Daniel Carneiro Carrettiero

SISTEMAS NEUROMODULATÓRIOS:
IMPLICAÇÕES FISIOPATOLÓGICAS

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de São
Paulo, para a obtenção de Título de
Doutor em Ciências, na Área de
Fisiologia.

Orientadora: Débora Rejane Fior-Chadi

São Paulo

2008

Agradecimentos

Agradeço, primeiramente, à professora Dra. Débora Rejane Fior-Chadi, minha orientadora, por acreditar em meu potencial como pesquisador e por possibilitar que esta fase de minha vida fosse rica em experiências científicas. A liberdade de idéias novas tanto conceituais como experimentais proporcionadas por ela foram indispensáveis para o resultado final deste trabalho.

Aos meus atuais e antigos amigos de laboratório, Andreas, Daniel, Emerson, Merari, Renato, Regiane e Sérgio Macedo pelas valiosas discussões científicas e pelos bons momentos que passamos juntos ao longo dessa jornada. Em especial ao Renato por ter ensinado e acompanhado meus primeiros passos no laboratório. Aos novos amigos de laboratório Karen, Sérgio Marinho, João Paulo, Beatriz e Paulinho pela companhia, amizade e diversão.

Aos colegas, professores, funcionários e alunos do Departamento de fisiologia do instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Kenneth S. Kosik o qual me orientou, direcionou e ensinou no campo científico das doenças neurodegenerativas quando participei, durante um ano, do programa de Doutorado sanduíche na universidade da Califórnia – Santa Barbara.

Aos amigos e colegas de laboratório no exterior, Fernando, Ifan, Kawther, Min, Na, Onur, Shoichi, Sourave, Snigdha, Thales, Tsungling. Em especial ao Fernando por ter me ajudado e acompanhado na fase inicial de adaptação no exterior, por ter me ensinado as técnicas básicas de Biologia Molecular, pelos bons momentos que passamos juntos e pela amizade sincera durante todo o período. Ao Thales pelas idéias, discussões científicas e pela verdadeira amizade no período final. À Snigdha pelo apoio técnico nas culturas de hipocampo (à Min também), auxílio nos western blot e pela amizade. À Kawther pela sinceridade e amizade. Ao Shoichi pelas discussões científicas “mudas”... Ao Sourave pelo auxílio na imunohistoquímica e pela amizade.

Às agências CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), FAPESP (fundação de amparo à pesquisa do estado de São Paulo), e CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo suporte financeiro, os quais possibilitaram a realização deste trabalho. Em especial à CAPES por ter me financiado aqui no Brasil e no exterior.

Muito Obrigado!

"Experiência não é o que aconteceu com você; mas o que você fez com o que lhe aconteceu "

(Aldous Huxley)

“Like everything else, it will develop in the future as a consequence of its own contradictions”

(Richard Levins e Richard Lewontin, 1985)

Dedico este trabalho aos meus pais Heloiza e Rolando, a minha irmã Luciana e a minha querida esposa, mulher, amiga e eterna namorada Carolina.

Aos meus pais por terem contribuído de forma incondicional pela formação de minha personalidade como ser humano. Sem eles este trabalho seria apenas paginas em branco.

À minha irmã pela amizade e companherismo.

À minha esposa pelo carinho e estímulo constante em todas as etapas de minha vida. Obrigado muitíssimo pela ajuda na revisão final deste trabalho.

Índice

RESUMO GERAL	IV
CAPÍTULO I	1
<i>Introdução Geral</i>	1
<i>Objetivo Geral</i>	7
CAPÍTULO II	8
<i>Introdução: Hipertensão e adenosina</i>	8
ALTERAÇÃO NA DISTRIBUIÇÃO E NA DENSIDADE DOS RECEPTORES A1 DE ADENOSINA NO NÚCLEO DO TRATO SOLITÁRIO DE RATOS NORMOTENSOS E HIPERTENSOS.	13
Resumo	13
Abstract	14
Introdução	14
Materiais e Métodos	17
Resultados	20
Discussão	26
ADENOSINA MODULA OS RECEPTORES ALFA2-ADRENÉRGICOS DENTRO DO NÚCLEO DO TRATO SOLITÁRIO DE RATOS HIPERTENSOS E NORMOTENSOS.	33
Resumo	33
Abstract	34
Introdução	34
Materiais e Métodos	37
Resultados	43
Discussão	49
ADENOSINA MODULA OS RECEPTORES ALFA2-ADRENÉRGICOS ATRAVÉS DA FOSFOLIPASE C. UM ESTUDO EM CULTURA DE CÉLULAS DO TRONCO ENCEFÁLICO DE RATOS.	56
Resumo	56
Abstract	57
Introdução	57
Materiais e Métodos	61
Resultados	65
Discussão	67
CAPÍTULO III	72
<i>Introdução: Alzheimer e BAG-2</i>	72
TRIAGEM DA PROTEÍNA TAU PELA CO-CHAPERONA BAG-2 SOBRE OS MICROTÚBULOS PREVINE FORMAÇÃO DE AGREGADOS FILAMENTOSOS.	77
Resumo	77
Abstract	78
Introdução	78
Materiais e Métodos	82
Resultados e discussão	90
Conclusões	104
CAPÍTULO IV	107
<i>Considerações e Conclusões Finais</i>	107
BIBLIOGRAFIA GERAL	113

RESUMO GERAL

Esta tese está organizada basicamente em quatro capítulos. O Capítulo I aborda as linhas gerais do presente trabalho, onde o sistema nervoso é caracterizado por um mosaico de redes neurais altamente organizadas, as quais promovem o controle e a manutenção das atividades vitais do corpo humano. Redes neurais geneticamente enfraquecidas podem predispor os indivíduos a desenvolver diversas patologias. Moléculas neuromodulatórias podem atuar fortalecendo estas redes, colaborando com o controle destas doenças. O objetivo geral deste trabalho é estudar a ação de duas moléculas neuromodulatórias endógenas, a adenosina e a co-chaperona BAG-2, sobre redes neurais específicas associadas à hipertensão essencial e à doença de Alzheimer, contribuindo, assim, para o melhor entendimento, controle e prevenção destas patologias.

O Capítulo II analisa os possíveis efeitos da adenosina sobre o controle neural da pressão arterial associado à patologia da hipertensão essencial, especificamente no núcleo do trato solitário (NTS) de ratos normotensos (WKY) e espontaneamente hipertensos (SHR). O primeiro artigo científico do presente trabalho (Capítulo II) demonstra que os receptores A1 de adenosina, além de estarem distribuídos de forma heterogênea dentro do NTS estão aumentados em ratos hipertensos quando comparados a ratos normotensos. Esta diferença parece preceder o desenvolvimento da hipertensão nestes animais. O segundo artigo científico (Capítulo II) descreve que os receptores A1 de adenosina são capazes de aumentar tanto o número como a afinidade dos receptores alfa₂-adrenérgicos dentro de núcleos específicos do NTS. Esta ação modulatória é diferenciada em ratos hipertensos quando comparados a ratos normotensos, sugerindo uma importante alteração associada à hipertensão nestes animais. No terceiro artigo científico (Capítulo II) foi observado que a ação modulatória desencadeada pelos receptores A1 de adenosina sobre os receptores alfa₂-adrenérgicos é dependente de fosfolipase C (PLC) e parece, também, ser diferenciada em ratos hipertensos quando comparados a ratos normotensos.

Neste contexto, os resultados destes três trabalhos sugerem que a ativação dos receptores A1 de adenosina, em certas condições, poderia estar sensibilizando sistemas hipotensores dentro de subnúcleos específicos do NTS através dos receptores alfa₂-

adrenérgicos utilizando fosfolipase C como mensageiro intracelular. Este mecanismo poderia estar associado ao desenvolvimento da hipertensão essencial.

O Capítulo III analisa os possíveis efeitos da co-chaperona BAG-2 sobre a proteína Tau. Agregados desta proteína são uma das características histopatológicas marcantes encontradas no encéfalo de pacientes com mal de Alzheimer. Foi demonstrado no presente trabalho um elegante mecanismo de degradação da proteína Tau fosforilada, uma isoforma considerada tóxica para o ambiente intracelular, através da co-chaperona BAG-2. Esta molécula tem a capacidade de inibir a atividade da chaperona CHIP, uma ligase de ubiquitina, impossibilitando a ubiquitinação e conseqüente degradação da proteína Tau pela via proteossomo ubiquitina-dependente. Foi observado que a proteína BAG-2 se associa fisicamente à proteína Tau, alterando a via de degradação ubiquitina-dependente para uma via não muito usual, ubiquitina-independente. A supressão da proteína BAG-2 leva a um aumento nos níveis de Tau em neurônios e sua superexpressão, uma diminuição. Foi observado, também, que a supressão da proteína BAG-2 pode levar a formação de agregados filamentosos, sugerindo que o efeito modulatório da proteína BAG-2 poderia estar relacionado com a remoção dos agregados intracelulares encontrados em pacientes com a doença de Alzheimer. Concluindo, BAG-2 poderia ser um importante alvo farmacológico para o tratamento desta patologia.

Por fim, o capítulo IV encerra o presente trabalho com considerações finais importantes para o estudo, prevenção e controle de patologias multifatoriais como a hipertensão essencial e a doença de Alzheimer. Este estudo sugere que a adenosina e a co-chaperona BAG-2 poderiam ser alvos farmacológicos interessantes, que em conjunto com outras substâncias, poderiam colaborar com o fortalecimento de redes neurais geneticamente enfraquecidas as quais predisõem os indivíduos a desenvolver tais patologias.

CAPÍTULO I

Introdução Geral

Classicamente o neurônio é considerado como a unidade funcional fundamental do sistema nervoso. São estes que produzem e veiculam sinais elétricos capazes de codificar todas as informações do ambiente externo e interno. O que diferencia os neurônios das demais células do organismo animal é a sua morfologia adaptada para o processamento e transmissão da informação. A região de contato entre um neurônio e um segundo neurônio chama-se sinapse, e constitui uma região especializada fundamental para o processamento da informação no sistema nervoso. Na sinapse, os sinais elétricos são, na sua grande maioria, transformados em sinais químicos através da liberação dos neurotransmissores. Estes, por sua vez atuam em receptores específicos localizados na membrana pós-sináptica transformando a informação novamente em sinal elétrico. No entanto, esta transferência de informação nem sempre, ou melhor, quase nunca, passa sem se alterar: pode ser bloqueada parcialmente ou completamente ou então multiplicada. Isso significa que a sinapse é um local estratégico no sistema nervoso onde a informação não é apenas transferida, mas sim processada, transformada e integrada (Lent, 2001; Purves *et al.*, 1996a).

Sendo unidades funcionais do sistema nervoso, os neurônios operam em conjunto, e não isoladamente. Estes neurônios associados formam os chamados circuitos ou redes neurais, os quais são os responsáveis pelo correto funcionamento de nossas atividades diárias. Por exemplo, as células da retina, que captam as imagens do ambiente, só se tornam capazes de propiciar a visão se transmitirem os sinais elétricos, gerados em resposta à luz, a outros neurônios que ao final chegam a regiões específicas do cérebro, especificamente no córtex occipital (Purves *et al.*, 1996b). Assim, cada

neurônio realiza uma pequena parte do trabalho cooperativo que ao final nos possibilita observar o mundo a nosso redor. Esta rede neural está, portanto, associada à visão. Além desta, existem muitas outras redes neurais responsáveis por tarefas específicas como, por exemplo, a auditiva, a dos sentidos químicos (olfatória, gustatória e outros sistemas de detecção química), a somestésica (tato, propriocepção, termosensibilidade e dor), a responsável pela motricidade corporal, memória, linguagem, respiração, controle da pressão arterial além de muitas outras. Estas redes neurais podem ainda ser subdivididas em muitas subseções sugerindo a alta complexidade fisiológica que origina e controla nossas atividades diárias (Lent, 2001; Purves *et al.*, 1996b).

Cada movimento, cada pensamento, cada observação realizada por nós, implica na ativação de um grande número de redes neurais. Assim, o sistema nervoso funciona como um mosaico de redes neurais localizados em regiões específicas, cada uma responsável por realizar uma determinada função. Isso não significa que estas redes neurais operam isoladamente. Muito pelo contrário, o grau de interação entre elas é altíssimo, possibilitando, assim, a extrema coordenação de nossas atividades diárias como, por exemplo, abotoar uma camisa, conversar e se olhar no espelho; tarefas corriqueiras realizadas em conjunto no nosso dia-a-dia.

Estas redes neurais se transformam do nascimento embrionário ao envelhecimento e morte do indivíduo. O desenvolvimento neural segue uma seqüência de etapas que levam à gradativa especialização dos neurônios juvenis, à sua agregação e à formação das redes neurais maduras interconectadas. Após terem se desenvolvido em termos estruturais e funcionais, envelhecem e morrem. As causas desse envelhecimento ainda não foram esclarecidas pela ciência, havendo somente hipóteses sem comprovação experimental. Acredita-se que exista uma determinação genética neste processo, pois o tempo de vida de um indivíduo depende da espécie a qual pertence

(Lent, 2001; Oppenheim, 1999; Raper & Tessier-Lavigne, 1999). Por exemplo, um ser humano vive aproximadamente 75 anos enquanto uma tartaruga pode chegar até 200 anos.

A observação destas redes neurais envelhecidas, isto é, no encéfalo de um idoso, apresentam claras diferenças morfológicas quando comparadas a de um encéfalo adulto ou jovem: tamanho menor, giros mais finos e separados por sulcos mais abertos e profundos sugerindo, assim, perda de massa (Lent, 2001; Oppenheim, 1999). Estas alterações interferem diretamente na funcionalidade das redes neurais e consequentemente nas atividades diárias do indivíduo. Quando observado ao microscópio, o encéfalo dos idosos apresenta depósitos de materiais densos no espaço extracelular os quais são denominados “placas senis”. Além disso, apresentam no citoplasma, enovelados fibrilares de proteínas específicas (Goedert & Crowther, 1989). O número de neurônios e sinapses é extremamente reduzido e análises bioquímicas revelam queda acentuada de proteínas cerebrais, especialmente as associadas a enzimas de síntese e degradação de neurotransmissores (Dickstein *et al.*, 2007).

Estas alterações tendem a se acentuar com o avanço da idade, mas variam muito de indivíduo para indivíduo. Muitas vezes, quando pronunciadas, originando sintomas físicos e psicológicos como, por exemplo, perda gradual da visão, audição e/ou memória, desregulação da pressão arterial e/ou da motricidade, entre muitos outros. Estas alterações são, portanto, diretamente relacionados à deterioração de redes neurais específicas responsáveis pelas tarefas diárias de nosso organismo. O mal de Alzheimer ou a doença de Parkinson são bons exemplos de patologias associadas à deterioração de redes neurais específicas responsáveis pela memória e motricidade, respectivamente. O sinal patológico mais notável nestas doenças é a degeneração de neurônios colinérgicos

e dopaminérgicos localizados em áreas específicas do encéfalo humano (Elbaz *et al.*, 2007). A ciência, no entanto, ainda desconhece as razões exatas deste processo.

Embora estas patologias sejam, na sua grande maioria, associadas ao envelhecimento, muitas vezes, podem ocorrer em fases precoces do desenvolvimento (Elbaz *et al.*, 2007). A hipertensão essencial é outra patologia que se enquadra nesta categoria. Neste sentido, muitos cientistas procuram encontrar causas específicas para estas patologias como, por exemplo, polimorfismos. Creio que é natural encarmos as patologias como consequência de um defeito genético, no entanto, diversas doenças são resultantes de múltiplos fatores: genéticos e não genéticos (ambientais). Podemos, portanto, pensar nestas patologias como um contínuo, com distúrbios, tais como a fibrose cística, situados em uma extremidade (fortemente influenciado por genes), e condições, tais como sarampo, situados na outra extremidade. Muitas patologias comuns, tais como o mal de Alzheimer, a hipertensão, doenças cardíacas, diabetes e câncer, ficam mais ou menos no meio deste contínuo. Estas doenças são, portanto, o produto de graus variáveis de influências genéticas e ambientais, são as chamadas doenças multifatoriais (Lynn *et al.*, 1885).

Voltando ao tema das redes neurais, vamos considerar que o funcionamento correto destas depende exclusivamente dos componentes celulares e bioquímicos envolvidos, os quais, em última instância, são o reflexo da expressão gênica. Uma afirmação um tanto contraditória, pois parece que estamos desconsiderando o fator ambiental. Muito pelo contrário, o que estamos afirmando é que a variabilidade genética humana origina redes neurais altamente fortalecidas devido a seus excelentes componentes celulares e moleculares que favorecem o seu correto funcionamento. No entanto, muitas vezes, a variabilidade genética origina redes neurais enfraquecidas, as quais não necessariamente resultam na patologia em si, mas podem predispor o

indivíduo a uma maior sensibilidade aos fatores ambientais. Um exemplo bem interessante e simples para entendermos este conceito é um caso dentro da área odontológica. Indivíduos pertencentes à mesma cultura, com hábitos, dieta e higiene bucal similares, com visitas regulares ao dentista podem ser divididos basicamente em dois grupos: um com alto índice de formação de cáries e outro com baixo índice (Deeley *et al.*, 2008). Este caso sugere um sistema dentário altamente fortalecido em um grupo de indivíduos e um sistema enfraquecido no outro grupo. O sistema dentário enfraquecido não resulta na cárie em si, mas predispõe o indivíduo a uma maior sensibilidade a fatores ambientais como, por exemplo, a ingestão de alimentos com alto teor de açúcar. Estas pessoas tendem a ter características específicas que aumentam a susceptibilidade ao desenvolvimento de cáries como, por exemplo, superfície dentária áspera e irregular, dentina e esmalte enfraquecidos (Deeley *et al.*, 2008), cavidades grandes entre os dentes, presença de bactérias específicas (Corby *et al.*, 2007), composição salivar característica (Jonasson *et al.*, 2007) além de muitas outras não listadas e não conhecidas. No conjunto ou separadas, estas características aumentam a probabilidade de acúmulo de material orgânico e/ou de adesão bacteriológica, que ao final levam à formação destas ulcerações dentárias.

Podemos notar, portanto, que um número relativamente grande de genes pode estar relacionado ao enfraquecimento do sistema, seja ele qual for, levando a uma maior susceptibilidade do indivíduo a variações ambientais que muitas vezes culminam em patologias específicas. Este exemplo pode ser aplicado também a patologias como Alzheimer ou hipertensão essencial. São estas as chamadas doenças multifatoriais. O enfraquecimento das redes neurais associadas ao controle da pressão arterial e à memória episódica pode estar relacionado ao desenvolvimento destas patologias.

Após ter uma visão geral de como a variabilidade genética nas redes neurais pode aumentar a susceptibilidade do indivíduo a desenvolver diversas patologias vamos voltar nossa atenção para os possíveis mecanismos de fortalecimento destas redes neurais. A ciência tenta identificar componentes dentro destes sistemas que possam fortalecê-los. O que seria interessante se considerarmos a saúde humana.

Em nosso organismo existem substâncias endógenas que participam do controle de diversos mecanismos fisiológicos. Estas moléculas são chamadas de moduladoras endógenas. Elas não participam como indutoras dos processos intracelulares, mas sim como reguladores. Atuam na plasticidade dos sistemas celulares, alterando os mecanismos já existentes. O estudo destas moléculas pode ser extremamente importante para o fortalecimento das redes neurais que ao final possibilitam o melhor entendimento, controle e prevenção de patologias específicas.

