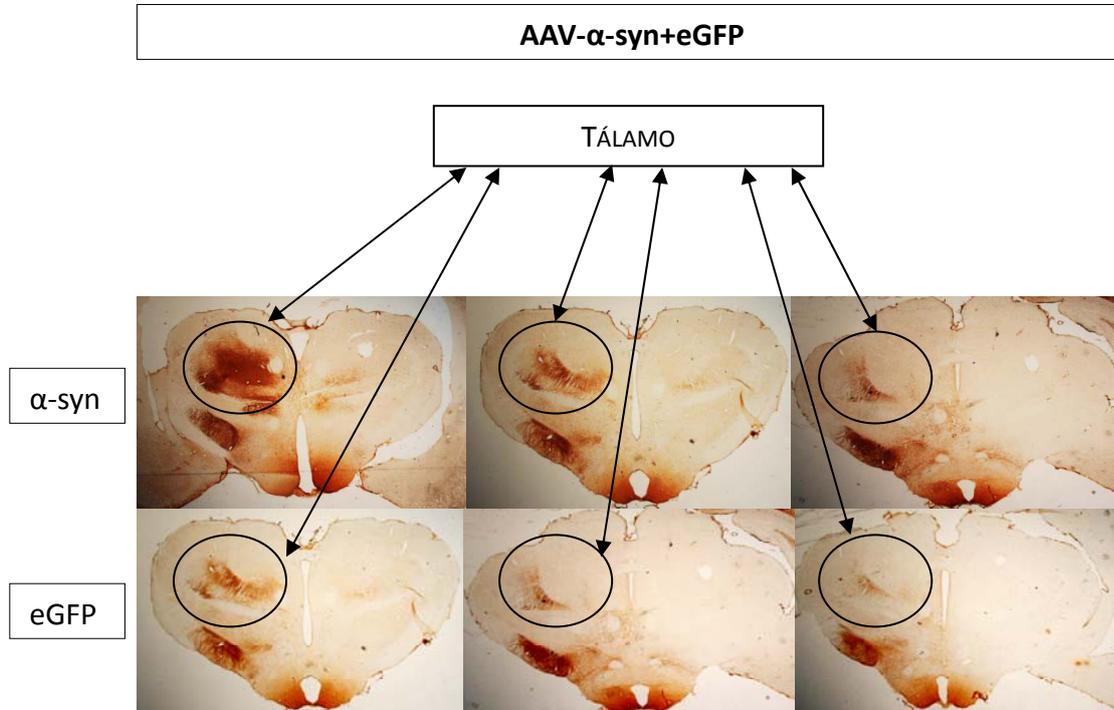


Figura 21. Expressão de α -syn e eGFP nos núcleos talâmicos (ou tálamo), 6 semanas após as cirurgias. Escala: 500 μ m.

V. Discussão

Os modelos roedores da DP são ferramentas cruciais tanto na pesquisa básica dos mecanismos envolvidos na doença como na busca de novas estratégias terapêuticas. Um modelo animal deve reproduzir aspectos e características patológicas presentes no homem, sendo que os modelos disponíveis reproduzem de forma apenas parcial os aspectos patológicos da DP.

Embora determinados modelos animais mimetizem os principais marcadores neuropatológicos da doença, como por exemplo a acentuada perda de neurónios dopaminérgicos na SNpc, e tenham vindo a permitir fundamentar os sintomas principais da DP (Marsden *et al.*, 1994), não reproduzem todo o processo etiopatogénico. As evidências de um papel determinante da α -syn na DP inspiraram o desenvolvimento de novos modelos da doença por sobreexpressão de α -syn em roedores por recurso a vectores virais (Lo Bianco *et al.*, 2002). Esta estratégia foi inicialmente desenvolvida para produzir modelos da doença de Huntington (de Almeida, 2002) e mais recentemente da doença de Machado-Joseph (Alves *et al.*, 2008; Nóbrega *et al.*, 2013). Lo Bianco *et al.*, recorreram à sobreexpressão da α -syn na SN, a região que apresenta maiores evidências de degeneração na DP (Lo Bianco *et al.*, 2002).

Neste trabalho, de forma a permitir a investigação do transporte retrógrado da α -syn (Hansen and Angot *et al.*, 2011; Yasuda *et al.*, 2012), e do seu papel na progressão da DP, pelo seu alastramento e posterior acumulação noutras zonas do cérebro, desenvolvemos um novo modelo da DP mediante utilização de vectores VAA para sobreexpressão da proteína α -syn humana na região do estriado.