Objetivo Geral

Neste contexto, o objetivo geral do presente trabalho será estudar a ação de moléculas neuromodulatórias endógenas específicas sobre redes neurais associadas a patologias.

Para isso, escolhemos duas moléculas com possíveis efeitos sobre duas redes neurais associadas a patologias distintas:

- 1) A molécula adenosina e seu possível efeito sobre a rede neural responsável pelo controle neural da pressão arterial associada à patologia da hipertensão essencial (Capítulo II – 3 artigos científicos).
- 2) A molécula BAG-2 e seu possível efeito sobre a rede neural associada à patologia de Alzheimer (Capítulo III – 1 artigo científico).

CAPÍTULO II

Introdução: Hipertensão e adenosina

Hipertensão, uma elevação crônica da pressão arterial, afeta aproximadamente 20 a 35% da população adulta em áreas industrializadas (Staessen *et al.*, 2003). É considerada o maior fator de risco para as doenças cardiovasculares incluindo as doenças cardíacas, derrames e doenças renais. Devido a sua etiologia desconhecida, na grande maioria dos casos, estes pacientes são classificados como tendo “hipertensão essencial”(Bahr *et al.*, 2003).

Estudos de correlação da pressão sanguínea dentro de famílias indicam que a herdabilidade é de aproximadamente 20% a 40%. Esta porcentagem aumenta para 60% em estudos com gêmeos (Staessen *et al.*, 2003). Estes resultados, substancialmente menores que 100%, sugerem que o fator ambiental seja uma importante causa para a variação na pressão arterial. Os fatores ambientais mais importantes para o desenvolvimento da hipertensão são: aumento na ingestão de sódio, álcool e café, diminuição da atividade física, fumo, estresse psicossocial e obesidade (Chalmers *et al.*, 1999).

Hipertensão essencial é provavelmente uma patologia poligênica que resulta da herdabilidade de um grande número de genes susceptíveis e envolve múltiplos fatores ambientais determinantes. Estes determinantes complicam o estudo das variações da pressão arterial na população (Ruppert & Maisch, 2003). Para alguns, esta patologia é conhecida como neurogênica e está associada, na sua grande maioria, à alteração nas redes neurais responsáveis pelo controle da pressão arterial levando a um aumento crônico no tônus simpático (Esler *et al.*, 1977; Julius, 1996). Para outros, tem uma

origem sistêmica (Schedl, 2007). Embora um avanço considerável tenha sido feito nesta área de pesquisa, as causas específicas que levam ao aparecimento da hipertensão essencial ainda permanecem inconclusivas e incompletas.

A regulação da pressão sanguínea é um processo altamente complexo, influenciado por muitos sistemas fisiológicos. Eles incluem vários aspectos do funcionamento renal, do transporte celular de íons, do funcionamento cardíaco e circulatório e de redes neurais relacionadas ao controle da pressão arterial. Neste trabalho, vamos considerar somente a parte neural.

Um aumento no tônus simpático tem sido considerado importante para o desenvolvimento da hipertensão essencial em humanos (Esler *et al.*, 1977; Julius, 1996) e em ratos espontaneamente hipertensos (SHR), um modelo animal usado para investigar os mecanismos fisiopatológicos primários associados à hipertensão (DeQuattro & Lee, 1991; Okamoto & Aoki, 1963). Foi demonstrado que a retirada da eferência simpática previne o desenvolvimento da hipertensão em ratos SHR (Lee *et al.*, 1987; Tipton *et al.*, 1984) sugerindo a origem neurogênica da hipertensão essencial. No entanto, a causa deste aumento na atividade simpática ainda é desconhecida.

Basicamente a pressão arterial (PA) é o resultado da resistência vascular e do débito cardíaco ($PA = \text{resistência periférica} \times \text{débito cardíaco}$), duas variáveis que estão sob o controle do sistema nervoso autônomo (SNA) (Guyenet, 2006). O controle neural da pressão arterial é um mecanismo altamente complexo envolvendo diversos centros encefálicos. Entre eles, os mais importantes são o núcleo do trato solitário (NTS), a medula ventrolateral caudal e rostral (CVLM / RVLM), a medula espinal e o hipotálamo (Guyenet, 2006). A figura 1 mostra resumidamente a relação entre estes núcleos. Neste trabalho, vamos estudar especificamente possíveis alterações no NTS, as

quais podem contribuir para o aparecimento e desenvolvimento da hipertensão essencial (Reis, 1981).

Figura 1. Circuito neural que regula o tônus simpático basal. Os principais núcleos envolvidos no controle neural da pressão arterial são o núcleo do trato solitário (NTS), medula ventrolateral caudal e rostral (CVLM e RVLM), medula espinal e hipotálamo. Sistemas límbicos e corticais não estão representados. A rede neural que controla a pressão arterial é regulada por aferências sensoriais que se projetam para o NTS através dos mecanorreceptores cardiopulmonares (barorreceptores), sensores de CO_2 , O_2 e outros íons (quimiorreceptores), ativação muscular/dor (nociceptores) e ativação hipotalâmica. Pode ainda ser regulada por projeções diretas para a medula espinal através de informações de distensão muscular, hipóxia e diversos metabólitos. Substâncias circulantes como sódio, angiotensina II, citocinas e outras moléculas podem também interferir no sistema. Outros núcleos como a área postrema (AP) e o órgão subfornical (OSF) têm papel importante para a regulação da pressão arterial. Numerosos fatores podem levar a um aumento da pressão arterial como, por exemplo, dor e exercício, redução da estimulação dos mecanorreceptores cardiopulmonares e ativação de sistemas inibitórios (GABA, Vasopresina, Adenosina) dentro do NTS. O Barorreflexo (representado em vermelho) é responsável pelo controle momento-a-momento da pressão arterial. Na^+ , sódio; Ang II, angiotensina II; NPGS, neurônios pré-ganglionares simpáticos; NGS, neurônios pós-ganglionares simpáticos. Modificada de Patrice G. Guyenet (2006) Nature Reviews, maio, volume 7, pg. 335-346.

O NTS, localizado na porção dorsal do bulbo, é um importante centro integrador das informações cardiovasculares (Reis *et al.*, 1984; van Giersbergen *et al.*, 1992). Este núcleo recebe aferências primárias dos baro e quimiorreceptores localizados no arco aórtico e no seio carotídeo (representados no esquema da figura 1 por mecanorreceptores cardiopulmonares, CO_2 e O_2) possibilitando ajustes homeostáticos instantâneos nos níveis de pressão e acidez arterial, respectivamente. Do NTS partem

projeções para a medula ventrolateral caudal (CVLM), área da formação reticular também localizada no bulbo, que por sua vez projeta-se inibindo os neurônios da porção rostral da medula ventrolateral (RVLM) (Dampney, 1994). Os neurônios deste núcleo são importantíssimos para o controle da pressão arterial, pois se auto-disparam originando o tônus simpático basal. A RVLM modula diretamente os neurônios pré-ganglionares simpáticos (NPGS) da coluna intermediolateral da medula espinal de acordo com os ajustes homeostáticos necessários (Amendt *et al.*, 1979; Blessing *et al.*, 1981; Dampney, 1981; Dampney *et al.*, 1982). Ao final, este sistema acaba por modular a atividade cardíaca, da adrenal e das arteríolas. Este controle, momento-a-momento da pressão arterial, é chamado de barorreflexo, o qual é importante para a manutenção de nossas atividades diárias (representado em vermelho no esquema da figura 1). Note que o controle neural da pressão arterial é influenciado por diversos parâmetros como ativação muscular (receptores musculares), dor (nociceptores), inflamação (citocinas), presença de sódio (Na^+), angiotensina (Ang II) e outras substâncias.

O NTS apresenta grande diversidade de neurotransmissores e receptores. Neste núcleo podem ser encontrados mais de 30 diferentes tipos de neurotransmissores (Palkovits, 1985) os quais podem interagir entre si (Fior & Fuxe, 1995; Fior *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 1994) aumentando ainda mais a complexidade neuroquímica das ações por eles mediadas.

O nucleosídeo adenosina faz parte de um grupo de substâncias que agem como moduladoras endógenas, isto é, alteram a resposta celular a uma dada substância, possibilitando a regulação da atividade fisiológica em muitos órgãos, tecidos e células (Daly, 1982; Williams, 1989). Atualmente, esta substância está sendo extensivamente pesquisada para fins terapêuticos, especificamente os relacionados ao controle cardiovascular (Burnstock, 2007; Gao & Jacobson, 2007). Foi observada uma alta

densidade de sítios de recaptação de adenosina dentro do NTS (Bisserbe *et al.*, 1985), sugerindo um papel importante deste nucleosídeo neste núcleo. A ação da adenosina é mediada por receptores específicos acoplados à proteína G presentes na membrana celular (Londos *et al.*, 1980), os quais são conhecidos por serem alvos da cafeína e da teofilina (Borbely & Tobler, 1989). Quatro tipos de receptores para adenosina são conhecidos, clonados e farmacologicamente caracterizados: A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃ (Fredholm *et al.*, 1994).

A ativação de seus receptores influencia diretamente a ação de outros neurotransmissores, tendo assim, ação direta na regulação e controle da fisiologia das sinapses. A adenosina quando administrada no NTS pode causar tanto hipertensão quanto hipotensão dependendo do subnúcleo estimulado (Barraco *et al.*, 1988). Numerosos trabalhos têm demonstrado que a adenosina modula o controle cardiovascular dentro deste núcleo em ratos adultos (Barraco *et al.*, 1996; Barraco & Phillis, 1991; Mosqueda-Garcia *et al.*, 1989; Scislo *et al.*, 2001; Scislo & O'Leary, 1998; Scislo & O'Leary, 2000; Scislo & O'Leary, 2002; Scislo & O'Leary, 2005; St Lambert *et al.*, 1997; Tao & Abdel-Rahman, 1993). Sabe-se também, que os receptores de adenosina estão alterados no NTS de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) (Green, 1991; Illes *et al.*, 1989; Matias *et al.*, 1991; Matias *et al.*, 1993; Robertson *et al.*, 1988), sugerindo um papel importante deste nucleosídeo sobre a rede neural responsável pelo controle da pressão arterial.

Neste sentido, o objetivo dos trabalhos subsequentes serão estudar a ação da adenosina dentro do NTS e sua possível ação sobre a rede neural responsável pelo controle da pressão arterial associada à patologia da hipertensão essencial.

ALTERAÇÃO NA DISTRIBUIÇÃO E NA DENSIDADE DOS RECEPTORES A1 DE ADENOSINA NO NÚCLEO DO TRATO SOLITÁRIO DE RATOS NORMOTENSOS E HIPERTENSOS

D.C. Carrettiero e D.R. Fior-Chadi.

Departamento de Fisiologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, CEP: 05508-900

(Artigo submetido ao Journal of Neural Transmission)

Resumo: Adenosina tem sido descrita como um potente modulador do sistema cardiovascular especificamente no núcleo do trato solitário (NTS). Este estudo mostra a distribuição e a densidade dos receptores A1 de adenosina dentro do NTS de ratos normotensos Wistar Kyoto (WKY) e espontaneamente hipertensos (SHR) desde o nascimento até a idade adulta (1, 15, 30 e 90 dias). Foi utilizado o ligante [³H]DPCPX, um antagonista dos receptores A1 de adenosina, para radioautografia *in vitro*. O NTS apresenta uma distribuição heterogênea dos receptores A1 de adenosina em três diferentes subnúcleos: dorsomedial/dorsolateral, subpostremal e medial/intermedial. Os receptores A1 de adenosina diminuem no subnúcleo dorsomedial/dorsolateral de acordo com os níveis de bregma rostro-caudal tanto de ratos WKY como de ratos SHR de 15, 30 e 90 dias. No entanto, estes receptores aumentam no subnúcleo subpostremal de acordo com os níveis de bregma rostro-caudal de ratos WKY de 30 e 90 dias e de ratos SHR de 15, 30 e 90 dias. Além disso, os receptores A1 de adenosina estão aumentados em ratos SHR quando comparado a ratos WKY no subnúcleo dorsomedial/dorsolateral de 30 e 90 dias e no subnúcleo subpostremal de 15, 30 e 90 dias. Surpreendentemente, esta diferença parece ocorrer em ratos de 15 dias, quando a hipertensão ainda não é aparente. Por fim, os receptores A1 de adenosina aumentam gradativamente desde o nascimento (1 dia) até 30 dias, tanto de ratos WKY como de ratos SHR. O subnúcleo medial/intermedial não apresentou alterações nestes receptores de acordo com os níveis rostro-caudal, idade ou linhagem. Concluindo, nossos resultados sugerem que os receptores A1 de adenosina podem ter papel importante tanto no controle neural da pressão arterial como no desenvolvimento da hipertensão.

Abstract: Adenosine has been shown to modulate cardiovascular control at the levels of the nucleus tractus solitarii (NTS). This study shows the distribution and density of adenosine A1 receptor within the nucleus tractus solitarii (NTS) of Wistar Kyoto (WKY) and spontaneously hypertensive (SHR) rats from birth to adulthood (1,15,30 and 90 day-old). [^3H]DPCPX was used as a ligant for *in vitro* autoradiography. The NTS shows heterogeneous distribution of adenosine A1 receptor in dorsomedial/dorsolateral, subpostremal and medial/intermediate subnuclei. Adenosine A1 receptor decrease in dorsomedial/dorsolateral according to rostral-caudal levels of 15, 30 and 90 day-old WKY and SHR rats. On the other hand, those receptors increase in subpostremal according to rostral-caudal levels of 30 and 90 days old WKY, and of 15, 30 and 90 day-old SHR. Furthermore, adenosine A1 receptors are increased in SHR as compared with WKY in dorsomedial/dorsolateral of 30 and 90 day-old rats and in subpostremal of 15, 30 and 90 day-old rats. Surprisingly, even in 15 days old SHR rats when hypertension is not yet apparent, [^3H]DPCPX values were increased. Finally, adenosine A1 receptors increase from 1 to 30 day-old rats. Medial/intermediate did not show any changes in adenosine A1 receptors according rostral-caudal levels, age or strain. In summary, our result highlights the importance of A1 adenosine system regarding the neural control of blood pressure and the development of hypertension.

Introdução

O desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC) resulta em alterações tanto na transmissão sináptica como no metabolismo encefálico, os quais levam a alterações funcionais no controle cardiovascular (Burnstock, 2007; Esler *et al.*, 1977; Julius, 1996; Robertson *et al.*, 1988). A adenosina, proveniente do catabolismo do ATP, é um nucleosídeo endógeno amplamente aceito como modulador no SNC. Sua ação é mediada por receptores de adenosina, dos quais quatro já foram clonados e farmacologicamente caracterizados: A₁, A_{2A}, A_{2B}, e A₃ (Fredholm *et al.*, 1994). Os subtipos A₁ e A_{2A} são os maiores alvos farmacológicos para análogos da adenosina,

desencadeando efeitos comportamentais em animais (Ferre *et al.*, 1997; Ferre *et al.*, 1992; Ferre *et al.*, 1993; Fredholm, 1995). Ambos os receptores estão presentes no nascimento de ratos (Rivkees, 1995; Weaver, 1993; Weaver, 1996). No entanto, o maior desenvolvimento destes quanto à densidade e ao acoplamento a mensageiros intracelulares formando sistemas ocorre após o nascimento (Johansson *et al.*, 1997; Marangos *et al.*, 1982). Tem sido observado um aumento nos níveis dos receptores A1 de adenosina em ratos desde seu nascimento até a idade adulta (Aden *et al.*, 2000; Rivkees, 1995) e uma diminuição da idade adulta até o envelhecimento (Cunha *et al.*, 1995; Pagonopoulou & Angelatou, 1992). Dentro do SNC, a maior densidade de sítios de recaptção de adenosina foi observada no núcleo do trato solitário (NTS) (Bisserbe *et al.*, 1985), o principal núcleo responsável por integrar e controlar o sistema cardiovascular, sugerindo, assim um papel especial da adenosina neste núcleo.

Numerosos trabalhos têm demonstrado que a adenosina modula o controle cardiovascular dentro do NTS de ratos adultos (Barraco *et al.*, 1991; Barraco *et al.*, 1996; Mosqueda-Garcia *et al.*, 1991; Mosqueda-Garcia *et al.*, 1989; Scislo *et al.*, 2001; Scislo & O'Leary, 1998; Scislo & O'Leary, 2000; Scislo & O'Leary, 2002; Scislo & O'Leary, 2005; St Lambert *et al.*, 1997; Tao & Abdel-Rahman, 1993). Além disso, foi observado que, além de existir um defeito no mecanismo de ação dos receptores A1 de adenosina em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) (Green *et al.*, 1990; Illes *et al.*, 1989; Matias *et al.*, 1993; Robertson *et al.*, 1988), o bloqueio crônico dos receptores purinérgicos do tipo P1 originam um estado hipertensivo em ratos normotensos (Matias *et al.*, 1991). Estes estudos sugerem que a adenosina pode ter um papel importante no desenvolvimento de algum tipo de hipertensão humana (Guimaraes & Albino-Teixeira, 1996).

A adenosina exibe uma ação diferencial dentro do NTS de ratos adultos. Quando microinjetada na porção caudal deste núcleo provoca uma diminuição da pressão arterial e frequência cardíaca (Barraco *et al.*, 1988; Mosqueda-Garcia *et al.*, 1989). No entanto, quando microinjetadas em porções rostrais exercem um efeito pressor (Barraco *et al.*, 1988). Corroborando estes experimentos, estudos prévios de nosso laboratório e de outros grupos têm demonstrado a existência de populações separadas dos receptores A1 de adenosina dentro do NTS (Carrettiero & Fior-Chadi, 2004; Scislo *et al.*, 2001) as quais podem ser responsáveis por mediar respostas cardiovasculares simpáticas diferenciadas em ratos (Scislo *et al.*, 2001). Barraco e Phillis (1991) mostraram que a estimulação dos receptores A1 de adenosina no subnúcleo subpostremal do NTS provoca uma resposta pressora. Também foi reportado um aumento na frequência cardíaca e em outras eferências simpáticas regionais (Barraco *et al.*, 1988; McClure *et al.*, 2005; Mosqueda-Garcia *et al.*, 1991; Tseng *et al.*, 1988).

Enquanto tem sido demonstrado grande interesse no entendimento da ação da adenosina no NTS de ratos adultos, o papel da adenosina durante o desenvolvimento de ratos normotensos e de ratos hipertensos não tem sido muito abordado e discutido pela literatura científica. Sabendo que a pressão arterial da linhagem de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) torna-se consideravelmente mais alta que o padrão normal (pressão sistólica maior que 140mmHg) quando este atinge aproximadamente 5 semanas de vida (Okamoto & Aoki, 1963), o estágio entre a fase após o nascimento e a fase de início da hipertensão (após 5 semanas), pode ser importante para o entendimento do desenvolvimento da hipertensão.

Este contexto sugere, portanto, que a adenosina, através dos receptores A1 de adenosina, regula a resposta pressora de uma maneira particular dentro do complexo processamento do NTS e que este mecanismo pode estar alterado durante o

desenvolvimento de ratos hipertensos colaborando com o surgimento da patologia. Embora muitos estudos tenham reportado um papel funcional diferencial da adenosina no NTS, não existem trabalhos mostrando a distribuição dos receptores A1 de adenosina dentro deste núcleo considerando sua extensão rostro-caudal durante o desenvolvimento de ratos normotensos muito menos de ratos hipertensos. Sabendo que a adenosina provoca uma resposta pressora dentro do NTS e que este sistema está alterado em ratos espontaneamente hipertensos (SHR), a proposta do presente trabalho é avaliar a distribuição e a densidade dos receptores A1 de adenosina dentro do NTS de ratos normotensos (WKY) desde o nascimento até a idade adulta e compará-los a ratos espontaneamente hipertensos (SHR) através da técnica radioautográfica.