Seis semanas após a injeção de vectores virais no estriado, observou-se uma extensa cobertura da região alvo com o transgene, independentemente de se tratar do vector VAA- α -syn+eGFP ou VAA-eGFP. Assim, foi observada imunoreactividade para a α -syn e fluorescência da eGFP na maioria das fibras estriatais, abrangendo todo o estriado. A SN apresentou igualmente imunoreactividade para a α -syn e fluorescência da eGFP, indicando que o vector viral poderá ter migrado pelas aferências estriatais até aos neurónios dopaminérgicos nigrais e GABAérgicos da SN,

o que nos sugere que estas regiões também terão produzido as proteínas mediadas pelo vector. No entanto, quando fomos verificar a existência de transporte retrógrado da proteína α -syn na SNpc, observámos que alguns dos neurónios dopaminérgicos apresentavam marcação simultânea, positiva, tanto para TH como para α -syn humana, mas nem imunoreactividade nem fluorescência directa para a eGFP nesses mesmos corpos celulares. Estes dados vieram dar ênfase à ideia de transporte de α -syn entre neurónios, sugerindo que esta proteína ou sofreu um transporte retrógrado pelas vias nigroestriatais até à SNpc, e se distribuiu pelos neurónios dopaminérgicos, ou em alternativa, que foi produzida nos neurónios dopaminérgicos após a infecção viral, tendo posteriormente sido libertada por células dadoras e captada por células receptoras que não tinham sido infectadas pelo vírus.

Os modelos animais com indução patológica unilateral, permitem mediante estimulação com agonistas da dopamina e/ou antagonistas dopaminérgicos, induzir um comportamento rotatório nos animais fornecendo assim dados quantitativos das alterações ao nível dos circuitos de controlo motor (Ungerstedt, 1971). Assim, com o intuito de avaliar o impacto do transporte retrógrado de α -syn humana no comportamento, avaliámos o comportamento rotatório após administração de apomorfina ou anfetamina. Os animais que receberam uma injeção de VAA- α -syn+eGFP no estriado, após estimulação com apomorfina e anfetamina, exibiram alterações motoras significativas que progrediram com o tempo. Estas alterações verificaram-se precocemente, 3 semanas após transdução viral, e foram-se agravando ao longo das semanas em estudo. No final das 6 e 12 semanas todos os animais tinham desenvolvido assimetrias motoras no teste de rotação.

Após a administração de anfetamina, a rotação ocorreu no sentido ipsilateral à injeção com VAA- α -syn+eGFP, em consonância com uma lesão no hemisfério injectado. Este comportamento, após indução com anfetamina, é concordante com as descrições na literatura. A anfetamina actua como um agonista indirecto da DA, aumentando a sua libertação e inibindo a sua recaptação, resultando num aumento de DA em receptores pós-sinápticos. Sendo assim, o animal apresenta actividade rotacional ipsilateral à lesão, pois são as fibras existentes que promoverão a

libertação de DA no estriado e estas estão em maior número no hemisfério não-lesado (Kuczenski & Segal, 1997; Chopin & Colpaert *et al.*, 1999).

Após administração da apomorfina, a rotação ocorria no sentido ipsilateral à sobreexpressão da α -syn. Sendo a apomorfina um agonista directo de receptores D_1 e D_2 da DA, esperava-se que a estimulação dos receptores sensibilizados do hemisfério lesionado induzisse uma rotação contralateral à lesão (Ungerstedt, 1971; Hudson, van Horne *et al.*, 1993). No entanto, ao contrário do esperado observámos em todos os animais uma rotação para o lado da lesão. Por outro lado a actividade rotacional induzida pela administração de apomorfina tem sido associada a uma extensão de lesão alargada, superior a 80% de morte dos neurónios dopaminérgicos, na SNpc (Hefti, Melamed *et al.*, 1980), observação com a qual os nossos resultados não se revelaram concordantes.

De forma a investigarmos a origem deste comportamento rotatório, analisámos os níveis de DA no estriado, SN e córtex. Observámos que os níveis de DA no estriado estavam ligeiramente aumentados no hemisfério em que foi sobreexpressa a α -syn, em relação ao hemisfério não injectado; na SN não observámos diferenças e no córtex motor os níveis de DA encontravam-se significativamente aumentados no lado injectado. Estes resultados são particularmente interessantes mas não eram esperados dado que a sobreexpressão de α -syn foi acompanhada por perda de marcadores nas estruturas referidas. A tendência observada de aumento dos níveis de DA no estriado sugere que no momento da análise poderá não ter havido degeneração de neurónios dopaminérgicos no hemisfério injectado, mas outra modificação ou alteração que também se reflectiu no córtex motor, onde os níveis estavam significativamente elevados, sugerindo alterações nos circuitos motores (Alexander & Crutcher, 1990).