Materiais e Métodos

Animais

Ratos normotensos machos (WKY) e ratos espontaneamente hipertensos (SHR) com idade de 1, 15, 30 e 90 dias foram obtidos do Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo (São Paulo, Brasil). Os animais foram divididos em 4 grupos (ratos de 1, 15, 30 e 90 dias). Todos os animais dentro de cada grupo (n=6) apresentavam peso similar. Os ratos foram mantidos em caixas individuais recebendo alimento e água *ad libitum* em ambientes com umidade controlada sob ciclos regulares de claro-escuro (das 7:00h às 19:00h). Todos os procedimentos estavam de acordo com instruções internacionais para experimentação animal.

Radioautografia quantitativa

O procedimento para a radioautografia quantitativa dos receptores A1 de adenosina foi descrito previamente por St. Lambert e colaboradores (1996). Os animais

foram decapitados, seus encéfalos rapidamente removidos da caixa craniana e congelados em isopentano (-35°C). Secções coronais (20µm de espessura) da medula oblonga foram obtidas em um criostato Leica (CM3050) de acordo com o atlas de Paxinos e Watson (1986), e montados em lâminas gelatinizadas para a realização da técnica.

[³H]1,3-dipropyl-8-cyclopentylxanthine ([³H]DPCPX, atividade específica de 121 Ci/mmol; Amersham), um antagonista dos receptores A1 de adenosina, foi utilizado para analisar a distribuição e densidade dos receptores A1 de adenosina dentro do NTS. N⁶-cyclopentyladenosina (CPA; Sigma), um agonista dos receptores A1 de adenosina foi utilizado para a ligação não específica.

Cinco secções da medula oblonga (-13.30, -13.60, -13.80, -14.00 e -14.30 mm do bregma de acordo com o atlas Paxinos e Watson, 1986) foram obtidas de ratos WKY (n=6) e de ratos SHR (n=6) de 1, 15, 30 e 90 dias. Estas foram montadas em lâminas para análise da ligação total dos receptores A1 de adenosina. O mesmo procedimento foi realizado para a ligação não específica utilizando secções adjacentes às da ligação total.

As lâminas, contendo as secções, foram pré-incubadas com tampão Tris-HCl (170 mM, pH 7.4) contendo 0.2 U/ml de adenosina deaminase (ADA) (Sigma) em temperatura ambiente por 15 min para remover a adenosina endógena. Estas foram, então, incubadas com o mesmo tampão contendo 3nM de [³H]DPCPX (uma concentração perto do valor de K_D previamente obtida utilizando experimento de saturação) por 90 min. a temperatura ambiente. A ligação não específica foi realizada exatamente igual à ligação total embora com a utilização de 10 µM de CPA durante os 90min. de incubação. Por fim, as lâminas contendo as secções foram lavadas (3x2min) em tampão Tris-HCl gelado, mergulhadas rapidamente (3X) em água destilada gelada e

deixadas secar em corrente de ar. As lâminas foram, então, expostas a um filme sensível a trítio ($[^3\text{H}]$ Hyperfilm, Amersham, UK) por 8 semanas.

Análise dos dados

O filme sensível ao trítio foi revelado e os radioautogramas contendo as imagens do tronco encefálico, as quais representam os receptores A1 de adenosina, foram quantificados através da densidade óptica utilizando um analisador de imagem computadorizado com software desenvolvido pela Imaging Research (Brock University, Canadá). Foi utilizado um quadrado para obtenção dos valores de densidade óptica, o qual foi mantido constante em todos os níveis rostro-caudal das áreas específicas analisadas dentro do NTS (dorsomedial/dorsolateral, subpostremal e medial/intermedial) exceto pelo NTS todo o qual foi delimitado por uma linha contínua como mostrado na figura 1. Bandas com diferentes intensidades foram obtidas no radioautograma através da utilização de uma fita pré-fabricada marcada com 8 radioatividades conhecidas (Microscale Amersham,UK), a qual foi exposta junto ao filme com as lâminas. Esta curva foi utilizada como padrão para a transformação dos valores de densidade óptica em fmol/mg de proteína.

Análise estatística

O teste de correlação de Pearson foi utilizado para analisar a variação na densidade dos receptores A1 de adenosina de acordo com os níveis rostro-caudal em diferentes subnúcleos e idades de ratos SHR e WKY (significante “s” para inclinação $\neq 0$ e não significativa “ns” para inclinação = 0, $p < 0,05$ como mostrado acima de cada gráfico de barra). As análises estatísticas comparando o mesmo nível de bregma de ratos WKY com ratos SHR no mesmo subnúcleo e idade foram realizadas utilizando-se do

teste t de Student não pareado (* $p < 0.05$). O teste ANOVA seguido do pós-teste de comparações múltiplas de Tukey foi utilizado para comparar o mesmo nível de bregma entre diferentes idades de ratos SHR e WKY no mesmo subnúcleo. Esta análise foi realizada separadamente para cada linhagem (SHR e WKY) e para cada nível de bregma. Símbolos iguais representam diferença não significativa entre barras (*, †, ‡, §, ∂, $p < 0.05$). A estatística foi realizada utilizando o programa GRAPHPAD (Software intuitivo para Ciência, San Diego, CA, USA). Os valores estão representados como média $\pm$ Erro Padrão da Média (E.P.M), $n=6$.

Resultados

Os receptores A1 de adenosina dentro do núcleo do trato solitário (NTS):

Imagens radioautográficas ilustrando a densidade dos receptores A1 de adenosina na porção dorsomedial de secções da medula oblonga de acordo com a idade (ratos de 1, 15, 30 e 90 dias) estão representadas na figura 1. As análises foram realizadas em 5 diferentes níveis de bregma (-13.30, -13.60, -13.80, -14.00 e -14.30 mm), embora estejam representados somente dois deles (nível mais rostral, -13.30 e nível mais caudal, -14.30mm) na figura 1. O NTS, área 4 (delimitado por uma linha contínua), está representado em 4 das 9 imagens (Fig. 1 A, E, D e F). Uma densa marcação dos receptores A1 de adenosina foi observada tanto na porção rostral do subnúcleo dorsomedial/dorsolateral (-13.30mm) (Fig.1, área 1) como na porção caudal do subnúcleo subpostremal (-14.30mm) (Fig 1, área 2) dentro do NTS. Foi observado também um aumento na densidade dos receptores A1 de adenosina de acordo com a idade (de 1 dia até 90 dias, Fig. 1) nestes subnúcleos (dorsomedial/dorsolateral e subpostremal). Os receptores A1 de adenosina apresentaram uma moderada densidade no núcleo do hipoglosso (XII) e uma fraca densidade no subnúcleo medial/intermedial

dentro do NTS (área 3), área postrema (AP) e núcleo motor dorsal do vago (X). Foi observada uma fraca marcação não específica (Fig. 1, I).

Figura 1. Legenda ao lado.

Análise da distribuição e densidade dos receptores A1 de adenosina dentro do núcleo do trato solitário (NTS) de ratos normotensos (WKY) e hipertensos (SHR) de acordo com os níveis de bregma em diferentes idades:

O subnúcleo dorsomedial/dorsolateral apresentou uma diminuição na densidade dos receptores A1 de adenosina de acordo com os níveis rostro-caudal de ratos WKY e SHR de 15, 30 e 90 dias (Fig. 2,A). Além disso, este subnúcleo de ratos SHR apresentou um aumento significativo na densidade dos receptores A1 de adenosina quando comparado a ratos WKY de 30 (dois níveis mais rostrais) e 90 (todos os níveis) dias (Fig. 2,A).

Por outro lado, diferentemente do subnúcleo dorsomedial/dorsolateral, o subnúcleo subpostremal apresentou um aumento na densidade dos receptores A1 de adenosina de acordo com os níveis rostro-caudal de ratos WKY de 30 e 90 dias e de ratos SHR de 15, 30 e 90 dias (Fig. 2,B). Além disso, este subnúcleo de ratos SHR também apresentou um aumento significativo na densidade dos receptores A1 de adenosina com relação a ratos WKY de 15 (dois níveis mais caudais), 30 (todos os níveis) e 90 (todos os níveis) dias (Fig. 2,B).

Embora existam alterações definidas na densidade dos receptores A1 de adenosina nos subnúcleos dorsomedial/dorsolateral e subpostremal dentro do NTS, o subnúcleo medial/intermedial do NTS não apresentou nenhuma alteração na densidade dos receptores A1 de adenosina de acordo com os níveis rostro-caudal em todas as idades (Fig.2,C). Além disso, este subnúcleo de ratos SHR também não apresentou alteração na densidade dos receptores A1 de adenosina quando comparados a ratos WKY em todas as idades (Fig. 2C). A quantificação do NTS total apresentou uma diminuição na densidade dos receptores A1 de adenosina de acordo com os níveis rostro-caudal de WKY de 15, 30 e 90 dias e de ratos SHR de 30 e 90 dias (Fig. 2,D).

Figura 2. Legenda ao lado.

Ratos SHR, nesta mesma área, apresentaram um aumento na densidade dos receptores A1 de adenosina quando comparados a ratos WKY de 15 (dois níveis mais caudais), 30 (todos os níveis) e 90 (todos os níveis) dias (Fig. 2D). O teste de correlação de Pearson foi utilizado para analisar as alterações na densidade dos receptores A1 de adenosina de acordo com os níveis rostro-caudal de ratos SHR e WKY na mesma idade (significante “s” para inclinação $\neq 0$ e não significativa “ns” para inclinação = 0, $p < 0.05$ como mostrado no detalhe acima dos gráficos de barra). A análise estatística comparando ratos WKY com ratos SHR no mesmo nível de bregma e idade foi realizada utilizando-se do teste t não pareado de Student (* $p < 0.05$). Os valores estão representados como média $\pm$ E.P.M, $n=6$ animais.

Distribuição e densidade dos receptores A1 de adenosina dentro do núcleo do trato solitário (NTS) de ratos normotensos (WKY) e hipertensos (SHR) de acordo com a idade em diferentes níveis de bregma:

O subnúcleo dorsomedial/dorsolateral de ratos WKY e SHR dentro do NTS apresentou aumento na densidade dos receptores A1 de adenosina de acordo com a idade (de 1 até 90 dias) em todos os níveis de bregma analisados. Os níveis mais rostrais apresentaram um aumento mais expressivo quando comparados aos níveis mais caudais (Fig. 3A).

O subnúcleo subpostremal de ratos WKY e SHR dentro do NTS também apresentou um aumento na densidade dos receptores A1 de adenosina de acordo com a idade (Fig. 3B). No entanto, diferentemente dos resultados obtidos com o subnúcleo dorsomedial/dorsolateral os níveis mais caudais apresentaram aumento mais expressivo com relação aos níveis mais rostrais (Fig. 3B).

Além disso, a quantificação do NTS total de ratos WKY e SHR apresentou um aumento na densidade dos receptores A1 de adenosina de 1 até 30 dias, quando esta

Figura 3. Legenda ao lado.

densidade alcançou os níveis mais altos (Fig. 3C). As alterações foram observadas em todos os níveis de bregma analisados, apresentando um aumento mais expressivo nos níveis mais rostrais quando comparados aos níveis caudais (Fig. 3C) resultado similar ao apresentado pelo subnúcleo dorsomedial/dorsolateral. Ratos de 90 dias apresentaram

uma diminuição na densidade dos receptores A1 de adenosina quando comparados a ratos de 30 dias (Fig. 3C). A análise estatística foi realizada utilizando-se o teste ANOVA seguido pelo teste de comparação múltipla de Tukey com o objetivo de comparar a densidade dos receptores A1 de adenosina de diferentes idades no mesmo nível de bregma. As análises foram realizadas separadamente para cada linhagem (SHR e WKY) e para cada nível de bregma. Símbolos iguais representam diferença não significativa entre barras (*, †, ‡, §, ∂, $p < 0.05$). Os valores estão representados como média $\pm$ E.P.M, $n=6$ animais.

Discussão

O desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC) origina alterações bioquímicas na neurotransmissão as quais podem levar a uma variabilidade funcional do controle cardiovascular como as apresentadas por ratos espontaneamente hipertensos (SHR) (Burnstock, 2007; Esler *et al.*, 1977; Julius, 1996; Robertson *et al.*, 1988). O presente estudo mostra, pela primeira vez, a distribuição e a densidade dos receptores A1 de adenosina dentro do núcleo do trato solitário (NTS) de ratos normotensos Wistar Kyoto (WKY) e espontaneamente hipertensos (SHR) durante o desenvolvimento. A diferença na densidade dos receptores A1 de adenosina entre as linhagens (WKY e SHR) foi observada mesmo em ratos de 15 dias quando a hipertensão ainda não era aparente. Este resultado está de acordo com estudos prévios, os quais sugerem defeitos funcionais na neurotransmissão purinérgica em ratos SHR (Robertson *et al.*, 1988). Assim, o presente estudo fornece uma valiosa contribuição para o entendimento do controle neural da pressão arterial considerando o aparecimento da hipertensão.

O NTS apresentou alta densidade de receptores A1 de adenosina quando comparado a outros núcleos na porção dorsomedial do tronco encefálico de ratos

adultos de 30 e 90 dias (Fig. 1 A, B, E, F). Estes resultados concordam com a descoberta anterior de Bisslerbe e colaboradores (1985), os quais sugeriram a importância da adenosina no NTS através da observação de uma alta densidade de sítios de recaptação deste nucleosídeo dentro deste núcleo.

O NTS apresentou uma distribuição heterogênea dos receptores A1 de adenosina. O subnúcleo dorsomedial/dorsolateral e o subpostremal apresentaram uma alta densidade de ligação enquanto que o subnúcleo medial/intermedial apresentou uma baixa densidade. A importância de uma análise cuidadosa da distribuição e da densidade dos receptores A1 de adenosina dentro do NTS foi sugerida por Scislo e O'Leary (2002), os quais obtiveram evidências de um padrão complexo na distribuição dos receptores A1 de adenosina dentro deste núcleo. Antunes e colaboradores (2005) também sugerem a importância da distribuição dos receptores purinérgicos para o controle cardiovascular.

O NTS de ratos de 1 dia apresentou uma distribuição homogênea e uma baixa densidade dos receptores A1 de adenosina quando comparados ao NTS de ratos adultos (30 e 90 dias) (Fig 1D,H e 3). Estes resultados concordam com dados da literatura que demonstram um aumento na densidade dos receptores A1 de adenosina dentro do NTS desde o nascimento até a idade adulta (Aden *et al.*, 2000; Rivkees, 1995). Além disso, tem se sugerido que os receptores A1 de adenosina só se desenvolvem completamente (densidade e acoplamento a segundos mensageiros) após o nascimento (Johansson *et al.*, 1997; Marangos *et al.*, 1982). Além disso, o NTS de ratos SHR de 1 dia não apresentou diferenças na densidade ou distribuição dos receptores A1 de adenosina de acordo com os níveis rostro caudal com relação a ratos WKY (Fig. 2 A,B,C,D) sugerindo que defeitos funcionais na neurotransmissão purinérgica no desenvolvimento

da hipertensão proposto por Robertson (Robertson *et al.*, 1988), poderiam estar ocorrendo após o nascimento.

Diferentemente de ratos de 1 dia, o NTS de ratos de 15 dias apresentou uma distribuição heterogênea dos receptores A1 de adenosina (Fig. 1C,G e 2 A,B,C,D). O subnúcleo dorsomedial/dorsolateral apresentou uma diminuição na densidade dos receptores A1 de adenosina dos níveis mais rostral até os níveis caudais (Fig. 2A). No entanto, o subnúcleo subpostremal apresentou um aumento na densidade dos receptores A1 de adenosina dos níveis mais rostrais até os níveis mais caudais (Fig. 2B). Estes resultados estão de acordo com os apresentados por Phillis e colaboradores (1997) os quais sugeriram uma distribuição heterogênea dos receptores de adenosina dentro do NTS. Estudos anteriores de nosso laboratório também demonstraram a existência de populações separadas de receptores A1 de adenosina dentro do NTS de ratos adultos (Carrettiero & Fior-Chadi, 2004), as quais seriam responsáveis por mediar respostas cardiovasculares diferenciadas (Scislo & O'Leary, 2002).

Interessante notar que ratos SHR de 15 dias apresentaram um aumento na ligação de [³H]DPCPX na porção caudal do subnúcleo subpostremal quando comparado a ratos WKY (Fig. 2B). Este resultado concorda com outros estudos na literatura, os quais reportam altos níveis de receptores A1 de adenosina no NTS de ratos SHR com relação a WKY (Carrettiero & Fior-Chadi, 2004; Matias *et al.*, 1993). Além disso, defeitos funcionais dos receptores A1 de adenosina parecem estar relacionados com desenvolvimento da hipertensão no modelo SHR (Robertson *et al.*, 1988). Outro fato interessante é que a administração prolongada de um antagonista não-seletivo dos receptores de adenosina 1,3-dipropyl-8-sulfophenylxantine (DPSPX) provoca hipertensão em ratos normotensos (Matias *et al.*, 1991). Estes resultados corroboram a hipótese que perturbações na neurotransmissão purinérgica podem estar relacionadas

com o desenvolvimento de algum tipo de hipertensão humana (Guimaraes & Albino-Teixeira, 1996).

Além disso, ratos SHR de 15 dias estão em um estágio pré-hipertensivo. Ratos espontaneamente hipertensos (SHR) são divididos em três estágios por Okamoto e colaboradores (1974): pré-hipertensivo, hipertensão inicial e hipertensão estável (do nascimento até um mês, de 1 a 2 meses e de 2 até a idade avançada, respectivamente); assim, as alterações nos receptores A1 de adenosina entre linhagens em ratos de 15 dias observadas no presente trabalho sugerem que alterações na densidade dos receptores A1 de adenosina no estágio pré-hipertensivo podem ser importantes para o entendimento do desenvolvimento da hipertensão.

Ratos WKY e SHR de 30 e 90 dias apresentaram resultados similares quando comparados aos apresentados anteriormente para ratos de 15 dias. O subnúcleo dorsomedial/dorsolateral dentro do NTS de ratos WKY e SHR de 30 e 90 dias apresentaram um aumento na ligação de [³H]DPCPX dos níveis mais rostrais até os níveis mais caudais (Fig. 2A). No entanto, análise do subnúcleo subpostremal nestes animais apresentaram uma diminuição na ligação de [³H]DPCPX de níveis rostral até os caudais (Fig 2B). Além disso, ratos SHR de 30 e 90 dias apresentaram altos valores de ligação de [³H]DPCPX quando comparados com ratos WKY no subnúcleo dorsomedial/dorsolateral e subpostremal (Fig. 2A,B).

Embora exista diferenças na distribuição dos receptores A1 de adenosina nos subnúcleos dorsomedial/dorsolateral e subpostremal de acordo com os níveis rostral-caudais do NTS em ratos SHR e WKY de 15, 30 e 90 dias, o subnúcleo medial/intermedial do NTS em ambas as linhagens em todas as idades não apresentou nenhuma diferença na distribuição dos receptores A1 de adenosina pela ligação de [³H]DPCPX (Fig. 2C). Além disso, a densidade destes receptores no subnúcleo

medial/intermedial de ratos SHR quando comparados a ratos WKY também não apresentou nenhuma diferença em todas as idades analisadas (Fig. 2C). Estas observações sugerem que alterações nos receptores A1 de adenosina nestes subnúcleos (dorsomedial/dorsolateral e subpostremal) são alterações específicas e podem ser importantes para o entendimento do desenvolvimento da hipertensão e do controle neural da pressão arterial.

Sabendo que microinjeção de adenosina na porção rostral do NTS de ratos promove um aumento na pressão arterial e frequência cardíaca através da estimulação dos receptores A1 de adenosina (Barraco *et al.*, 1988) e que em porções mais caudais exercem um efeito depressor através dos receptores A2 de adenosina (Barraco *et al.*, 1988; Mosqueda-Garcia *et al.*, 1989), nosso dado referente à alta densidade dos receptores A1 de adenosina na porção caudal do subnúcleo subpostremal dentro do NTS parece um tanto contraditório (Fig. 2B). No entanto, nós também reportamos uma alta densidade dos receptores A1 de adenosina nas porções rostrais do subnúcleo dorsomedial/dorsolateral (Fig. 2A). Esta alta densidade, por sinal, é mais expressiva quando comparada a apresentada pelo subnúcleo subpostremal (Fig. 2D); Neste contexto nossos dados parecem agora, corroborar com o apresentado por Barraco e colaboradores (1988).

Além disso, St. Lambert e colaboradores (1996) também demonstraram alta densidade de receptores A1 de adenosina na porção caudal do NTS quando comparada à porção rostral. Nossa análise no NTS total mostrou resultado oposto (Fig. 2D). No entanto, a porção caudal do NTS analisado em seu estudo é maior que a analisada em nosso e a porção rostral do NTS não está bem caracterizada. Além disso, a densidade de ligação no subnúcleo subpostremal determinado no presente estudo é similar ao

apresentado por St. Lambert e colaboradores (1996) sugerindo que sua análise poderia ter sido realizada perto deste subnúcleo.

Estes resultados ressaltam que a análise da distribuição e densidade dos receptores A1 de adenosina têm de ser avaliada cuidadosamente considerando os diferentes subnúcleos dentro do NTS. Um suporte para essa afirmação vem dos trabalhos de Scislo e colaboradores (2001). Estes autores mostraram um padrão diferenciado de atividade simpática após estimulação dos receptores A1 de adenosina no NTS sugerindo uma expressão diferencial destes receptores no NTS (Scislo *et al.*, 2001).

Outro ponto interessante é o aumento na densidade dos receptores A1 de adenosina de acordo com a idade. Nosso trabalho mostrou um aumento gradual na ligação de [³H]DPCPX durante o desenvolvimento até 30 dias, quando alcança os maiores valores (Fig. 3C). Tem sido reportado um aumento nos receptores A1 de adenosina desde o nascimento até a idade adulta (Aden *et al.*, 2000; Rivkees, 1995), o qual esta de acordo com nossos dados de 1 dia até 30 dias. No entanto, ratos de 90 dias apresentaram um decréscimo na ligação de [³H]DPCPX quando comparado a ratos de 30 dias. Interessante notar que muitos grupos têm demonstrado uma diminuição dos receptores A1 de adenosina da idade adulta até o envelhecimento (Cunha *et al.*, 1995; Ekonomou *et al.*, 2000; Pagonopoulou & Angelatou, 1992; Scislo *et al.*, 2001). Estes estudos sugerem que a redução dos receptores A1 de adenosina da idade adulta até idades mais avançadas seja devido a uma redução seletiva idade-dependente dos receptores A1 de adenosina e não à degeneração celular generalizada. Embora ratos de 90 dias não sejam considerados ratos com idades avançadas, a redução observada no presente estudo na análise do NTS total sugere que a redução seletiva idade-dependente dos receptores A1 de adenosina pode surgir precocemente na vida do animal.

Concluindo, nosso trabalho sugere uma valiosa contribuição para o entendimento da ação de um potente modulador endógeno como a adenosina dentro do NTS de ratos normotensos e hipertensos em desenvolvimento, enfatizando a importância de uma análise cuidadosa dos receptores de adenosina em subnúcleos específicos dentro do NTS. Além disso, nosso estudo ainda ressalta uma importante alteração na distribuição e densidade dos receptores A1 de adenosina dentro do NTS de ratos hipertensos (SHR) em uma fase pré-hipertensiva (15 dias) quando comparado a ratos normotensos (WKY), sugerindo um defeito específico nos receptores A1 de adenosina, o qual poderia estar relacionado com o desenvolvimento da hipertensão.

Agradecimentos

Estamos gratos ao suporte financeiro da FAPESP, do CNPq e da CAPES. D.C. Carrettiero é, atualmente, financiado pela CAPES.

ADENOSINA MODULA OS RECEPTORES ALFA2-ADRENÉRGICOS DENTRO DO NÚCLEO DO TRATO SOLITÁRIO DE RATOS HIPERTENSOS E NORMOTENSOS

Daniel C. Carrettiero, Renato S. Almeida, Débora R. Fior-Chadi.

Departamento de Fisiologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, CEP: 05508-900

(Artigo submetido ao Hypertension Research)

Resumo: Adenosina atua em muitos núcleos encefálicos modulando a atividade neuronal. O núcleo do trato solitário (NTS) é conhecido como o maior centro de controle cardiovascular. A existência de uma interação entre os receptores A1 de adenosina e os receptores alfa2 adrenérgicos foi avaliada através da técnica de radioautografia quantitativa dentro de subnúcleos específicos do NTS e através de cultura neuronal primária da porção dorsomedial do tronco encefálico de ratos Wistar Kyoto (WKY) e espontaneamente hipertensos (SHR). A técnica da radioautografia foi utilizada para a realização de experimentos de saturação para obtenção dos parâmetros de ligação dos receptores alfa₂-adrenérgicos (B_{max} e K_D) na presença de 3 concentrações de CPA, um agonista dos receptores A1 de adenosina. Experimentos de ligação foram realizados utilizando-se culturas neuronais para confirmar os resultados obtidos na radioautografia. [³H]RX821002, um antagonista dos receptores alfa₂-adrenérgicos foi utilizado para ambos os experimentos. O subnúcleo dorsomedial/dorsolateral de ratos WKY apresentou um aumento nos valores de B_{max} (21%) promovido por 10nM de CPA. No entanto, o subnúcleo subpostremal apresentou uma diminuição nos valores de K_D (24%) promovido por 10nM de CPA. Ratos SHR apresentaram o mesmo padrão de alteração dentro dos mesmos subnúcleos quando comparado a ratos WKY; no entanto, o efeito modulatório do CPA foi promovido por 1nM (aumento no B_{max} de 17%; diminuição do K_D de 26%) ao invés de 10nM como observado em ratos WKY. Experimentos em cultura neuronal confirmam estes resultados. CPA (10⁻⁵M utilizando ratos WKY e 10⁻⁷M utilizando ratos SHR) promoveu um aumento na ligação de [³H]RX82100 (53% para WKY, 48% para SHR). DPCPX, um antagonista dos receptores A1 de adenosina, bloqueou todos os efeitos promovidos pelo CPA. Concluindo, nosso estudo mostra, pela primeira vez, uma interação específica entre os receptores A1 de adenosina e os receptores alfa₂-adrenérgicos dentro do NTS, a qual pode ser importante para o entendimento das complexas respostas autônomas promovidas pela adenosina dentro do NTS. Além disso, alterações na interação entre receptores podem ser importantes para o entendimento do desenvolvimento da hipertensão. A organização das redes moleculares, como a interação entre receptores, indicam novas abordagens para o desenvolvimento de fármacos.

Abstract: Adenosine is known to modulate neuronal activity within the nucleus tractus solitarius (NTS). The modulatory effect of adenosine A1 receptors on α_2 -adrenoceptors was evaluated by quantitative radioautography within NTS subnuclei and by neuronal culture using normotensive (WKY) and hypertensive (SHR) rats. Radioautography was used to perform saturation experiment in order to obtain α_2 -adrenoceptors binding parameters (B_{max} , K_D) in the presence of 3 concentrations of CPA, an adenosine A1 receptor agonist. Neuronal culture was performed to confirm radioautographic results. [3H]RX821002, an α_2 -adrenoceptor antagonist, was used as a ligand for both approaches. Dorsomedial/dorsolateral subnucleus of WKY showed an increase in B_{max} values (21%) induced by 10nM of CPA. However, subpostremal subnucleus showed a decrease in K_D values (24%) induced by 10nM of CPA. SHR showed the same pattern of changes within the same nuclei as compared with WKY; however the modulatory effect of CPA was induced by 1nM (increased B_{max} , 17%; decreased K_D , 26%). Cell culture confirmed these results, since $10^{-5}M$ and $10^{-7}M$ of CPA promoted an increase in [3H]RX821002 binding of WKY (53%) and SHR cells (48%), respectively. DPCPX, an adenosine A1 receptor antagonist, was used to block the modulatory effect promoted by CPA on α_2 -adrenoceptors binding. In conclusion, our study show, for the first time, a specific cross talk between adenosine A1 receptors increasing the binding of α_2 -adrenoceptors within the NTS, which might be important to understand the complex autonomic response induced by adenosine within the NTS. In addition, changes in the interaction between receptors might be relevant to understand the development of hypertension.

Introdução

Adenosina é um nucleosídeo endógeno conhecido como potente neuromodulador no sistema nervosa central (SNC). Sua ação é mediada por receptores de adenosina dos quais quatro foram clonados e farmacologicamente caracterizados: A1, A2a, A2b, e A3 (Fredholm *et al.*, 1994). Entre estes, A1 e A2a são os principais alvos associados a efeitos compartamentais em animais tratados com análogos de adenosina (Ferre *et al.*, 1997; Ferre *et al.*, 1992; Ferre *et al.*, 1993; Fredholm, 1995). Numerosos estudos têm mostrado que a adenosina modula o controle cardiovascular no núcleo do trato solitário (NTS) (Barraco *et al.*, 1991; Barraco *et al.*, 1996; Mosqueda-

Garcia *et al.*, 1991; Mosqueda-Garcia *et al.*, 1989; Scislo *et al.*, 2001; Scislo & O'Leary, 1998; Scislo & O'Leary, 2000; Scislo & O'Leary, 2002; Scislo & O'Leary, 2005; St Lambert *et al.*, 1997; Tao & Abdel-Rahman, 1993). No entanto, o exato mecanismo deste processo ainda não é bem entendido.

O NTS é o principal núcleo responsável por integrar diferentes sinais viscerais, assim como de outros núcleos encefálicos, com o objetivo de originar uma resposta autonômica específica. Este núcleo contém a maior densidade de sítios de recaptção de adenosina no SNC (Bisserbe *et al.*, 1985). A adenosina pode ser liberada dentro do NTS principalmente pelas aferências dos barorreceptores e pela área hipotalâmica responsável pela reação de defesa (St Lambert *et al.*, 1996). Barraco e Phillis (1991) reportaram que a estimulação dos receptores A1 e A2a no subnúcleo subpostremal do NTS provoca uma resposta pressora e depressora, respectivamente. Também modula a frequência cardíaca, assim como outras eferências simpáticas (Barraco *et al.*, 1988; McClure *et al.*, 2005; Mosqueda-Garcia *et al.*, 1991; Tseng *et al.*, 1988). Embora a resposta pressora à estimulação dos receptores A1 prevaleça, Scislo e O'Leary (2002) mostraram que em aproximadamente 30% dos casos uma resposta bifásica ou depressora são também observadas.

Estes achados sugerem que os receptores A1 de adenosina podem regular a resposta pressora de uma maneira particular dentro do complexo processamento do NTS. Estudos de nosso laboratório e de outros grupos têm reportado que a distribuição dos receptores A1 de adenosina dentro do NTS é heterogênea (Carrettiero & Fior-Chadi, 2004; Scislo *et al.*, 2001). Isto pode explicar, em parte, a complexa resposta promovida pelo acionamento dos receptores A1 de adenosina dentro da circuitaria do NTS, embora não explique a resposta bifásica ou depressora apresentada por Scislo e O'Leary (2002).

Os efeitos promovidos por qualquer receptor, alterando a função de outro é conhecida como conversa cruzada entre receptores (em inglês, “Cross talk”). Esta interação tem sido extensivamente estudada para terminais axônicos noradrenérgicos.

Os neurônios noradrenérgicos no SNC apresentam receptores pré-sinápticos pelos quais a liberação de noradrenalina é modulada pela própria noradrenalina (via α_2 -autoreceptores) e/ou por outros neurotransmissores (via heteroreceptores) como a adenosina através dos receptores A1 de adenosina (Allgaier *et al.*, 1991; Gomes *et al.*, 1999). A interação entre receptores tem sido estudada e caracterizada em outros sistemas como, por exemplo, a conhecida interação dos receptores de adenosina A2 e dopamina D2 (Fior *et al.*, 1995; Fior *et al.*, 1994; Fuxe *et al.*, 2005).

O sistema noradrenérgico é bem caracterizado no NTS (Kubo *et al.*, 1987; Kubo & Misu, 1981). A estimulação dos receptores α_2 -adrenérgicos dentro deste núcleo promove uma resposta hipotensora (De Jong, 1974). Os receptores A1 de adenosina têm sido especialmente reportados em modular os receptores α_2 -adrenérgicos no hipocampo e medula (Allgaier *et al.*, 1991; Gomes *et al.*, 1999). Ambos os tipos de receptores são abundantes no NTS e a ativação destes promove alterações cardiovasculares importantes (Barraco *et al.*, 1987; Barraco *et al.*, 1988; Unnerstall *et al.*, 1984). Assim, poderíamos especular que a ativação dos receptores A1 de adenosina modula a resposta hipotensora promovida pela ação da noradrenalina dentro do NTS sugerindo uma possível explicação para a resposta bifásica ou depressora observada por Scislo e O’Leary (2002). Neste contexto levantamos a possibilidade de uma conversa cruzada entre os receptores A1 de adenosina e os receptores α_2 -adrenérgicos dentro do NTS, a qual pode ser relevante para o controle neural cardiovascular e para o tratamento terapêutico.

A medula oblonga, local onde o NTS está localizado, é a única região de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) que apresenta baixos níveis de noradrenalina e um reduzido número e afinidade dos receptores α_2 -adrenérgicos quando comparados a ratos WKY (Takami *et al.*, 1993; Yamada *et al.*, 1989; Yamada *et al.*, 1984). Esta alteração está presente em fases pré-hipertensivas destes animais, sugerindo que algum mecanismo no sistema de neurotransmissão α_2 -adrenérgico no NTS possa estar alterado, desencadeando, assim, a hipertensão em ratos SHR (Nomura *et al.*, 1985). Foram também reportados defeitos funcionais no sistema purinérgico relacionados ao desenvolvimento da hipertensão em ratos SHR (Matias *et al.*, 1993). O tratamento de longa duração com DPSPX, um antagonista não seletivo para os receptores de adenosina, causa um estado hipertensivo em ratos normotensos (Matias *et al.*, 1991). Além disso, a adenosina exógena interfere diferentemente com a neurotransmissão noradrenérgica em SHR comparados a ratos WKY (Jackson, 1987); deste modo, a regulação cardiovascular da pressão arterial no NTS de ratos SHR é dependente tanto do sistema noradrenérgico como do purinérgico.

Neste contexto, podemos especular que a adenosina poderia modular o sistema noradrenérgico dentro do NTS promovendo respostas autonômicas diferenciadas. Este mecanismo poderia ser importante para o entendimento da hipertensão. Assim, o objetivo do presente trabalho é verificar a possível existência de uma interação α_2 -adrenérgico/adenosina A1 dentro do NTS de ratos normotensos e hipertensos.

Materiais e Métodos

Animais

Ratos machos adultos Wistar Kyoto (WKY) e espontaneamente hipertensos (SHR) do Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo (São Paulo, Brasil)

pesando 180-230g foram utilizados no presente estudo. Os ratos foram mantidos em caixas individuais recebendo alimento e água *ad libitum* em ambiente com umidade e temperatura controladas, sob ciclos regulares de claro-escuro (das 7:00h às 19:00h). Estes animais foram utilizados para os estudos de radioautografia. Ratos WKY e SHR com 2 dias de idade (P2) do Instituto Butantã (São Paulo, Brasil) foram utilizados para a cultura neuronal da porção dorsomedial do tronco encefálico. Todos os procedimentos estavam de acordo com as instruções internacionais para experimentação animal.

Radioautografia quantitativa

O procedimento para a radioautografia quantitativa dos receptores alfa₂-adrenérgicos foi descrito previamente por Fior e colaboradores (1994). Os animais foram decapitados, seus encéfalos rapidamente removidos da caixa craniana e congelados em isopentano (-35°C). Secções coronais (20µm de espessura) da medula oblonga foram obtidas em um criostato Leica (CM3050) nos níveis de bregma de -13.30 a -14.30 mm de acordo com o atlas de Paxinos e Watson (1986), e montados em lâminas gelatinizadas para a realização da técnica da radioautografia quantitativa. As secções foram, então, utilizadas para experimentos de saturação

O efeito modulatório do CPA (Sigma), um agonista dos receptores A1 de adenosina, sobre a ligação de [³H]RX821002 (atividade específica 62 Ci/mmol, Amersham), um antagonista dos receptores alpha₂-adrenérgicos, foi estudado dentro do NTS através de experimentos de saturação, os quais foram realizados utilizando 9 concentrações diferentes de [³H]RX821002 (0.5-20nM) na presença e ausência de 3 concentrações de CPA (1, 10, 30nM). 10µM de fentolamina (Sigma), um antagonista dos receptores alpha₂-adrenérgicos, foi utilizado para a ligação não específica e 300nM de DPCPX (Sigma), um antagonista dos receptores A1 de adenosina, foi utilizado para

bloquear o efeito modulatório promovido pelo CPA. O solvente utilizado para o antagonista DPCPX foi o etanol. O etanol foi também adicionado ao controle experimental.

Secções adjacentes dos níveis de bregma de -13.30 a -14.30 mm foram obtidas e separadas em 4 grupos: 1 grupo controle (ausência de CPA) e 3 grupos tratados (presença de 1, 10 e 30 nM de CPA). Todos os grupos foram igualmente distribuídos ao longo dos níveis de bregma rostro-caudal e utilizados para os experimentos de saturação (n=6). Secções igualmente distribuídas ao longo dos níveis de bregma rostro-caudal foram utilizadas para estabelecer a ligação inespecífica utilizando o antagonista fentolamina. O mesmo procedimento foi realizado para verificar a ação do antagonista DPCPX sobre o efeito modulatório do CPA e o efeito do antagonista puro (4 grupos: 1nM de CPA + antagonista, 10nM de CPA + antagonista, 30nM de CPA + antagonista e antagonista puro).

As secções foram pré-incubadas com CPA por 15min antes da adição do ligante [³H]RX821002 (0.5-40 nM) em tampão fosfato 0.01M, pH 7.4, contando 50 nM KCl e 10 nM de MgCl₂ por 60 min a 37 °C. Fentolamina foi adicionada junto com o ligante radioativo. DPCPX (300nM) foi aplicado nas secções 15 min. antes de CPA. Por fim, as lâminas contendo as secções foram lavadas (3x2min) em tampão Tris-HCl gelado, mergulhadas rapidamente (3X) em água destilada e deixadas secar em corrente de ar. As lâminas foram, então, expostas a um filme sensível ao tritium ([³H]Hyperfilm, Amersham, UK) por 7 semanas.