De forma a melhor compreendermos porque é que a sobreexpressão de α -syn levou a este comportamento rotatório, fomos apurar também os níveis de transportadores de DA e das vesículas transportadoras de monoaminas, assim como dos receptores dopaminérgicos D_2 . Não encontramos diferenças significativas entre os dois hemisférios, mas podemos ver pequenas alterações nos DAT, que estão ligeiramente aumentados no estriado e SN do lado injectado, e na VMAT-2, que

estão ligeiramente diminuídas no estriado do lado injectado. Este ligeiro aumento de DAT pode ser associado ao aumento de DA, ou seja, o aumento de DA no estriado poderá ter induzido um aumento de expressão de DAT de forma a recaptar a DA, evitando assim o excesso desta. A DAT é uma proteína da membrana plasmática, expressa exclusivamente em neurónios dopaminérgicos que recapta a DA libertada na membrana sináptica, regulando assim a amplitude e a duração da sinalização da DA (Bannon, 2005). Na DP está descrita uma redução da densidade do DAT devido à perda dos terminais dopaminérgicos (Storch *et al.*, 2004). Neste trabalho isso não se verifica, sugerindo que durante o tempo de estudo não ocorreram perda de neurónios ou terminações dopaminérgicas, o que nos levou a verificar de seguida as densidades de TH. Já a diminuição dos níveis proteicos da VMAT-2 (transporta monoaminas como serotonina, dopamina e histamina), responsável pela translocação das monoaminas do citoplasma para as vesículas sinápticas, demonstramos que essa redução levou a um aumento citosólico de DA, o que pode levar à formação de espécies oxidativas de DA. Há evidências que o decréscimo da actividade da VMAT-2, conjuntamente com o aumento citosólico dos níveis de DA, pode levar à neurodegeneração na presença de α -syn (Caudle, *et al.* 2007). Estas observações sugerem que ocorreram alterações no estriado após a sobreexpressão da α -syn e posterior transporte da mesma, mas não permitem justificar o comportamento rotatório obtido.

A TH é utilizada como marcador para os neurónios dopaminérgicos e permite identificar perdas ou alterações neuronais na via nigroestriatal (Cuellar, 1978). Neste trabalho vimos que na SNpc existiu uma ligeira perda, não significativa, de corpos celulares marcados positivamente para a TH e que as fibras estriatais positivas para TH não sofreram qualquer tipo de lesão ou alteração significativa, após sobreexpressão de α -syn. Este resultado sugere-nos, em conjunto com os anteriores, que a α -syn não provocou degeneração imediata nos neurónios dopaminérgicos ou na via nigroestriatal, mas apenas uma disfunção que resultou em alterações nos níveis de DA e no comportamento rotacional dos animais.

Com o objectivo de verificarmos se a α -syn poderia ter causado modificações funcionais no estriado que levassem ao comportamento rotacional, marcámos a

fosfoproteína regulada por DA e AMPc, a DARPP-32, no estriado. Os nossos resultados foram positivos, ainda que pouco robustos para justificar o comportamento. Observámos perda significativa de imunoreactividade de DARPP-32, que aumentou ao longo do tempo de estudo, na zona mais central do estriado. Dado que a DARPP-32 tem um papel importante na modulação da transdução da sinalização dopaminérgica, a depleção desta proteína no estriado poderá ter contribuído para uma desregulação do sistema e contribuído para as assimetrias motoras.

A GFAP, proteína glial fibrilar ácida, é um marcador específico para astrócitos (Eng *et al.*, 2000). Um aumento significativo do número de células astrogliais positivas para GFAP pode ser detectado próximo a uma contusão cortical após um stresse cerebral (Hausmann *et al.*, 2000). No nosso estudo observámos um aumento significativo da densidade proteica de GFAP no estriado. Um aumento de GFAP pode ser devido à migração de astrócitos positivos para GFAP, próximo à lesão, ou à proliferação de uma nova população de astrócitos (Ajtai & Kálmán, 1998). A elevada expressão de GFAP, característica da astrogliose, ocorre quando os astrócitos são activados em resposta a uma situação de stresse ou a um aumento anormal da actividade neuronal (Hansen *et al.*, 1990). Estes dados estão de acordo com a perda de funcionalidade vista anteriormente com a proteína DARPP-32 e podem ser uma resposta à lesão provocada pela sobreexpressão da α -syn.

A marcação para a α -syn com o objectivo de investigar a sua presença após a injeção viral, revelou que além do estriado e da SN também o córtex motor no hemisfério transduzido apresentava marcação, tanto para a α -syn como para a eGFP. Estes dados levaram-nos a pesquisar a α -syn e eGFP noutras regiões cerebrais. Os núcleos talâmicos (ou tálamo) apresentaram marcação positiva para ambas as proteínas, o que pode ter contribuído para alteração ao nível dos circuitos motores das vias directa e indirecta; tal como a marcação do córtex motor que também foi positiva para ambas as proteínas, e apresentou inicialmente um aumento significativo dos níveis de DA.