Estes procedimentos foram realizados com o objetivo de avaliar o efeito modulatório promovido pelo CPA nos parâmetros de ligação dos receptores alfa₂-adrenérgicos dentro do NTS de ratos WKY e SHR utilizando o ligante radioativo [³H]RX821002.

O filme sensível ao trítio foi revelado e os radioautogramas contendo as imagens do tronco encefálico, as quais representam os receptores alfa₂-adrenérgicos, foram quantificados através da densidade óptica utilizando um analisador de imagem computadorizado com software desenvolvido pela Imaging Research (Brock University, Canada, model M4/SK/ALU) como descrito por Ferrari e colaboradores (2002). Foi utilizado um quadrado para obtenção dos valores de densidade óptica (0.06mm²), o qual foi mantido constante em todos os níveis rostro-caudal das áreas específicas analisadas dentro do NTS (figura 1) (dorsomedial/dorsolateral, subpostremal e medial/intermedial) como previamente descrito por Carrettiero e Fior-Chadi (2004).

Bandas com diferentes intensidades foram obtidas no radioautograma através da utilização de uma fita pré-fabricada marcada com 8 radioatividades conhecidas (Microscale Amersham,UK), a qual foi exposta junto ao filme com as lâminas. Esta curva foi utilizada como padrão para a transformação dos valores de densidade óptica em fmol/mg de proteína.

Por fim, os valores obtidos foram analisados pelo software estatístico GRAPHPAD PRISM e transformados em uma curva de saturação dos receptores alfa₂-adrenérgicos. A partir desta curva foram obtidos os parâmetros de ligação: K_D (constante de dissociação) e B_{max} (número máximo de sítios de ligação).

Cultura neuronal do tronco encefálico

O protocolo da cultura neuronal do tronco encefálico foi modificado de Kivel e colaboradores (2001). Aproximadamente 12 ratos com idade de 2 dias foram sacrificados por decaptação e seus encéfalos rapidamente retirados da caixa craniana e colocados em uma placa de petri contendo tampão gelado, pH 7.4 (NaCl 120mM, KCl 5mM, KH₂PO₄ 1.2mM, MgSO₄ 1.2mM, NaHCO₃ 25mM e Albumin 0.3%). O cerebelo,

as meninges e os vasos sanguíneos foram cuidadosamente removidos e a área contendo o NTS (porção dorso-medial do tronco encefálico) foi dissecada, cortada em cubos de aproximadamente 2mm^2 e transferida para um tubo falcon contendo a mesma solução utilizada anteriormente. Estes procedimentos foram realizados com a utilização de um microscópio de dissecação (D.F.Vasconcellos, modelo MC-M903). Foi então adicionada tripsina (0.05%) à solução contendo o tecido, seguida de uma incubação de 30min a 37°C sob agitação. Após este período, foi adicionado inibidor de tripsina (0.006%), as peças foram deixadas decantar por 5 min, e o sobrenadante retirado. O decantado foi ressuspenso em solução gelada contendo 10% de soro fetal bovino (SFB). O tecido foi, então, mecanicamente dissociado utilizando uma pipeta pasteur longa. A trituração foi caracterizada por repetidas sucções do tecido por aproximadamente 10 vezes. O tecido foi deixado decantar por 5 min e o sobrenadante retirado e separado. Este procedimento foi repetido 3 vezes com o decantado. Os três sobrenadantes foram combinados e centrifugados a 300Xg por 5 min. O precipitado de células foi ressuspenso em meio de crescimento Neurobasal TM (Gibco) contendo 2% de suplemento B27 (Gibco), 0,25mM L-glutamina (Sigma), 0,25mM Glutamax (Gibco) e gentamicina (40mg/l, Gibco). A porcentagem de células viáveis foi determinada pelo método de exclusão por trypan blue. As células foram, então, plaqueadas em placa de 12 poços, previamente tratada com poli-D-lisina (Sigma), na concentração de $1800\text{cél}/\text{mm}^2$ e deixadas em uma estufa de CO_2 5% a 37°C por aproximadamente 7 dias. Neste período o meio de crescimento foi trocado 50% a cada 2 dias (mais detalhes para cultura de tronco encefálico ver Kivell e colaboradores, 2001). A caracterização da cultura quanto à porcentagem de células neuronais e gliais foi realizada através da técnica de imunohistoquímica (Kivell *et al.*, 2001) utilizando anticorpos primários que detectam proteínas associadas a microtúbulos (MAP2) em neurônios e proteína glial

fibrilar ácida (GFAP) nas células gliais. Culturas de 7 dias foram as que apresentaram maior proporção neuronal.

Experimento de ligação.

O efeito modulatório de 8 diferentes concentrações de CPA (10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} e 10^{-11} M) (Sigma), agonista dos receptores A1 de adenosina, sobre a ligação de [3 H]RX821002 (atividade específica, 62 Ci/mmol, Amersham), antagonista dos receptores α_2 -adrenérgicos, foi avaliado utilizando culturas neuronais da porção dorsomedial do tronco encefálico através de experimentos de ligação. 3nM de [3 H]RX821002, uma concentração previamente obtida perto dos valores de B_{max} , foi utilizada no presente experimento.

A cultura neuronal foi lavada (3X5min) com solução Krebs Ringer com bicarbonato de sódio (KRGB), pH 7.4 (NaCl 120mM, KCl 5mM, $CaCl_2$ 2.5mM, KH_2PO_4 1.2mM, $MgSO_4$ 1.2mM, $NaHCO_3$ 25mM e Glicose 13mM) contendo 0.2U/ml de adenosina deaminase (ADA)(Sigma) à temperatura ambiente para remover adenosina endógena. Seguindo, as células foram incubadas na mesma solução com diferentes concentrações de CPA (de 10^{-4} a 10^{-11} M) por mais 15 min a 4°C. O ligante [3 H]RX821002 foi, então, adicionado (3nM) e as células foram incubadas por 1h a 4°C. 10 μ M de fentolamina (Sigma), antagonista dos receptores α_2 -adrenérgicos foi utilizado para a ligação não específica. 300nM de DPCPX (Sigma), antagonista dos receptores A1 de adenosina, foi adicionado 15min antes de CPA com o objetivo de bloquear o efeito modulatório provocado pelo CPA na ligação de [3 H]RX821002. O solvente utilizado para o antagonista DPCPX foi o etanol. O etanol foi também adicionado ao controle experimental.

Estes procedimentos foram realizados para avaliar o efeito modulatório da CPA sobre a ligação de [³H]RX821002 utilizando cultura neuronal da porção dorsomedial do tronco encefálico de ratos normotensos Wistar Kyoto (WKY) e espontaneamente hipertensos (SHR).

Após a incubação, as células foram lavadas com a mesma solução gelada KRGB (3X3min) e resuspendidas em água destilada deionizada gelada (4 °C), imersas em líquido de cintilação (Ecolume, ICN Biomedicals, CO, USA) e a radioatividade foi contada (Packard TriCarb 2100TR, Downers Grove Illinois, USA). A concentração da proteína foi determinada pelo método de Bradford (1976) e o resultado foi expresso em fmol/mg de proteína.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o teste ANOVA seguido do pós-teste de Dunnett (tratamentos *vs* controle). Para os estudos radioautográficos, os valores utilizados foram obtidos utilizando os parâmetros de ligação dos receptores alfa₂-adrenérgicos (B_{max} e K_D). Os valores foram obtidos após experimento de saturação utilizando o programa GRAPHPAD (Software intuitivo para Ciência, San Diego, CA, USA). Os valores estão representados como média ± Erro Padrão da Média (E.P.M), * $P < 0.05$, $n = 6$.

Resultados

Foi observada uma densa marcação dos receptores alfa₂-adrenérgicos pelo ligante [³H]RX821002 no núcleo do trato solitário (NTS) nos níveis: intermedial (Fig. 1A) (-13.80mm do bregma), rostral (Fig. 1B) (-13.30mm do bregma) e caudal (Fig. 1C) (-14.30mm do bregma). Foram delimitados três subnúcleos dentro do NTS (linha

contínua, Fig. 1B,C - 4) denominados de subnúcleos dorsomedial/dorsolateral (Fig. 1B,C - 1), subpostremal (Fig. 1B,C - 2) e medial/intermedial (Fig. 1B,C - 3). Estes subnúcleos foram descritos por nosso laboratório (Carrettiero & Fior-Chadi, 2004) apresentando concentrações distintas de receptores A1 de adenosina. Foi observada uma fraca marcação radioativa de receptores α_2 -adrenérgicos no núcleo motor dorsal do vago (Fig. 1B,C - X) e no núcleo do hipoglosso (Fig. 1B,C - XII). O efeito modulatório promovido pelo agonista dos receptores A1 de adenosina, CPA, sobre a ligação dos receptores α_2 -adrenérgicos, foi analisado nestes subnúcleos (Fig. 2 e 3).

Figura 1. Legenda ao lado.

Os receptores A1 de adenosina modulam os receptores alfa₂-adrenérgicos em ratos normotensos (WKY): O subnúcleo dorsomedial/dorsolateral dentro do NTS apresentou um aumento nos valores de B_{max} (21%) promovidos por 10nM de CPA quando comparados ao grupo controle sem CPA (Fig 2A, dorsomedial/dorsolateral). Não foram observadas alterações nos valores de K_D com 10 nM de CPA neste subnúcleo. 1nM e 30nM de CPA também não tiveram efeito nos valores de B_{max} ou K_D neste subnúcleo. O subnúcleo medial/intermedial não apresentou alterações nos valores de B_{max} ou K_D em todas as concentrações utilizadas de CPA (1, 10 ou 30nM) (Fig. 2A, medial/intermedial). Por outro lado, o subnúcleo subpostremal apresentou uma diminuição nos valores de K_D (24%) induzida por 10nM de CPA quando comparado ao grupo controle sem CPA (Fig 2A, subpostremal). Não foram observadas alterações nos valores de B_{max} utilizando 10nM de CPA neste subnúcleo. 1nM e 30 nM de CPA também não provocaram efeitos nos valores de B_{max} ou K_D neste subnúcleo.

As curvas de saturação obtidas tanto do grupo controle (ausência de CPA) como do grupo tratado (presença de 1 e 10nM de CPA) estão ilustrados na figura 2B. As curvas de saturação utilizando 30nM de CPA não foram representadas por não terem apresentado efeito nos parâmetros de ligação dos receptores alfa₂-adrenérgicos (B_{max} ou K_D) em nenhum subnúcleo analisado. DPCPX, um antagonista dos receptores A1 de adenosina, não teve efeito nos valores de B_{max} ou K_D quando administrado sozinho (Fig. 2A, dorsomedial/dorsolateral, subpostremal). O antagonista também foi capaz de bloquear o efeito modulatório promovido por 10nM e 1nM de DPCPX nos parâmetros de ligação dos receptores alfa₂-adrenérgicos (Fig. 2A).

Os receptores A1 de adenosina são mais sensíveis em modular os receptores alfa₂-adrenérgicos em ratos hipertensos (SHR): O subnúcleo dorsomedial/dorsolateral

Figura 2. Legenda ao lado.

dentro do NTS também apresentou um aumento nos valores de B_{max} (18%). No entanto, este aumento foi promovido por 1nM de CPA, ao invés de 10nM apresentado pelos ratos WKY, quando comparados com o grupo controle sem CPA (Fig. 3A, dorsomedial/dorsolateral). Nenhuma alteração foi observada nos valores de K_D utilizando 1nM de CPA neste subnúcleo. 10nM e 30nM de CPA também não tiveram

Figura 3. Legenda ao lado.

efeito nos valores de B_{max} ou K_D neste subnúcleo. O subnúcleo medial/intermedial não apresentou alteração tanto nos valores de B_{max} como de K_D quando na presença de qualquer concentração de CPA (1, 10 ou 30nM) (Fig 3A, medial/intermedial). Por outro lado, o subnúcleo subpostremal apresentou uma diminuição nos valores de K_D (26%) na presença de 1nM de CPA com relação ao grupo controle sem CPA (Fig. 3A,

subpostremal). Nenhuma alteração foi observada nos valores de $B_{\max}$ utilizando 1nM de CPA neste subnúcleo. 10nM e 30nM de CPA também não apresentaram efeitos nos valores de $B_{\max}$ ou K_D neste subnúcleo. As curvas de saturação do grupo controle (ausência de CPA) e dos grupos tratados (presença de 1 e 10nM of CPA) estão ilustradas na figura 3B. As curvas de saturação utilizando 30nM de CPA não foram representadas por não terem apresentado alterações nos parâmetros de ligação dos receptores alfa₂-adrenérgicos ($B_{\max}$ ou K_D) em nenhum subnúcleo analisado. DPCPX, um antagonista dos receptores A1 de adenosina, não teve efeito nos valores de $B_{\max}$ ou K_D quando administrado sozinho (Fig. 3A, dorsomedial/dorsolateral, subpostremal). O antagonista também foi capaz de bloquear o efeito modulatório promovido por 1nM e 10nM de DPCPX nos parâmetros de ligação dos receptores alfa₂-adrenérgicos (Fig. 3A).

Efeito modulatório dos receptores A1 de adenosina sobre a ligação dos receptores alfa₂-adrenérgicos em cultura neuronal da porção dorsomedial do tronco encefálico de ratos hipertensos (SHR) e normotensos (WKY). A cultura neuronal da porção dorsomedial do tronco encefálico de ratos WKY apresentou um aumento na ligação de [³H]RX821002 promovida por 10⁻⁵M de CPA (Fig. 4A). Cultura neuronal da porção dorsomedial do tronco encefálico de ratos hipertensos (SHR) também apresentou aumento na ligação de [³H]RX821002, no entanto, o efeito modulatório foi provocado por 10⁻⁷M de CPA ao invés de 10⁻⁵M observado com ratos WKY (Fig. 4A). 300nM de DPCPX, um antagonista dos receptores A1 de adenosina bloqueou completamente o efeito modulatório promovido pelo CPA sobre a ligação de [³H]RX821002 (Fig. 4B).

Figura 4. Legenda ao lado.

Discussão

O presente trabalho sugere uma complexa interação entre os receptores A1 de adenosina e os receptores alfa₂-adrenérgicos dentro do NTS de ratos normotensos Wistar-Kyoto (WKY) e espontaneamente hipertensos (SHR). Secções da medula oblonga de ratos WKY e SHR mostraram que, um agonista dos receptores A1 de adenosina induz um aumento nos valores de B_{max} e uma diminuição dos valores de K_D nos subnúcleos dorsomedial/dorsolateral e subpostremal do NTS, respectivamente. Estas alterações promovidas pelo CPA parecem ser diferenciadas em ratos hipertensos.

Neste contexto, os resultados sugerem que uma modulação muito bem

organizada poderia estar ocorrendo em diferentes subnúcleos dentro do NTS com o objetivo de promover respostas autonômicas apropriadas. Além disso, alterações neste mecanismo podem ser importantes para entender o desenvolvimento da hipertensão. Experimentos utilizando cultura neuronal de ratos normotensos e hipertensos foram utilizados para confirmar a interação entre estes dois sistemas *in vivo*.

A adenosina exibe uma ação diferencial dentro do NTS. Microinjeção de adenosina na porção caudal do NTS promove uma diminuição na pressão arterial e frequência cardíaca (Barraco *et al.*, 1988; Mosqueda-Garcia *et al.*, 1989). No entanto, em porções mais rostrais, a administração de adenosina promove um aumento na pressão arterial (Barraco *et al.*, 1988). Em concordância com estes dados, estudos anteriores de nosso laboratório reportaram a existência de populações separadas de receptores A1 de adenosina dentro do NTS apresentando altas concentrações de receptores A1 de adenosina nas porções rostrais e baixas nas porções caudais (Carrettiero & Fior-Chadi, 2004). Não foram observadas somente populações separadas dos receptores A1 de adenosina, mas uma distribuição completamente heterogênea dentro do NTS. Alta densidade dos receptores A1 de adenosina foi observada nos subnúcleos dorsomedial/dorsolateral e subpostremal (Carrettiero & Fior-Chadi, 2004). Assim, as alterações nos parâmetros de ligação dos receptores alfa₂-adrenérgicos observadas no presente estudo neste subnúcleos do NTS causadas pelo CPA podem sugerir evidências de uma interação entre os receptores A1 de adenosina e os receptores alfa₂-adrenérgicos. Interações entre estes dois sistemas foram descritas no hipocampo e medula oblonga (Allgaier *et al.*, 1991; Gomes *et al.*, 1999).

Barraco e Phillis (1991) observaram que, a estimulação dos receptores A1 de adenosina no NTS além de provocar uma resposta pressora também aumenta a frequência cardíaca e a atividade de outras eferências simpáticas (Barraco *et al.*, 1988;

McClure *et al.*, 2005; Mosqueda-Garcia *et al.*, 1991; Tseng *et al.*, 1988). Embora a resposta pressora à ativação dos receptores A1 de adenosina prevaleça foram observadas respostas bifásicas ou depressoras em aproximadamente 30% dos casos (Scislo & O'Leary, 2002). Além destes autores White e colaboradores (1996) também mostraram o efeito hipotensor provocado pela estimulação dos receptores A1 de adenosina no NTS. Este efeito, aparentemente contraditório, concorda com nossos resultados. Nós mostramos que ativação dos receptores A1 de adenosina provoca um aumento no número (aumento no B_{max}) e na afinidade (diminuição do K_D) dos receptores alfa₂-adrenérgicos. Lembrando que a ativação dos receptores alfa₂-adrenérgicos promove uma resposta hipotensora (Kubo & Misu, 1981), análogos dos receptores A1 de adenosina poderiam provocar uma resposta depressora ou hipertensora atenuada dentro do NTS dependendo exclusivamente da subregião estimulada, da concentração do análogo e/ou da presença de noradrenalina. Neste contexto, nossos resultados sugerem uma explicação para os resultados aparentemente contraditórios obtidos por Barraco e colaboradores (1988), Scislo e O'Leary (2002) e White e colaboradores (1996).

É interessante notar que a estimulação dos receptores A1 e A2a no NTS provoca uma resposta simpática regional diferenciada (Scislo *et al.*, 2001). Assim, é possível sugerir que os receptores A1 de adenosina podem estar regulando a pressão arterial de uma maneira particular em diferentes subnúcleos dentro do complexo processamento do NTS. Este fato poderia explicar o aumento no número e na afinidade dos receptores alfa₂-adrenérgicos em diferentes subnúcleos dentro do NTS.

O subnúcleo medial/intermedial não apresentou alterações nos parâmetros de ligação dos receptores alfa₂-adrenérgicos em qualquer concentração de CPA. Esta observação concorda com estudos anteriores realizados por nosso laboratório, os quais

mostraram baixas concentrações de receptores A1 de adenosina neste subnúcleo (Carrettiero & Fior-Chadi, 2004). Altas concentrações de CPA (30nM) também não provocaram alterações na ligação dos receptores alfa₂-adrenérgicos nos três subnúcleos analisados.

Um dos grandes achados do presente estudo foi a demonstração de que CPA, em doses baixas de 1nM para SHR e 10nM para WKY, foi efetiva em produzir uma alteração significativa no número e afinidade dos receptores alfa₂-adrenérgicos nos subnúcleos dorsomedial/dorsolateral e subpostremal, respectivamente. No entanto, o efeito promovido pelo CPA desaparece com concentrações mais altas e mais baixas. Nós também observamos este padrão de dose-resposta utilizando culturas neuronais de ratos normotensos e hipertensos (Fig. 4). Este resultado poderia ser devido a um fenômeno de desensibilização, a uma depleção de um fator necessário para a interação ou até mesmo de uma alteração conformacional dose-dependente. Este tipo de curva dose-resposta em forma de U invertido tem sido observada em outros sistemas como, por exemplo, neurotensina/neuropeptídeo Y, angiotensina II/alfa₂-adrenérgicos, bradicinina/ alfa₂-adrenérgicos (Fior & Fuxe, 1995; Fior *et al.*, 1995; Fior *et al.*, 1994; Von Euler & Fuxe, 1987; Von Euler *et al.*, 1989; Yamada *et al.*, 1984; Yang *et al.*, 1994). A conversa cruzada entre receptores de adenosina e outros receptores, também foi reportada, como a adenosina A2A/dopamina D2, adenosina A1/adenosina A2 e adenosina A1/dopamina D1 (Franco *et al.*, 2007; Fuxe *et al.*, 2005).

A descoberta que ratos SHR e WKY apresentaram as mesmas alterações com a mesma intensidade dos receptores alfa₂-adrenérgicos foi surpreendente devido ao fato de existir um aumento dos receptores A1 de adenosina no NTS de ratos SHR quando comparados a ratos WKY (Carrettiero & Fior-Chadi, 2004; Matias *et al.*, 1993). Um maior número de receptores A1 de adenosina dentro do NTS de ratos hipertensos

promoveria uma maior ativação destes e um concomitante aumento no número de receptores α_2 -adrenérgicos, aumentando, assim, a resposta depressora mediada pela noradrenalina. Assim, a estimulação dos receptores A1 de adenosina promoveria uma resposta pressora atenuada dentro do NTS de ratos hipertensos como demonstrado por Tseng e colaboradores (Tseng *et al.*, 1995). Embora nós não tenhamos observado um aumento maior no número dos receptores α_2 -adrenérgicos em SHR, quando comparados a ratos WKY, mediado por análogos dos receptores A1 de adenosina, como era esperado, nós descobrimos que os receptores α_2 -adrenérgicos são responsivos a doses mais baixas de análogos dos receptores A1 de adenosina em ratos SHR. Isto significa, que análogos dos receptores A1 de adenosina são mais potentes em modular o sistema α_2 -adrenérgico dentro do NTS de ratos hipertensos com relação a ratos normotensos; Assim, o sistema α_2 -adrenérgico em ratos SHR pode promover uma resposta hipotensora quando na presença de menores concentrações de agonistas de receptores A1 de adenosina nos subnúcleos específicos dentro do NTS. Esta hipótese concorda com um recente estudo funcional o qual demonstra que ratos hipertensos exibem uma resposta pressora, taquicárdica e neuronal atenuada mediada pela adenosina dentro do NTS quando comparados a ratos normotensos (Tseng *et al.*, 1995).

Outra interpretação para a maior sensibilidade modulatória dos receptores A1 de adenosina sobre os receptores α_2 -adrenérgicos em SHR pode ser devida ao reduzido número e afinidade dos receptores α_2 -adrenérgicos no NTS de ratos hipertensos (Takami *et al.*, 1993; Yamada *et al.*, 1989; Yamada *et al.*, 1984). Esta redução está presente em fases pré-hipertensivas destes animais, sugerindo que algum mecanismo no sistema de neurotransmissão α_2 -adrenérgico no NTS possa estar alterado desencadeando, assim, a hipertensão em ratos SHR (Nomura *et al.*, 1985). Neste

sentido, a maior sensibilidade dos receptores A1 de adenosina atuaria de uma forma compensatória sobre o sistema hipotensor através dos receptores α_2 -adrenérgicos.

Estes resultados enfatizam o poder da ação modulatória mediada pela adenosina dentro da circuitaria neuronal especificamente no NTS, a qual pode ser responsável por promover respostas autonômicas cardiovasculares complexas (Fig. 5). Concluindo, nosso trabalho sugere, pela primeira vez, uma contribuição para o entendimento da ação de um potente modulador endógeno como a adenosina em alterar o número e a afinidade dos receptores α_2 -adrenérgicos, e enfatiza a importância de uma análise cuidadosa dos sítios de ação da adenosina e seus parceiros dentro do NTS, a qual pode ser fundamental para originar respostas autonômicas apropriadas (Fig. 5). A organização das redes neurais, assim como a organização das conversas cruzadas entre os receptores A1 de adenosina e os α_2 -adrenérgicos, indicam novas abordagens para o desenvolvimentos de drogas associadas a patologias como a hipertensão essencial.

Figura 5. Legenda ao lado.

Agradecimentos

Estamos gratos ao suporte financeiro da FAPESP, do CNPq e da CAPES. D.C.

Carrettiero é, atualmente, financiado pela CAPES.

ADENOSINA MODULA OS RECEPTORES ALFA2-ADRENÉRGICOS ATRAVÉS DA FOSFOLIPASE C. UM ESTUDO EM CULTURA DE CÉLULAS DO TRONCO ENCEFÁLICO DE RATOS

Daniel C. Carrettiero e Débora R. Fior-Chadi.

Departamento de Fisiologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, CEP: 05508-900

(Artigo pronto para submissão)

Resumo: Adenosina atua em diversas áreas dentro do sistema nervoso central (SNC) modulando a atividade neuronal. O núcleo do trato solitário (NTS) é conhecido como o maior centro encefálico responsável pelo controle cardiovascular. Estudos prévios de nosso laboratório demonstraram que os receptores A1 de adenosina aumentam a ligação dos receptores alfa₂-adrenérgicos dentro do NTS, sugerindo um papel importante da adenosina no controle cardiovascular, no entanto, ainda não se conhecem os mecanismos intracelulares responsáveis por tal modulação. Sendo assim, o objetivo do presente trabalho é avaliar as vias intracelulares responsáveis por este efeito modulatório através de experimentos de ligação utilizando o ligante radioativo [³H]RX821002, um antagonista dos receptores alfa₂-adrenérgico. Este estudo foi realizado em cultura de células do tronco encefálico de ratos Wistar (WR). 8 concentrações de CPA (10⁻⁴ to 10⁻¹¹M), um agonista dos receptores A1 de adenosina, foram utilizadas para modular a ligação de [³H]RX821002. DPCPX, um antagonista dos receptores A1 de adenosina, foi utilizado para bloquear o efeito de CPA sobre a ligação de [³H]RX821002. 10⁻⁵M de CPA provocou um aumento na ligação de [³H]RX821002. As vias intracelulares envolvidas nesta modulação foram avaliadas utilizando-se de diversos inibidores e dois quelantes [SQ22536, um inibidor da adenilato ciclase (AC), U-73122, um inibidor da fosfolipase C (PLC), Xestospongina C, um inibidor dos receptores de IP₃, Ro318220, um inibidor da proteína quinase dependente de cálcio (PKC), BAPTA, um quelante de cálcio intracelular e EGTA, um quelante de cálcio extracelular]. U-73122, Ro318220, Xestospongina e BAPTA inibiram a ação modulatória provocada pela ativação dos receptores A1 de adenosina sobre a ligação de [³H]RX821002 sugerindo uma modulação dependente de PLC, PKC, IP₃ e Cálcio intracelular. Concluindo, nosso estudo demonstrou, pela primeira vez, que os receptores A1 de adenosina modulam os receptores alfa₂-adrenérgicos através de uma via de sinalização não canônica dependente de fosfolipase C. Esta descoberta pode ser importante para o entendimento do papel da adenosina dentro do NTS no controle cardiovascular.

Abstract: Adenosine acts at many sites to modulate neuronal activity. The nucleus tractus solitarii (NTS) is known as a major brain site in cardiovascular control. Previous studies from our group have shown the adenosine A1 receptors increase the binding of α_2 -adrenoceptors within the NTS, suggesting the important role of adenosine in cardiovascular control. The aim of the present study is to evaluate the intracellular signaling responsible for such process using brainstem cell culture of Wistar (WR) rats by means of binding assay. 8 different concentration of CPA (10^{-4} to 10^{-11}), an A1 adenosine agonist, were used to modulate [3 H]RX821002 binding, an α_2 -adrenoceptor antagonist. DPCPX, an A1 adenosine antagonist, was used to block the modulatory effect of CPA on [3 H]RX821002 binding. 10^{-5} M of CPA promote an increase in [3 H]RX821002 binding. The intracellular cascade involved in such modulatory process were evaluated using different intracellular signaling molecules inhibitors and two queletors [SQ22536, an adenylyl cyclase (AC) inhibitor, U-73122, an phospholipase C (PLC) inhibitor, Xestospongin C, an IP3 receptor inhibitor, Ro318220, an protein kinase calcium dependent (PKC), BAPTA, an intracellular calcium quelator, EGTA, an extracelular calcium quelator]. U-73122, Xestospongin C, Ro3326 and BAPTA were capable to inhibit the effect promoted by adenosine A1 receptor on [3 H]RX821002 binding suggesting a modulation PLC, PKC, IP3 and Ca^{2+} dependent pathway. In conclusion, our study show, for the first time, that adenosine A1 receptor modulates the α_2 -adrenoceptors through a non-canonical phospholipase C dependent pathway. This result might be important to understand the adenosine role within the NTS in cardiovascular control.

Introdução

O nucleosídeo adenosina, proveniente do catabolismo do ATP, faz parte de um grupo de substâncias endógenas que agem em órgãos e tecidas alterando a resposta celular a diversas substâncias. Tais moléculas são conhecidas como moduladoras endógenas regulando diversas atividades fisiológicas do organismo. Desta maneira, podem modificar diretamente o comportamento (Correia-de-Sa *et al.*, 2006; Daly, 1982; Harris-Warrick & Marder, 1991).

A adenosina é conhecida como um potente neuromodulador dentro do sistema nervoso central (SNC). Quatro tipos de receptores de adenosina foram clonados e farmacologicamente caracterizados: A1, A2a, A2b, e A3 (Fredholm *et al.*, 1994). Entre estes 4 subtipos, os receptores A1 e A2a são os principais alvos, desencadeando efeitos comportamentais em animais tratados com análogos de adenosina (Ferre, 1997; Ferre *et al.*, 1997; Ferre *et al.*, 1992; Ferre *et al.*, 1993; Fredholm, 1995).

Numerosos estudos têm demonstrado que a adenosina atua como um potente neuromodulador do controle cardiovascular especialmente dentro do núcleo do trato solitário (NTS) (Barraco *et al.*, 1991; Barraco *et al.*, 1996; Mosqueda-Garcia *et al.*, 1991; Mosqueda-Garcia *et al.*, 1989; Scislo *et al.*, 2001; Scislo & O'Leary, 1998; Scislo & O'Leary, 2000; Scislo & O'Leary, 2002; Scislo & O'Leary, 2005; St Lambert *et al.*, 1997; Tao & Abdel-Rahman, 1993).

O NTS, localizado na porção dorsomedial do tronco encefálico, é o principal núcleo responsável por integrar diferentes sinais provenientes tanto de outros centros encefálicos como de diversos órgãos, com o objetivo de originar uma resposta autonômica cardiovascular específica e apropriada para a manutenção das atividades diárias do indivíduo. Este núcleo contém a maior densidade de sítios de recaptção de adenosina do SNC (Bisserbe *et al.*, 1985), sugerindo um papel importante deste sobre o controle cardiovascular. A adenosina pode ser liberada dentro do NTS principalmente por aferências provenientes dos barorreceptores e de áreas hipotalâmicas de defesa (St Lambert *et al.*, 1996).

Barraco e Phillis (1991) demonstraram que a estimulação dos receptores A1 e A2a de adenosina dentro do NTS provoca uma resposta pressora e depressora, respectivamente. Também pode aumentar ou diminuir a frequência cardíaca e outras

eferências simpáticas regionais (Barraco *et al.*, 1988; McClure *et al.*, 2005; Mosqueda-Garcia *et al.*, 1991; Tseng *et al.*, 1988).

Embora a resposta pressora prevaleça quando os receptores A1 de adenosina são ativados dentro do NTS, Scislo e O’Leary (2002) demonstraram que, em aproximadamente 30% dos casos, uma resposta bifásica ou depressora também acontece. Estes dados sugerem que os receptores A1 de adenosina podem regular o controle cardiovascular de uma maneira particular dentro do complexo processamento do NTS.

Estudos de nosso laboratório e de outros têm demonstrado que a distribuição dos receptores A1 de adenosina dentro do NTS é altamente heterogênea em ratos (Carrettiero & Fior-Chadi, 2004; Scislo *et al.*, 2001). Este fato pode explicar, em parte, a complexa resposta cardiovascular promovida pelo acionamento dos receptores A1 de adenosina dentro do NTS, no entanto, pecam em explicar a resposta bifásica ou depressora observada por Scislo e O’Leary (2002).

Nosso grupo vem, há bastante tempo, estudando a interação dos receptores A1 de adenosina com outros sistemas de neurotransmissão dentro do NTS. Recentemente, foi demonstrado que a estimulação dos receptores A1 de adenosina é capaz de aumentar o número e a afinidade dos receptores α_2 -adrenérgicos em subnúcleos específicos do NTS (Carrettiero *et al.*, 2008a) (segundo artigo científico do presente trabalho). Estes dados, sugerem uma possível explicação para a resposta bifásica ou depressora promovida pela ativação dos receptores A1 de adenosina dentro do NTS observada por Scislo e O’Leary (2002) já que a noradrenalina, através dos receptores α_2 -adrenérgicos tem um efeito hipotensor quando microinjetada no NTS (Kubo & Misu, 1981). No entanto, as vias intracelulares responsáveis por tal efeito ainda não foram elucidadas.

Os receptores A₁ de adenosina pertencem à família dos receptores acoplados a proteína G (GPCRs), especificamente Gi/o (Freissmuth *et al.*, 1991; Munshi *et al.*, 1991). Foi demonstrado que a ativação dos receptores A₁ de adenosina leva a uma inibição da enzima adenilato ciclase (AC) a qual promove uma diminuição nos níveis do segundo mensageiro AMPc (Londos *et al.*, 1980; van Calker *et al.*, 1978; van Calker *et al.*, 1979). Outras vias também foram descritas para os receptores A₁ de adenosina como, por exemplo, a via da fosfolipase C, no entanto, parecem ser vias não muito usuais.

Os efeitos promovidos por qualquer receptor, alterando a função de outro é conhecida na literatura como conversa cruzada entre receptores (em inglês “Cross talk”).

A interação entre receptores tem sido extensivamente estudada incluindo a interação dos receptores A_{2A} com os receptores dopaminérgicos D₂ a qual pode trazer novas perspectivas para as doenças mentais como Parkinson, Huntington e Esquizofrenia (Ferre, 1997; Richardson, 1997). Os efeitos excitatórios provocados pela ativação dos receptores A_{2A} na liberação da acetilcolina em terminais nervosos podem ser de grande importância para o tratamento de doenças como a síndrome miastênica no sistema nervoso periférico e Alzheimer no SNC (Sebastiao & Ribeiro, 1996).

Os receptores A₁ de adenosina têm sido especialmente reportados em modular os receptores alpha₂-adrenérgicos no hipocampo, medula e tronco encefálico (Allgaier *et al.*, 1991; Carrettiero *et al.*, 2008a; Gomes *et al.*, 1999). Ambos os tipos de receptores são abundantes no NTS e a ativação destes promove alterações cardiovasculares (Barraco *et al.*, 1987; Barraco *et al.*, 1988; Unnerstall *et al.*, 1984). O sistema noradrenérgico é bem caracterizado no NTS (Kubo & Misu, 1981; Kubo & Su, 1983) e

a estimulação dos receptores alfa₂-adrenérgicos dentro deste núcleo promove uma resposta depressora (De Jong, 1974).

Neste sentido, considerando a hipótese que os receptores A1 de adenosina estariam aumentando a ligação dos receptores alfa₂-adrenérgicos dentro de áreas específicas do NTS (Carrettiero *et al.*, 2008a) seria de grande interesse desvendar as vias intracelulares responsáveis por tal efeito, as quais podem ser relevantes para o entendimento do controle neural cardiovascular.

Sendo assim, o objetivo do presente trabalho é avaliar as vias intracelulares responsáveis pela ação modulatória dos receptores A1 de adenosina sobre os receptores alfa₂-adrenérgicos em culturas de células da porção dorsomedial do tronco encefálico.

Materiais e Métodos

Animais

Ratos Wistar (WR) com 2 dias de idade (P2) do Instituto Butantã (São Paulo, Brasil) foram utilizados para a cultura neuronal da porção dorsomedial do tronco encefálico. Os ratos adultos foram mantidos em caixas individuais, recebendo alimento e água *ad libitum*, em ambientes com umidade controlada, sob ciclos regulares de claro-escuro (das 7:00h às 19:00h). Todos os procedimentos estavam de acordo com as instruções internacionais para experimentação animal.

Cultura neuronal do tronco encefálico

O protocolo da cultura neuronal do tronco encefálico foi modificado de Kivell e colaboradores (2001). Aproximadamente 12 ratos com idade de 2 dias foram sacrificados por decaptação e seus encéfalos rapidamente retirados da caixa craniana e colocados em uma placa de petri contendo tampão gelado, pH 7.4 (NaCl 120mM, KCl

5mM, KH_2PO_4 1.2mM, MgSO_4 1.2mM, NaHCO_3 25mM e albumina 0.3%). O cerebelo, as meninges e os vasos sanguíneos foram cuidadosamente removidos e a área contendo o NTS (porção dorso-medial do tronco encefálico), foi dissecada, cortada em cubos de 2mm^2 e transferida para um tubo falcon contendo a mesma solução utilizada anteriormente. Estes procedimentos foram realizados com a utilização de um microscópio de dissecação (D.F.Vasconcellos, modelo MC-M903). Foi, então, adicionada tripsina (0.05%) à solução contendo o tecido, seguida de incubação de 30min a 37°C sob agitação. Após 30min, foi adicionado inibidor de tripsina (0.006%). As peças foram deixadas decantar por 5 min, e o sobrenadante retirado. O decantado foi resuspendido em solução gelada contendo 10% de soro fetal bovino (SFB). O tecido foi, então, mecanicamente dissociado utilizando uma pipeta Pasteur longa. A trituração foi caracterizada por repetidas sucções do tecido por aproximadamente 10 vezes. O tecido foi deixado decantar por 5 min e o sobrenadante retirado e separado. Este procedimento foi repetido 3 vezes com o decantado. Os três sobrenadantes foram combinados e centrifugados a 300 X g por 5 min. O precipitado de células foi resuspendido em meio de crescimento NeurobasalTM (Gibco) contendo 2% de suplemento B27 (Gibco), 0,25mM L-glutamina (Sigma), 0,25mM Glutamax (Gibco) e gentamicina (40mg/l, Gibco). A porcentagem de células viáveis foi determinada pelo método de exclusão por trypan blue. As células foram, então, plaqueadas, em placa de 12 poços previamente tratada com poli-D-lisina (Sigma), na concentração de $1800\text{cél}/\text{mm}^2$ e deixadas em uma estufa de CO_2 5% a 37°C por aproximadamente 7 dias. Neste período, o meio de crescimento foi trocado 50% a cada 2 dias (mais detalhes para cultura de tronco encefálico ver Kivell e colaboradores (2001)). A caracterização da cultura quanto à porcentagem de células neuronais e gliais foi realizada através da técnica de imunohistoquímica (Kivell *et al.*, 2001) utilizando-se anticorpos primários que detectam

proteínas associadas a microtúbulos (MAP2) em neurônios e a proteína glial fibrilar ácida (GFAP) nas células gliais. Culturas de 7 dias foram as que apresentaram maior proporção neuronal.