Neste estudo verificámos que após sobreexpressão de α -syn no estriado ocorreu um transporte retrógrado da mesma para outras zonas do cérebro, nomeadamente a

SNpr, onde observámos neurónios dopaminérgicos imunorreactivos para α -syn mas não para a eGFP. Estes eventos levaram-nos a investigar alterações e/ou modificações nos marcadores característicos da DP. Os resultados obtidos sugerem que este pode ser um novo modelo genético correspondente a uma fase inicial da doença de Parkinson. São necessários estudos mais prolongados (6 meses a 1 ano, ou mais) para podermos avaliar a progressão, ou não, para a neurodegeneração observada nas fases tardias da doença.

VI. Conclusões

As recentes evidências de transporte intercelular da proteína α -sinucleína levaram-nos a investigar neste trabalho se a expressão desta proteína no estriado seria suficiente para induzir alterações neuropatológicas e comportamentais típicas da doença de Parkinson.

Utilizando vectores virais adenoassociados sobreexpressámos α -sinucleína e eGFP no estriado do rato e avaliámos o comportamento motor induzido por apomorfina e anfetamina e a neuropatologia no estriado e SNpc. Esperava-se que esta estratégia permitisse conduzir a uma presença da α -sinucleína na substância negra *pars compacta*, sem lesão cirúrgica local, mimetizando a DP.

A observação de α -sinucleína em neurónios dopaminérgicos da SNpc sugere que ocorre um transporte desta proteína de célula para célula que poderá contribuir para a patogénese da DP. Por outro lado, a indução de um comportamento rotatório ipsilateral após administração de apomorfina e anfetamina, aumento dos níveis de DA no estriado e no córtex motor, perda de imunoreactividade para a proteína DARPP-32, aumento da expressão da proteína GFAP e diminuição de corpos celulares e fibras estriatais positivas para a TH em ratos Wistar injectados com VAA- α -syn+eGFP sugerem que a α -sinucleína tenha provocado alterações neuropatológicas nas vias motoras.

Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que a sobreexpressão estriatal de α -sinucleína poderá reproduzir a DP numa fase inicial, constituindo assim um novo modelo genético desta doença. Como a DP é uma doença progressiva, o prolongamento do tempo de estudo poderá permitir a reprodução de outras características associadas à doença, tais como a degeneração dopaminérgica nigroestriatal, de forma a validar um modelo genético progressivo da doença de Parkinson. Espera-se que este modelo contribua para a compreensão e tratamento da doença de Parkinson.

VII. Bibliografia

Abbott, A. (2010) "Levodopa: the story so far." *Nature*, 466:56-57.

Ajtai, B. M. and Kálmán, M. (1998) "Glial fibrillary acidic protein expression but no glial demarcation follows the lesion in the molecular layer of cerebellum." *Brain Research*, 802:285-288.

Alexander, G. E. & Crutcher, M. D. (1990) "Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing." *Trends Neuroscience* 13(7):266-71.

Alves, S., Nascimento-Ferreira, I., *et al.* (2008) "Allele-specific RNA silencing of mutant ataxin-3 mediates neuroprotection in a rat model of Machado-Joseph disease." *PLoS One*, 3(10):e3341.

Angot, E. & Brundin, P. (2009) "Dissecting the potential molecular mechanisms underlying α -synuclein cell-to-cell transfer in Parkinson's disease." *Parkinsonism and Related Disorders*, S143-S147.

Ahn, K. J., Paik, S. R., Chung, K. C., Kim, J. (2006) "Amino acid sequence motifs and mechanistic features of the membrane translocation of alpha-synuclein." *J. Neurochem.*, 97:265-79.

Bannon, M. J. (2005) "The dopamine transporter: role in neurotoxicity and human disease." *Toxicol Appl Pharmacol.*, vol.204, n.3, p.355-360.

Betarbet, R., Sherer, T. B., and Greenamyre, J. T. (2002) "Animal models of Parkinson's disease." *BioEssay*, vol.24, no.4, pp.308-318.

Blandini, F., Armentero, M. T. and Martignomi, E. (2008) "The 6-hydroxydopamine model: news from the past." *Parkinsonism and Related Disorders*, vol.14, no.2, pp.S124-S129.

Blesa, J. *et al* (2012) "Classic and New Animal Models of Parkinson's Disease." *Journal of Biomedicine and Biotechnology*.

Bonifati, V. *et al.* (2003) "Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism." *Science* 299(5604), pp.256-9.

Braak, H., Sandmann-Keil, D., *et al.* (1998) "Extensive axonal Lewy neurites in Parkinson's disease: a novel pathological feature revealed by alpha-synuclein immunocytochemistry." *Neuroscience letters* 265(1):67-69.

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

Braak, H., Ghebremedhin, E., *et al.* (2004) "Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology." *Cell Tissue Res.* 318: 121–134.

Brundin, P., Angela C. M., *et al.* (2006) "On the move to stimulate cell plasticity in the substantia nigra in Parkinson's disease." *Experimental neurology* 201(1):1-6.

Brundin, P., Li, J. Y., Holton, J. L., Lindvall, O., Revesz, T. (2008) "Research in motion: the enigma of Parkinson's disease pathology spread." *Nat. Rev. Neurosci.*, 9:741–5.

Cabin, D. E., Shimazu, K., (2002) "Synaptic vesicle depletion correlates with attenuated synaptic responses to prolonged repetitive stimulation in mice lacking alpha-synuclein." *J. Neurosci.*, 22:8797–8807.

Caudle, W. M., *et al.* (2007) "Reduced vesicular storage of dopamine causes progressive nigrostriatal neurodegeneration." *The Journal of Neuroscience*, 27(30):8138-8148.

Carlsson A. (1967) "Selective protection of 5-hydroxytryptamine store against the action of reserpine by treatment with 5-hydroxytryptophan." *J. Pharmacol.*, 19:783-784.

Chopin, P., Colpaert, F. C., *et al.* (1999) "Effects of alpha-2 adrenoceptor agonists and antagonists on circling behavior in rats with unilateral 6-hydroxydopamine lesions of the nigral striatal pathway." *J. Pharmacol. Exp. Ter.* 288(2):798-804.

Clayton, D.F. & George, J.M. (1998) "The synucleins: a family of proteins involved in synaptic function, plasticity, neurodegeneration and disease." *Trends in neurosciences*, 21(6), pp.249-54.

Conway, K. A., Rochet, J. C., Bieganski, R. M., Lansbury, P. T. (2001) "Kinetic stabilization of the α -synuclein protofibril by a dopamine- α -synuclein adduct." *Science*, 294:1346–1349.

Cookson, M. (2009) "alpha-Synuclein and neuronal cell death." *Molecular neurodegeneration* 4:9.

Cuello, A. C. – *Immunocytochemical studies of the distribution of neurotransmitters and related substance in CNS*. Handbook of Psychopharmacology, v.9, p.69-137. New York: Plenum Press, 1978.

Danzer, K.M., Haasen, D., *et al.* (2007) "Different species of alpha-synuclein oligomers induce calcium influx and seeding." *J. Neurosci.*, 27, 9220–9232.

Dauer, W., Przedborski, S. (2003) "Parkinson's disease: mechanisms and models." *Neuron*, vol.39, no.6, pp.889-909.

de Almeida, L., Ross, C., *et al.* (2002) "Lentiviral-mediated delivery of mutant huntingtin in the striatum of rats induces a selective neuropathology modulated by polyglutamine repeat size, huntingtin expression levels, and protein length." *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 22(9):3473-3483.

Del Tredici, K. & Braak, H. (2004) "Idiopathic Parkinson's disease: staging an α -synucleinopathy with a predictable pathoanatomy." In *Molecular Mechanisms in Parkinson's disease*. P. Kahle & C. Haass, Eds.: 1–32. Landes Bioscience. Georgetown, TX.

Decressac, M., Mattsson, B., *et al.* (2012) "Comparison of the behavioural and histological characteristics of the 6-OHDA and α -synuclein rat models of Parkinson's disease." *Experimental neurology* 235(1):306-315.

Decressac, M., Mattsson, B., *et al.* (2012) "Progressive neurodegenerative and behavioural changes induced by AAV-mediated overexpression of α -synuclein in midbrain dopamine neurons." *Neurobiology of disease* 45(3):939-953.

Eng, L. F., Ghirnikar, R. S., Lee, Y. L. (2000) "Glial Fibrillary Acidic Protein: GFAP-Thirty-one years (1969-2000)." *Neurochemical Research*, 25:1439-1451.

Feany, M. B. and Bender, W. W. (2000) "A *Drosophila* model of Parkinson's disease," *Nature*, vol.404, no.6776, pp.394–398.

Gay, W. P., Yuan, H. X., Li, X. Q., Power, J. T. H., Blumbergs, P. C., Jensen, P. H. (2000) "In situ and in vitro study of colocalization and segregation of alpha-synuclein, ubiquitin, and lipids in Lewy Bodies." *Experimental Neurology*, 324-33.

Galvin, J. E. (2001) "Synucleinopathies: Clinical and Pathological Implications." *Archives of Neurology*, 58(2), pp.186-190.