Experimento de ligação.

O efeito modulatório de 8 diferentes concentrações de CPA (10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} e 10^{-11} M) (Sigma), um agonista dos receptores A1 de adenosina, sobre a ligação de [3 H]RX821002 (atividade específica, 62 Ci/mmol, Amersham), um antagonista dos receptores alfa₂-adrenérgicos, foi avaliado utilizando-se culturas neuronais da porção dorsomedial do tronco encefálico através de experimentos de ligação. 3nM de [3 H]RX821002, uma concentração previamente obtida perto dos valores de B_{max}, foi utilizada no presente experimento.

A cultura neuronal foi lavada (3X5min) com solução Krebs Ringer com bicarbonato de cálcio (KRGB), pH 7.4 (NaCl 120mM, KCl 5mM, CaCl₂ 2.5mM, KH₂PO₄ 1.2mM, MgSO₄ 1.2mM, NaHCO₃ 25mM e Glicose 13mM) contendo 0.2U/ml de adenosina deaminase (ADA)(Sigma) à temperatura ambiente para remover adenosina endógena. Seguindo, as células foram incubadas com a mesma solução com diferentes concentrações de CPA (de 10^{-4} a 10^{-11} M) por mais 15 min a 4°C. O ligante [3 H]RX821002 foi, então, adicionado (3nM) e as células foram incubadas por 1h a 4°C. 10μM de fentolamina (Sigma), um antagonista dos receptores alfa₂-adrenérgicos foi utilizado para a ligação não específica. 300nM de DPCPX (Sigma), um antagonista dos receptores A1 de adenosina, foi adicionado 15min antes de CPA com o objetivo de bloquear o efeito modulatório provocado pelo CPA sobre a ligação de [3 H]RX821002. O solvente utilizado para o antagonista DPCPX foi o etanol. O efeito do etanol foi

também avaliado como controle experimental. O etanol não foi capaz de promover efeitos sobre a ligação de [^3H]RX821002 na concentração utilizada.

Estes procedimentos foram realizados para avaliar o efeito modulatório do CPA sobre a ligação de [^3H]RX821002. A seguir, foram avaliados os efeitos de diferentes inibidores intracelulares e quelantes na ação modulatório dos receptores A1 de adenosina sobre os receptores alfa₂-adrenérgicos.

Todos os inibidores e quelantes utilizados [SQ22536, um inibidor da adenilato ciclase (AC) (10^{-5} , BioMol); U-73122, um inibidor da fosfolipase C (PLC) (10uM, BioMol); Xestospongina C, um inibidor dos receptores de IP3 (10^{-6} , BioMol); Ro318220, um inibidor da proteína quinase Ca^{2+} - dependente (PKC) (10^{-5} , Calbiochem); BAPTA, um quelante de cálcio intracelular (Invitrogen) e EGTA, um quelante de cálcio extracelular (Invitrogen)] foram adicionados 15min antes da incubação de CPA com o objetivo de estudar as vias intracelulares envolvidas na ação modulatória do CPA sobre a ligação de [^3H]RX821002. DMSO foi utilizado como solvente de todas as substâncias utilizadas. O efeito do DMSO também foi avaliado como controle experimental. DMSO não foi capaz de promover qualquer efeito sobre a ligação de [^3H]RX821002.

Após a incubação, as células foram lavadas com a mesma solução gelada KRGB (3X3min), resuspendidas em água destilada deionizada gelada (4 °C) e imersas em líquido de cintilação (Ecolume, ICN Biomedicals, CO, USA). A radioatividade foi então contada (Packard TriCarb 2100TR, Downers Grove Illinois, USA). A concentração da proteína foi determinada pelo método de Bradford (1976) e o resultado foi expresso em fmol/mg de proteína.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o teste ANOVA seguido do pós-teste de Dunnett (tratamento *vs* controle). A estatística foi realizada utilizando-se do programa GRAPHPAD (Software intuitivo para Ciência, San Diego, CA, USA). Os valores estão representados como média $\pm$ Erro Padrão da Média (E.P.M), *P<0.05, n=4.

Resultados

O efeito modulatório dos receptores A1 de adenosina sobre a ligação dos receptores alfa₂-adrenérgicos foi avaliado utilizando-se culturas neuronais da porção dorsomedial do tronco encefálico de ratos Wistar (WR). As vias intracelulares envolvidas neste efeito modulatório foram analisadas utilizando-se de diversos inibidores e quelantes intracelulares.

Efeito modulatório dos receptores A1 de adenosina sobre os receptores alfa₂-adrenérgicos: 10⁻⁵M de CPA, um agonista dos receptores A1 de adenosina, provocou um aumento na ligação de [³H]RX821002, um antagonista radioativo para os receptores alfa₂-adrenérgicos, em cultura neuronal proveniente da porção dorsomedial do tronco encefálico de ratos Wistar (WR) (Fig. 1A). 300nM de DPCPX, um antagonista dos receptores A1 de adenosina bloqueou completamente o efeito modulatório do CPA sobre a ligação de [³H]RX821002 (Fig. 1B). Com o objetivo de analisar as vias intracelulares envolvidas neste efeito modulatório nós utilizamos diversos inibidores e dois tipos diferentes de quelantes de cálcio. SQ22536, um inibidor de adenilato ciclase (AC) não foi capaz de bloquear a ação modulatória do CPA sobre a ligação de [³H]RX821002 (Fig. 2A). Por outro lado, U-73122, um inibidor da fosfolipase C (PLC)

Figura 1. Legenda ao lado.

Figura 2. Legenda ao lado.

foi eficiente em bloquear o efeito de CPA sobre os receptores alfa₂-adrenérgicos (Fig. 2A). Ro318220, um inibidor de PKC, Xestospongina C, um inibidor dos receptores de IP₃ e BAPTA, um quelante de cálcio intracelular, também foram capazes de inibir o efeito modulatório dos receptores A₁ de adenosina sobre a ligação dos receptores alfa₂-

adrenérgicos (Fig. 2B). EGTA, um quelante de cálcio extracelular, não foi capaz de bloquear o efeito modulatório promovido pelo CPA sobre a ligação de [³H]RX821002 (Fig. 2B).

Discussão

Sabe-se que a ativação dos receptores A1 de adenosina dentro do NTS provoca uma resposta pressora (Barraco *et al.*, 1991; Barraco *et al.*, 1988; Mosqueda-Garcia *et al.*, 1991). Embora esta resposta pressora prevaleça na grande maioria dos casos, também foram observadas respostas bifásicas ou depressoras (Scislo & O'Leary, 2002; White *et al.*, 1996).

Estudos anteriores de nosso laboratório (Carrettiero *et al.*, 2008a) sugerem que estas respostas, aparentemente contraditórias, promovidas pela ativação dos receptores A1 de adenosina, possam estar relacionadas com uma ação modulatória específica destes receptores sobre os receptores alfa₂-adrenérgicos dentro do NTS. No entanto, pouco se sabe sobre os mecanismos responsáveis por tal modulação. Neste contexto, o presente estudo demonstra, pela primeira vez, que os receptores A1 de adenosina modulam os receptores alfa₂-adrenérgicos através de fosfolipase C, uma via não muito usual para estes receptores.

A ativação dos receptores A1 de adenosina, em uma dose específica de CPA 10⁻⁵M foi efetiva em produzir uma alteração significativa na ligação dos receptores alfa₂-adrenérgicos (Fig. 1). Este resultado concorda com estudos prévios de nosso grupo (Carrettiero *et al.*, 2008a). Este efeito promovido pelo CPA desaparece com concentrações mais altas ou mais baixas, provavelmente devido a um fenômeno de dessensibilização, depleção de um fator necessário para a interação ou até mesmo alteração conformacional dose-dependente. Este tipo de curva dose-resposta em forma

de U invertido tem sido observada em outros sistemas como, por exemplo, a interação entre os receptores neurotensina/neuropeptídeo Y, angiotensina II/alfa₂-adrenérgico, bradicinina/alfa₂-adrenérgico (Fior & Fuxe, 1995; Fior *et al.*, 1995; Fior *et al.*, 1994; Von Euler & Fuxe, 1987; Von Euler *et al.*, 1989; Yamada *et al.*, 1984; Yang *et al.*, 1994). A conversa cruzada entre os receptores de adenosina e outros receptores também foram reportadas: adenosina A_{2A}/dopamina D₂, adenosina A₁/adenosina A₂ e adenosina A₁/dopamina D₁ (Franco *et al.*, 2007; Fuxe *et al.*, 2005).

Sabe-se que a ativação dos receptores A₁ de adenosina inibe a enzima adenilato ciclase (AC) promovendo uma diminuição nos níveis do segundo mensageiro AMPc (Londos *et al.*, 1980; van Calker *et al.*, 1978). Considerando o papel modulatório do CPA sobre a ligação dos receptores alfa₂-adrenérgicos, nós esperaríamos encontrar evidências de uma modulação dependente de AC. Surpreendentemente, encontramos uma modulação dependente de fosfolipase C (PLC). U73122, um inibidor de fosfolipase C foi capaz de inibir o efeito modulatório dos receptores A₁ de adenosina sobre a ligação dos receptores alfa₂-adrenérgicos (Fig. 2A)

Crescentes evidências têm sugerido que a adenosina pode ser capaz de uma sinalização dupla. Inibição da AC e uma concomitante estimulação da fosfolipase C (Gudermann *et al.*, 1997a; Gudermann *et al.*, 1996; Gudermann *et al.*, 1997b). Por exemplo, em células lisas da musculatura e em astrócitos, a ativação dos receptores A₁ de adenosina promovem este tipo de sinalização (Biber *et al.*, 1997; Gerwins & Fredholm, 1992a; Gerwins & Fredholm, 1992b). No entanto, ainda se desconhecem os mecanismos exatos e as funções deste processo.

Uma das grandes descobertas do presente trabalho foi que Ro318220, um inibidor de PKC, Xestospongina C, um inibidor dos receptores de IP₃ e BAPTA, um quelante de cálcio intracelular, foram capazes de inibir o efeito modulatório dos receptores A₁ de

adenosina sobre a ligação dos receptores alfa₂-adrenérgicos (Fig. 2B). Sabendo que a ativação da fosfolipase C leva a uma ativação da proteína quinase C (PKC) através da mobilização de cálcio intracelular dependente de IP3 (Berridge, 1998; Nishizuka, 1992) nossos dados parecem estar de acordo com a literatura.

Este tipo de sinalização dupla não canônica apresentada pelos receptores A1 de adenosina levanta algumas questões importantes dentro da área da fisiologia celular como, por exemplo, o questionamento sobre a função deste mecanismo. Uma via de sinalização pode ser ativada em uma situação particular modificando, assim, a resposta celular a uma dada substância com o objetivo de manter o equilíbrio celular e corporal. Estas questões infelizmente ainda permanecem relativamente inexploradas.

Atualmente, considerando que as redes de sinalização intracelular estão se mostrando incrivelmente complicadas e detalhadas (Bhalla & Iyengar, 1999; Dumont *et al.*, 2001; Neves & Iyengar, 2002; Neves *et al.*, 2002), a sinalização de um modo geral está sendo descrita em termos de grandes sistemas. A sinalização provocada pela adenosina não é exceção dentro deste contexto (Klinger *et al.*, 2002). Além disso, existem crescentes evidências que a ativação de receptores acoplados à proteína G (GPCR) não seguem o clássico paradigma de uma sinalização linear e sequencial. Muito pelo contrário, a propagação do sinal modula diversas outras vias específicas incluindo conversas cruzadas entre diferentes receptores (Hur & Kim, 2002). Estes conceitos estão surgindo na literatura juntamente com o conceito de complexos protéicos de sinalização e microdomínios altamente compartimentalizados os quais permitem uma transdução de sinal altamente complexa, a qual resulta em uma complicada cascata de eventos, levando muitas vezes a respostas imprevisíveis (Hur & Kim, 2002).

Sabe-se que os receptores A1 de adenosina estão distribuídos de uma maneira heterogênea dentro do NTS (Carrettiero & Fior-Chadi, 2004; Carrettiero & Fior-Chadi,

2008; Scislo *et al.*, 2001). Segundo Scislo e O'Leary (2001) este fato pode ser responsável por mediar respostas cardiovasculares distintas em ratos. No entanto, fica difícil explicar com uma simples distribuição heterogênea, as respostas pressoras, bifásicas ou depressoras desencadeadas pela ativação dos receptores A1 de adenosina dentro do NTS (Scislo & O'Leary, 2002).

Biber e colaboradores propuseram em 1997 que a variação nos níveis de expressão dos receptores A1 de adenosina pode ser um importante mecanismo regulatório que levaria à ativação da via dependente de fosfolipase C (Biber *et al.*, 1997). Esta hipótese parece interessante considerando a distribuição dos receptores A1 de adenosina e o papel modulatório desta dentro do NTS; poderia, por exemplo, explicar a modulação específica dos receptores A1 de adenosina sobre o sistema noradrenérgico em certos subnúcleos dentro do NTS de ratos (Carrettiero *et al.*, 2008a), assim como as respostas aparentemente contraditórias promovidas pela ativação dos receptores A1 dentro do NTS (Scislo & O'Leary, 2002; White *et al.*, 1996). Neste contexto, os resultados observados poderiam sugerir a importância da ativação da via dependente de fosfolipase C dentro do NTS para o controle cardiovascular

Outro ponto interessante observado foi os resultados com os quelantes de cálcio intracelular e extracelular BAPTA e EGTA, respectivamente. BAPTA, e não EGTA, foi capaz de bloquear a resposta modulatória desencadeada pela ativação dos receptores A1 de adenosina sobre os receptores alfa₂-adrenérgicos. Estes resultados sugerem que os receptores A1 e alfa₂-adrenérgicos estão presentes no mesmo neurônio. Se os receptores alfa₂-adrenérgicos fossem modulados à distância pelos receptores A1 de adenosina, por exemplo, localizados em outro neurônio, EGTA também seria capaz de bloquear o efeito modulatório dos receptores A1 de adenosina sobre os receptores alfa₂-

adrenérgicos, considerando que a comunicação entre neurônios é extremamente dependente de cálcio extracelular.

Concluindo, nosso estudo demonstrou que os receptores A1 de adenosina modulam os receptores alfa₂-adrenérgicos através de uma via de sinalização não canônica dependente de fosfolipase C. Esta descoberta pode ser importante para o entendimento do papel da adenosina dentro do NTS sobre o controle cardiovascular. A organização das redes moleculares, como a interação entre receptores, indicam novas abordagens para o desenvolvimento de fármacos.

Agradecimentos

Estamos gratos ao suporte financeiro da FAPESP, do CNPq e da CAPES. D.C. Carrettiero é, atualmente, financiado pela CAPES.

CAPITULO III

Introdução “Alzheimer e BAG-2”

A doença de Alzheimer (AD), também conhecida como mal de Alzheimer é uma doença neurodegenerativa que destrói as células do cérebro lenta e progressivamente; é caracterizada por uma deterioração das faculdades cognitivas superiores, manifestando-se inicialmente por alterações da memória episódica. Estes déficits amnésicos agravam-se com a progressão da doença, e são posteriormente acompanhados por alterações visuo-espaciais e de linguagem; em fases avançadas, resultam em uma disfunção cognitiva global, muitas vezes levando o indivíduo a morte.

Basicamente, AD está associada à idade e é a patologia de maior prevalência entre todas as doenças relacionadas ao envelhecimento. Aproximadamente 5 a 10% da população acima de 65 anos desenvolve AD, chegando a 30% em indivíduos com 80 anos (Ritchie & Lovestone, 2002).

Geneticamente, AD é uma patologia complexa e heterogênea. Muitas doenças neurodegenerativas como a AD ocorrem esporadicamente pertencendo, assim, a uma das muitas na lista das doenças associadas à interação de fatores genéticos e ambientais. Casos familiares de AD, isto é, herdáveis, representam apenas 5% de todos os casos. Indivíduos dentro deste grupo podem desenvolver a patologia em fase precoce do desenvolvimento (Mayeux, 2006).

A base histopatológica da doença foi descrita pela primeira vez pelo neuropatologista alemão Alois Alzheimer em 1909, que verificou a existência tanto de placas senis no espaço extracelular do córtex cerebral e hipocampo, hoje identificadas como agregados contendo essencialmente a proteína beta-amilóide, A β (Selkoe, 2001), como de emaranhados neurofibrilares no espaço intracelular de neurônios piramidais do

córtex, hoje associados a agregados da proteína tau hiperfosforilada (Goedert & Crowther, 1989).

Outra característica marcante da doença é a perda progressiva de neurônios colinérgicos localizados essencialmente nos núcleos basais de Meinert, os quais inervam o hipocampo e o neocórtex (Davies & Maloney, 1976; Schliebs & Arendt, 2006). Esses núcleos apresentam neurodegeneração precoce quando comparados a outras áreas encefálicas, sugerindo a importância deste local para o desenvolvimento da doença de Alzheimer (Arendt *et al.*, 1983). A diminuição acentuada da inervação colinérgica origina a perda das faculdades cognitivas superiores (Morrison & Hof, 1997).

Embora a ciência tenha conseguido juntar um considerável número de dados dos processos bioquímicos relacionados ao desenvolvimento desta patologia, os mecanismos moleculares que causam a degeneração específica dos neurônios colinérgicos ainda permanecem desconhecidos.

Na última década, evidências têm sugerido uma interrelação entre neurotransmissão colinérgica, metabolismo da proteína precursora da beta amiloide (APP), acúmulo de beta amiloide (A β), agregados de tau altamente fosforilada, sinalização neurotrófica, glia, indução de citocinas pro-inflamatórias e estresse oxidativo (Nunomura *et al.*, 2001; Rojo *et al.*, 2008; Schliebs, 2005). Estas relações estão apresentadas no esquema da figura 1 onde estão representados os candidatos atuais dos componentes celulares que podem estar relacionados ao enfraquecimento da rede neural associada à patologia de Alzheimer. No entanto, as interrelações entre estes componentes bem como a origem exata que leva a neurodegeneração colinérgica ainda permanece obscura e incerta na literatura.

A presença de A β e de tau (figura 1, círculos verdes) parecem ter efeitos agudos e negativos sobre múltiplos aspectos da síntese e liberação de acetilcolina (ACh). A presença de A β parece induzir toxicidade em neurônios colinérgicos, possivelmente via

Neste trabalho enfocaremos os possíveis efeitos da proteína tau altamente fosforilada sobre a morte de neurônios colinérgicos.

74

Os agregados intracelulares presentes no encéfalo de pacientes com Alzheimer, como comentado inicialmente, constituem-se essencialmente da proteína Tau (proteína associada ao microtúbulo) altamente fosforilada (Goedert & Crowther, 1989). No entanto, sua acumulação não constitui característica fisiológica normal de células nervosas saudáveis. Por esse motivo, uma das vertentes da pesquisa científica na área procura entender os processos bioquímicos responsáveis pela eliminação desta proteína hiperfosforilada e seus efeitos sobre a morte de neurônios colinérgicos.

A decisão do destino de uma molécula de Tau dentro do ambiente celular depende, exclusivamente, de sua funcionalidade. Sabe-se que o grau de fosforilação da proteína Tau controla sua ligação aos microtúbulos, os quais se estabilizam na presença desta. Quando Tau está altamente fosforilada possui baixa afinidade pelos microtúbulos e é considerada tóxica para o ambiente intracelular (Shimura *et al.*, 2004).