Garrido, M., *et al.* (2011) "Glutathione depletion and overproduction both initiate degeneration of nigral dopaminergic neurons." *Acta Neuropathol.*, 121(4): 475–485.

Gerlach, M. and Riederer P. (1996) "Animal models of Parkinson's disease: An empirical comparison with the phenomenology of the disease in man." *Journal of Neural Transmission*, 103(8-9):987-1041.

Gil, E. R. D. L. T. (2009) "*Estudio de la Fosforilación de parkina y sus implicaciones en la Enfermedad de Parkinson.*"

Gillies, G. E., *et al.* (2004) "Sex dimorphisms in the neuroprotective effect of estrogen in an animal model of Parkinson's disease." *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 78, 513-522.

Giasson, B. I., Uryu, K., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M. (1999) "Mutant and wild type human alpha-synucleins assemble into elongated filaments with distinct morphologies in vitro." *J. Biol. Chem.*, 274:7619–7622.

Giasson, B. I., *et al.* (2001) "Prominent perikaryal expression of alpha- and beta-synuclein in neurons of dorsal root ganglion and in medullary neurons." *Experimental neurology*, 172(2), pp.354-62.

Giasson, B. I., Duda, J. E., Quinn, S. M., Zhang, B., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M. Y. (2002) "Neuronal α -synucleinopathy with severe movement disorder in mice expressing A53T human α -synuclein." *Neuron*, vol.34, no.4, pp.521–533.

Guerrero, E., Vasudevaraju, P., *et al.* (2012) "Recent Advances in α -Synuclein Functions, Advanced Glycation, and Toxicity: Implications for Parkinson's Disease." *Molecular neurobiology*.

Greenbaum, E. A., Graves, C. L., Mishizen-Eberz, A. J., Lupoli, M. A., Lynch, D. R., Englander, S. W., Axelsen, P. H., Giasson, B. I. (2005) "The E46K mutation in α -synuclein increases amyloid fibril formation." *J. Biol. Chem.* 280:7800–7807.

Hansen, A., Jørgensen, O. S., Olwig, T. G., Barry, D. I. (1990) "Hippocampal kindling alters the concentration of glial fibrillar acidic protein and other marker proteins in rat brain." *Brain Research*, 531:307-311.

Hansen, C., Angot, E., *et al.* (2011) " α -Synuclein propagates from mouse brain to grafted dopaminergic neurons and seeds aggregation in cultured human cells." *The Journal of clinical investigation* 121(2):715-725.

Hausmann, R., *et al.* (2000) "Immunohistochemical investigations on the course of astroglial GFAP expression following human brain injury." *International Journal of Legal Medicine*, 113:70-75.

Hawkes, C. H., Del Tredici, K., Braak, H. (2007) "Parkinson's disease: a dual-hit hypothesis." *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 33:599–614.

Hefti, F., Melamed, E., *et al.* (1980) "Circling behavior in rats with partial, unilateral nigrostriatal lesions: effect of amphetamine, apomorphine, and DOPA." *Pharmacol Biochem Behav*, 12(2):185-8.

Heikkila, R. E., Cabbat, F. S., *et al.* (1984) "Effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine on neostriatal dopamine in mice." *Neuropharmacology*, 23(6):711-713.

Hudson, J. L., van Horne, C. G., *et al.* (1993) "Correlation of apomorphine- and amphetamine-induced turning with nigrostriatal dopamine content in unilateral 6-hydroxydopamine lesioned rats." *Brain Res*, 626(1-2):167-74.

INE – *Projeções de população residente em Portugal – 2000-2050*. Lisboa, Instituto Nacional de Estatística, 2004.

INE – *Projeções de população residente em Portugal – 2008-2060*. Lisboa, Instituto Nacional de Estatística, 2009.

INE – *Dia Internacional do Idoso – 1 de Outubro de 2007*. Lisboa, Instituto Nacional de Estatística, 2007.

Jang, J., Jang, M., *et al.* (2011) "Regulation of dopaminergic neuron firing by heterogeneous dopamine autoreceptors in the substantia nigra pars compacta." *Journal of neurochemistry* 116(6):966-974.

Kapp, W. (1992) "The history of drugs for the treatment of Parkinson's Disease." *J. Neural Transm. Suppl.*, 38:1-6.

Klein, C., Lohmann—Hedrich, K. (2007) "Impact of recent genetic findings in Parkinson's disease." *Curr. Opin. Neurol.* 20(4):453-64.

Kruger, R. Kuhn, W., Muller, T., *et al.* (1998) "Ala30Pro mutation in the gene encoding α -synuclein in Parkinson's disease." *Nature Genetics*, vol.18, no.2, pp.106–108.

Kuczenski, R. and Segal, D. S. (1997) "Effects of methylphenidate on extracellular dopamine, serotonin, and norepinephrine: comparison with amphetamine." *J. Neurochem* 68(5):2032-7.

Langston, J. W., Ballard, P., Tetrud, J. W. and Irwin, I. (1984) "Chronic parkinsonism in humans due to a product of meperine-analog synthesis." *Science*, vol.219, no.4587, pp.979-980.

Lavedan, C. (1998) "The synuclein family." *Genome research*, 8(9), pp.871-80.

Lee, H. J., Patel, S., Lee, S. J. (2005) "Intravesicular localization and exocytosis of alpha-synuclein and its aggregates." *J. Neurosci.*, 25:6016–24.

Lee, S. J. (2008) "Origins and effects of extracellular alpha-synuclein: implications in Parkinson's disease." *J. Mol. Neurosci.*, 34:17–22.

Leroy, E. *et al.* (1998) "The ubiquitin pathway in Parkinson's disease." *Nature*, 395(6701), pp.451-2.

Lev, N., Melamed, E., *et al.* (2003) "Apoptosis and Parkinson's disease." *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 27(2):245-250.

Levy, A. & Ferreira, J. (Coord.) – *Doença de Parkinson – Manual Prático*. Lisboa: Lidel, 2003.

Lo Bianco, C., *et al.* (2002) "Alpha-synucleinopathy and selective dopaminergic neuron loss in a rat lentiviral-based model of Parkinson's disease." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99(16):10813-8.

Maroteaux, L. & Scheller, R.H. (1991) "The rat brain synucleins; family of proteins transiently associated with neuronal membrane." *Brain research. Molecular brain research*, 11(3-4), pp.335-43.

Maroteaux, X. L., Campanelli J. T., Scheller R. H. (1998) "Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal." *J. Neuroscience*, 8:2804-2815.

Marsden, C. D. and Obeso, J. A. (1994) "The functions of the basal ganglia and the paradox of stereotaxic surgery in Parkinson's disease." *Brain* 117(Pt 4):877-97.

Maslah, E., Rockenstein, E., Veinbergs I., *et al.* (2000) "Dopaminergic loss and inclusion body formation in α -synuclein mice: Implications for neurodegenerative disorders," *Science*, vol.287, no.5456, pp.1265–1269.

Mazzulli, J. R., *et al.* (2006) "Cytosolic catechols inhibit α -synuclein aggregation and facilitate the formation of intracellular soluble oligomeric intermediates." *J. Neurosci.*, 26:10068–10078.

Missale, C., Nash, R. S., Robinson, S. W., Jaber, M., Caron, M. G. (1998) "Dopamine Receptors: From Structure to Function." *Physiological Reviews*, vol.78, no.1.

Mukaetova-Ladinska, E. B., Hurt, J., Jakes, R., Xuereb, J., Honer, W. G., Wischik, C. M. (2000) "Alpha-synuclein inclusions in Alzheimer and Lewy body diseases." *J. Neuropath. Experim. Neurology*, 59:408-17.

Nicklas, W. J., Vyas, I., Heikkila, R. E. (1985) "Inhibition of NADH-linked oxidation in brain mitochondria by 4-methyl-4phenylpyridine, a metabolite of the neurotoxin, 1-methyl-4phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine." *Life Science*, vol.36, pp.2503-2508.

Nicola, S. M., Surmeier, D. T., *et al.* (2000) "Dopaminergic modulation of neuronal excitability in the striatum and nucleus accumbens." *Annual Review of Neuroscience*, 23:185-215.

Nóbrega, C., *et al.* (2013) "Silencing mutant ataxin-3 rescues motor deficits and neuropathology in machado-joseph disease transgenic mice". *PLoS One*, 8(1):e52396.

Obeso, J. A., Rodriguez-Oroz, M. C., Goetz, C. G., *et al.* (2010) "Missing pieces in the Parkinson's disease puzzle." *Nature Medicine*, 16:653-659.

Okun, M. S.; Fernandez, H. H.; Grosset, D. G.; Grosset, K. A. – *Parkinson's Disease – Clinician's desk reference*. London: Manson Publishing Ltd, 2009.

Pahwa, R. & Lyons, K. E. – *Handbook of Parkinson's Disease 4th Edition*. Informa Healthcare USA, 2007.

Parent, A. & Hazrati, L. N. (1995) "Functional-anatomy of the basal ganglia. The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop." *Brain Research* 20(1):91-127.

Parkinson, J. – *An Essay on the Shaking Palsy*. Whittingham and Roculand, London, 1817.

Perfeito, R. e Rego, A. C. (2011) "Papel da alfa-sinucleína e da disfunção mitocondrial associada à doença de Parkinson." *Rev. Neurocienc.*

Polymeropoulos, M. H., Higgins, J. J., Golbe, L. T., *et al.* (1996) "Mapping of a gene for Parkinson's disease to chromosome 4q21-q23." *Science*, 274(5290):1197-9.

Przedborsky, S., Levivier, M., Jiang, H., *et al.* (1995) "Dose-dependent lesions of the dopaminergic nigrostriatal pathway induced by intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine." *Neuroscience*, vol.67, no.3, pp.631-647.

Redgrave, P., Gurney, K., *et al.* (2008) "What is reinforced by phasic dopamine signals?" *Brain Research Reviews* 58(2): 322-39.

Ropper, A. H.; Brown, R.H. – *Adams and Victor's Principles of Neurology 8th Edition*. New York: McGraw-Hill, 2005.

Salum, C. (2008) "Papel funcional da interação dopamina e óxido nítrico no sistema nervoso central." INeC – Instituto de Neurociências e Comportamento.

Seo, J. H., *et al.* (2002) "Alpha-synuclein regulates neuronal survival via Bcl-2 family expression and PI3/Akt kinase pathway." *FASEB journal*, 16(13), pp.1826-8.

Siegel, G., Albers, R. W., *et al.* (2006) "Basic Neurochemistry." London, Elsevier.

Singh, N., Pillay, V., *et al.* (2007) "Advances in the treatment of Parkinson's disease." *Progress in Neurobiology* 81(1): 29-44.

Smith, K. (2010) "Treatment frontiers." *Nature*, 466:S15-S18.

Stefanis, L. (2012) " α -Synuclein in Parkinson's Disease." Cold Spring Harbor perspectives in medicine 4:a009399.

Storch, A., Ludolph, A. C., Schwarz, J. (2004) "Dopamine transporter: involvement in selective dopaminergic neurotoxicity and degeneration." J Neural Transm., vol.111, n.10-11, p.1267-1286.

Takahashi, H., Wakabayashi, K. (2001) "The cellular pathology of Parkinson's disease." Neuropathology: official journal of the Japanese Society of Neuropathology, 21(4), pp.315-22.

Tanner, C. M., *et al.* (1999) "Parkinson's Disease in Twins – An Etiologic Study." JAMA, 281(4):341-346.

Tsai, C. H., Lo, S. K., See, L. C., Chen, H. Z., Chen, R. S., Weng, Y. H., *et al.* (2002) "Environmental risk factors of young onset Parkinson's disease: a case-control study." Clin Neurol Neurosurg, 104(4):328-33.

Thomas, B. & Beal, M. F. (2007) "Parkinson's disease. Human molecular genetics." 16 Spec No(R2), pp.R183-94.

Tsika, E., Moysidou, M., Guo, J., *et al.* (2010) "Distinct region-specific α -synuclein oligomers in A53T transgenic mice: Implications for neurodegeneration." J. Neurosci., 30:3409–3418.

Ungerstedt, U. (1968) "6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central mono-amine neurons." Eur. J. Pharmacol. 5, 107–110.

Ungerstedt, U. (1971) "Post-synaptic supersensitivity after 6-hydroxydopamine induced degeneration of the nigro-striatal dopamine system." Acta Physiol Scand Suppl, 367:69-93.

Van Den Eeden S. K.; Tanner C. M.; Berstein A. L.; *et al.* (2003) "Incidence of Parkinson's disease: variation by age, gender, and race/ethnicity." Am. J. Epidemiol., 157:1017-1022.

Valente, E. M. *et al.* (2004) "Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1." Science (New York, N.Y.), 304(5674), pp.1158-60.

Vallone D., Picetti R., Borrelli E. (2000) "Structure and function of dopamine receptors." Neuroscience and Biobehavioral, vol.24, 125-132.

Vonsattel, J. P., Myers R. H., *et al.* (1985) "Neuropathological classification of Huntington's disease." *J Neuropathol Exp Neurol*, 44(6):559-77.

WHO – *Neurology Atlas*. Geneva, World Health Organization; London, World Federation of Neurology, 2004.

WHO – *Neurological disorders: public health challenges*. Geneva, World Health Organization, 2006.

WHO – *Global Brief for World Health Day*. Geneva, World Health Organization, 2012.

Williams, R. (2010) "Slowing the decline." *Nature*, 466:S13-S14.

Yanagisawa, N. (2006) "Natural history of Parkinson's disease: from dopamine to multiple system involvement." *Parkinsonism & Related Disorders*, 12:S40-S46.

Yasuda, T., Nakata, Y., *et al.* (2012) " α -Synuclein and Neuronal Cell Death." *Molecular neurobiology*.

Zimprich, A., *et al.* (2004) "Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology." *Neuron*, 44(4), pp.601-7.