Sabe-se que umas das principais características da não funcionalidade da proteína Tau é sua hiperfosforilação, a qual leva a formação de fibras poliméricas, que se unem de uma maneira ainda não conhecida. Estes agregados ou inclusões protéicas são extremamente resistentes ao processo de degradação celular.

Inclusões da proteína Tau, além de serem hiperfosforiladas, são ubiquitinadas. A presença destas inclusões ubiquitinadas sugere um defeito no processo de triagem e eliminação protéica intracelular, já que proteínas ubiquitinadas deveriam ser normalmente degradadas pelo sistema proteossômico.

Basicamente, o destino das proteínas dentro de uma célula saudável é decidido por uma série de moléculas intracelulares que podem redirecionar a proteína defeituosa para a maquinaria de destruição celular ou para a reestruturação. Este sistema é conhecido como “triagem inicial” e tem como objetivo selecionar as proteínas funcionais e eliminar as não funcionais.

O sistema de triagem intracelular utiliza um complexo protéico constituído basicamente por chaperonas. Estas proteínas trabalham em associação a co-chaperonas, as quais modulam a resposta celular. A co-chaperona BAG-2 parece ter importante função sobre este processo (Arndt *et al.*, 2005). No entanto, ainda não existem evidências da ação de BAG-2 sobre a triagem da proteína Tau.

Falhas neste processo podem levar a acumulação de proteínas tanto intracelularmente como extracelularmente, é o caso da proteína tau e da beta-amilóide no SNC de pacientes com a doença de Alzheimer. Esse acúmulo pode levar a morte neuronal e conseqüentemente a uma perda na transmissão da informação dentro do SNC. Embora existam diversos estudos, a causa direta da morte neuronal ainda permanece obscura na literatura científica.

Assim, o estudo de moléculas que possam ter um papel chave no processo de triagem, eliminação e degradação da proteína Tau, especificamente a isoforma hiperfosforilada, é de extrema importância para o desenvolvimento da ciência no ramo das doenças neurodegenerativas.

Neste contexto, o objetivo desta parte do presente trabalho é verificar se a co-chaperona BAG-2 esta envolvida no processo de triagem, degradação e eliminação da proteína Tau fosforilada associada à patologia de Alzheimer.

TRIAGEM DA PROTEÍNA TAU PELA CO-CHAPERONA BAG-2 SOBRE OS MICROTÚBULOS PREVINE FORMAÇÃO DE AGREGADOS FILAMENTOSOS

Daniel C. Carrettiero, Thales P. Papagiannakopoulos e Kenneth S. Kosik.

Department of Molecular, Cellular, and Developmental Biology
University of California Santa Barbara, CA 93106

(Artigo pronto para submissão)

Resumo: Agregados da proteína Tau são características patológicas marcantes presentes em diversas doenças neurodegenerativas incluindo a doença de Alzheimer. A presença destas inclusões sugere falhas nos mecanismos de degradação da proteína Tau. Os componentes do sistema de triagem desta proteína estão atualmente surgindo na literatura científica e consistem essencialmente de CHIP/Hsc70 e outras chaperonas e co-chaperonas. No entanto, os sítios de triagem e os elementos modulatórios deste processo ainda permanecem obscuros e inexplorados. Nós descobrimos um elegante mecanismo de degradação da proteína Tau envolvendo a co-chaperona BAG-2. BAG-2 se liga a CHIP inibindo sua atividade enzimática como ligase de ubiquitina impossibilitando a ubiquitinação da proteína Tau. Tau, ligada aos microtúbulos, recruta BAG-2. Esta associação favorece a degradação da proteína Tau através de um processo independente de ubiquitina e dependente do proteossomo 20S, uma via não canônica, aparentemente bem eficiente. BAG-2 atua especificamente em sítios onde a proteína Tau é fosforilada. Mais importante que isso, BAG-2 atua em fases anteriores à vulnerabilidade da proteína Tau em tornar-se uma proteína defeituosa com alto poder de formar agregados. Sob bloqueio do proteossomo 26S, Tau parece ser degradada por caspases. A atuação da co-chaperona BAG-2 representa um ponto crítico que leva à degradação da proteína Tau. A supressão da co-chaperona BAG-2 leva a um aumento de Tau fosforilada em neurônios e sua superexpressão, uma diminuição.

Abstract: Tau inclusions are a prominent feature of many neurodegenerative diseases including Alzheimer's disease. Their presence suggests a failure in Tau degradation. The components of a Tau protein triage system consisting of CHIP/Hsc70 and other chaperones and co-chaperones have begun to emerge. However, the site of triage and the master regulatory elements have not yet been described. We have discovered an elegant mechanism of Tau degradation involving the co-chaperone BAG-2. BAG-2 binds to CHIP inhibiting its activity as an ubiquitin ligase preventing Tau ubiquitination. Tau bound to the microtubule and recruits BAG-2 where it clears Tau through an ubiquitin-independent proteasome 20S dependent pathway. BAG-2 acts on Tau at precisely the site where it undergoes phosphorylation-dependent binding to the microtubule, more importantly, where it becomes vulnerable to misfolding and aggregation. Under conditions of proteasomal 26S blockade, Tau undergoes caspase mediated degradation. BAG-2 represents a critical point in clearing Tau that is prone to assembling into filaments. The suppression of BAG-2 leads to increased phosphorylated tau in neurons and its over-expression decreases phosphorylated tau.

Introdução

Inclusões e agregados protéicos intracelulares e extracelulares são características patológicas marcantes de muitas doenças neurodegenerativas incluindo a doença de Alzheimer. Nesta patologia estes agregados intracelulares constituem-se essencialmente da proteína Tau altamente fosforilada, a qual se associa a si mesma formando fibras poliméricas fortemente ligadas (Goedert & Crowther, 1989).

A identificação de mutações na proteína Tau na demência frontotemporal e parkinsonismo associado ao cromossomo 17 (FTDP-17) demonstrou claramente que uma disfunção em Tau pode causar neurodegeneração (Dumanchin *et al.*, 1998; Hutton *et al.*, 1998). O processo no qual esta proteína forma agregados ainda é desconhecida

pela literatura científica. Estes emaranhados fibrilares são altamente resistentes aos processos celulares normais de degradação.

Estas inclusões são marcadas tanto com cadeias de poli-ubiquitina (Cripps *et al.*, 2006) como de mono-ubiquitina (Ii *et al.*, 1997; Iqbal & Grundke-Iqbal, 1991; Mori *et al.*, 1987; Morishima-Kawashima *et al.*, 1993). A presença destas inclusões ubiquitinadas sugere defeitos na triagem, reciclagem e degradação da proteína Tau, já que proteínas ubiquitinadas deveriam ser normalmente degradadas pelas células através do proteossomo. Uma disfunção no sistema proteossomo-ubiquitina (UPS) tem sido reportada em muitas patologias neurológicas como Huntington, Parkinson, Alzheimer e Angelman (Bence *et al.*, 2001; Hope *et al.*, 2003; Kishino *et al.*, 1997; Kitada *et al.*, 1998; Leroy *et al.*, 1998; Snyder *et al.*, 2003).

A função básica da proteína Tau no interior das células é estabilizar os microtúbulos. Bendiske e colaboradores (2002) mostraram que esta desestabilização pode provocar queda acentuada no transporte axonal, perda sináptica e agregação de Tau sugerindo a importância da integridade dos microtúbulos para a fisiologia celular.

A decisão celular sobre o destino da molécula Tau depende, exclusivamente, de sua funcionalidade. Sabe-se que o grau de fosforilação da proteína Tau controla sua ligação aos microtúbulos. Tau altamente fosforilada tem baixa afinidade pelos microtúbulos e é considerada tóxica para o ambiente intracelular (Shimura *et al.*, 2004). Assim, esta proteína não funcional e tóxica tem de ser reparada ou sujeita a proteólise pelo sistema de degradação. Atualmente, o sítio de triagem da proteína Tau ainda é desconhecido. Em diversas patologias que envolvem a formação de agregados de Tau, após esta triagem inicial, que levará ao reparo ou à degradação, a célula tem de tomar uma decisão importante sobre sua sobrevivência em uma situação adversa devido aos agregados e/ou oligômeros tóxicos.

O sistema de triagem da proteína Tau utiliza um complexo protéico consistindo de uma chaperona com atividade de ligase de ubiquitina (E3) chamada CHIP (proteína que interage com o terminal carboxil da chaperona Hsp70) em conjunto com a chaperona Hsp70. Este complexo direciona a proteína Tau para a restauração ou para a eliminação através da maquinaria de degradação celular (Petrucelli *et al.*, 2004; Shimura *et al.*, 2004). Assim, o complexo CHIP/Hsp70 participa diretamente na decisão do destino de cada molécula de Tau. O acúmulo de proteínas Tau ubiquitinadas nas células pode ser causado por um bloqueio na degradação dependente de ubiquitina ou por um desvio inapropriado de uma via preferencial para uma via não preferencial como, por exemplo, a via independente de ubiquitina através da subunidade 20S do proteossomo (Elliott *et al.*, 2007). Diversas vias de degradação da proteína Tau independente de ubiquitina foram também descritas incluindo a degradação dependente de caspase, calpaínas (Berry *et al.*, 2003; Ding *et al.*, 2006; Gamblin *et al.*, 2003) e catepsinas (Litersky & Johnson, 1992).

A observação de que o complexo CHIP/Hsp70 é responsável pela ubiquitinação específica da proteína Tau fosforilada de pacientes com Alzheimer (Shimura *et al.*, 2004) sugere que a fosforilação seja o sinal para ao menos uma via de degradação dependente de ubiquitina. Superexpressão de Hsp70 reduz os níveis de Tau total e atenua a agregação de Tau sugerindo que o complexo CHIP/Hsp70 pode promover a degradação da proteína Tau (Petrucelli *et al.*, 2004). Outra evidência do envolvimento deste complexo na degradação de Tau é o fato de que a deleção do sítio de interação de CHIP com Hsp70 resulta na acumulação de Tau fosforilada solúvel (Dickey *et al.*, 2006). Baseando-se no fato que monômeros ou oligômeros de Tau fosforilada podem ser tóxicos para as células (Shimura *et al.*, 2004), a degradação promovida por CHIP/Hsp70 pode ser crucial para a manutenção da função celular. Evidências *in vivo*

corroboram a hipótese que superexpressão de CHIP atenua a agregação da proteína Tau (Sahara *et al.*, 2005). Outro fato interessante apresentado por diversos autores é que as chaperonas (HSPs) estão aumentadas no encéfalo de pacientes com Alzheimer, sugerindo uma disfunção deste processo (Hamos *et al.*, 1991; Perez *et al.*, 1991; Sahara *et al.*, 2005).

Membros da família BAG interagem com a chaperona Hsp70 através de seus sítios BAG, estimulando a degradação de clientes protéicos através da ligase de ubiquitina CHIP. No caso da co-chaperona BAG-1, a degradação do receptor para o hormônio glicocorticoide ocorre através da via dependente de ubiquitina e do proteossomo (Demand *et al.*, 2001). BAG-1 estimula CHIP, que liga ubiquitina ao receptor. Ubiquitina é o sinal para a associação receptor/proteossomo 26S, o qual é responsável pela degradação protéica. Assim, as proteínas BAG recrutam complexos de Hsc70/CHIP estimulando a degradação dos clientes das chaperonas pelo sistema proteossômico.

Ao contrário de BAG-1, BAG-2 é conhecida como um inibidor da ligase de ubiquitina CHIP (Arndt *et al.*, 2005). Esta co-chaperona também se associa ao sítio ATPásico da chaperona Hsc70 através de seu domínio BAG (Takayama *et al.*, 1999). Embora a literatura ainda não tenha descrito o papel da proteína BAG-2 sobre o destino de Tau, seu papel inibitório sobre a ligase de ubiquitina CHIP nos permite inferir que a perda da ubiquitinação impossibilitaria a degradação da proteína Tau pela via proteossômica dependente de ubiquitina. Desta maneira, a molécula BAG-2 poderia ter uma participação ativa no processo de triagem, reciclagem e degradação da proteína Tau.

Assim, o objetivo do presente trabalho é avaliar os efeitos da co-chaperona BAG-2 sobre os níveis da proteína Tau em células COS-7 e neurônios provenientes do

hipocampo de ratos. Este trabalho revela uma nova e altamente eficiente via de degradação da proteína Tau promovida pela co-chaperona BAG-2 através do proteossomo 20S, uma via independente de ubiquitina que opera nas proximidades do microtúbulo.

Materiais e Métodos

Anticorpos, reagentes e plasmídeos

Os seguintes anticorpos foram utilizados para os imunoblots e/ou imunofluorescência: anticorpo contra Tau-5 (1:1000, Biosource), o qual reconhece as formas fosforiladas e não fosforiladas da proteína Tau, foi utilizado como marcador para a Tau total. Os anticorpos utilizados contra Tau fosforilada incluem os anticorpos PHF-1, o qual reconhece os resíduos Ser-396 e SerS404 (1:500, providenciado pelo Professor Albert Davis, Einstein College of Medicine, Bronx); T181 (1:1000, Sigma) e S199/202 (1:1000, Sigma).

Os seguintes anticorpos foram utilizados como controles experimentais: flag (1:1000, Sigma), utilizado para reconhecer a proteína clonada BAG-2-flag; beta-actina (1:10.000, Sigma), utilizado para normalizar os valores na análise dos dados; e ubiquitina (1:1000, Abcam), utilizado para verificar a eficácia dos inibidores do proteossomo. Os controles da especificidade dos anticorpos foram realizados incubando-se o secundário sem a pré-incubação do primário.

Os inibidores MG132 (50 μ M) e Lactacistina (10 μ M) (Calbiochem, San Diego, CA) foram utilizados para bloquear o proteossomo 26S e a subunidade 20S, respectivamente. Estes complexos (26S e 20S) são os responsáveis por promover a degradação dependente e independente de ubiquitina, respectivamente (Delobel *et al.*, 2005). Z-VAD.FMK (Benzyloxycarbonyl-valinyl-alaninyl-aspartyl fluoromethyl

ketone) (20uM), foi utilizada para bloquear a ação das caspases. Estes inibidores foram diluídos em DMSO.

O cDNA das seqüências responsáveis pelas proteínas Tau (4R-humana), BAG-2-flag (camundongo) e CHIP (humano) foram clonados em vetores pEYFP-C1, pEGFP-C1, pDsRed2-C1 e pECFP-C1 (Clontech). A quantidade de vetor transfectada nas células foi sempre mantida constante num mesmo experimento. O vetor vazio foi utilizado para corrigir as quantidades de vetor trasfectado. A seqüência flag foi adicionada à seqüência BAG-2 já que não existe um anticorpo funcional para esta proteína. Foram realizados todos os testes para verificar se a seqüência flag ou a seqüência que origina a fluorescência influenciavam nos efeitos provocados pela proteína BAG-2 sobre os níveis de Tau. A seqüência do RNAi (RNA de interferência) foi obtida através de um algoritmo construído para escolher seqüência apropriadas de RNAi (Heale *et al.*, 2005) e clonada em um vetor “pSilencer™ 4.1-CMV puro” (Ambion) de acordo com o protocolo do fabricante. A construção do controle negativo do RNAi foi obtida alterando a seqüência original em dois nucleotídeos para que ela não fosse mais complementar ao RNAm de BAG-2. As seqüências sintetizadas de RNAi (shRNAi) contra o RNAm de BAG-2 foram: fita sense GCCGGACCCUCACGGUUGAgg e anti-sense UCAACCGUGAGGGUCCGGCcc.

Células COS-7, transfecções e western blot.

Células provenientes de rim de macaco, conhecidas como células COS-7, foram crescidas em meio DMEM (Dulbeco's Modified Eagle's Medium) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) contendo antibiótico (penicilina/streptomicina, Invitrogen) em uma incubadora com umidade e temperatura controladas (5% de CO₂,

37 °C). As células foram repicadas 3 vezes por semana e o meio trocado a cada dois dias.

Com o objetivo de super-expressar as proteínas Tau e BAG-2-flag (Fig 1A e B), as células COS-7 foram plaqueadas em placa contendo 6 poços e após 18h foram transfectadas com os vetores contendo o RNAi para BAG-2 ou o RNAi para BAG-2 controle negativo utilizando lipofectamina (Gibco BRL, Rockville, MD, USA). Estes procedimentos foram realizados de acordo com o protocolo do fabricante. Após 48h, as células foram, então, co-transfectadas com 2ug de vetor contendo a sequência para a proteína Tau e 2ug de vetor contendo a sequência para a proteína BAG-2-flag (na figura 1B, este procedimento foi realizado diretamente, sem a pré-transfecção com o RNAi após as 18h). 24h após este procedimento as células foram lisadas para imunoblot utilizando tampão Ripa [1% Triton X-100, 0.5% Sódio deoxicolato, 0.1%, dodecil sulfato de sódio (SDS), 150 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 7.4]. A concentração da proteína foi estimada utilizando o kit BCA (Pierce) e, então, ajustada para 1ug/ul. As proteínas foram separadas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Protran). A membrana foi, então, incubada em solução bloqueadora por 1h (1% PBS, 0.1% Tween 20, 5% de leite em pó), incubada novamente por mais 12h na mesma solução contendo os respectivos anticorpos primários, lavada com PBS + Tween (3X10min) e incubada mais uma vez em solução contendo os respectivos anticorpos secundários conjugados com peroxidase por 3h. Após terem sido lavadas em PBS + Tween (3X10min) as proteínas foram detectados e visualizadas através de quimioluminescência (Pierce, Rockford, IL, USA).

Co-imunoprecipitação

Para realizar a técnica de co-imunoprecipitação, as células COS-7 foram transfectadas com Tau ou Tau mais BAG-2-flag em placas de 6 poços. 24h mais tarde, as células foram lavadas em PBS gelado e lisadas com tampão para imunoprecipitação (150mM NaCl, 0.5% TritonX100, 50mM Tris Ph 7.5, 5mM EDTA, 1mM DTT, 1mM PMSF e coquetel de inibidores de protease). 1ml de lisado foi, então, incubado por 1h a 4°C com 25ul de proteína G (Sigma) para retirar ligações não-específicas, e centrifugado a 14,000 rpm. O sobrenadante foi retirado e incubado novamente com 5ug de anticorpo contra Tau-5 e 60ul de proteína G. Esta mistura foi deixada incubando com agitação por 24h a 4°C. As esferas de proteína G foram deixadas decantar por 5 min, lavadas por 3X com tampão para imunoprecipitação, resolvidas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e marcadas com um anticorpo contra ubiquitina. Este procedimento foi realizado para identificar as bandas relacionadas à proteína Tau ubiquitinada.

Inibidores e degradação da proteína Tau

Células COS-7 foram transfectadas com vetores contendo as seqüências para a proteína Tau ou Tau mais BAG-2-flag utilizando lipofectamina e tratadas com os inibidores Lactacistina, MG132 e Z-VAD após 2h por 24h. (Fig 2A). O procedimento realizado para a fig. 2B foi similar embora não tenha sido utilizado o vetor BAG-2-flag nem Z-VAD e os inibidores foram utilizados por 1, 6 e 24h. Na figura 2C foi utilizado somente o inibidor MG132 por 6h. Seguindo, as células foram lisadas, as proteínas resolvidas em gel de poliacrilamida e marcadas com anticorpos contra Tau total e Tau fosforilada.

Cultura neuronal do hipocampo, transfecções e Western blot.

Ratas grávidas Sprague Dawley de 18 dias (E18) foram sacrificadas por incubação com CO₂ e aproximadamente 12 embriões foram retirados e sacrificados por decapitação. Seus encéfalos foram rapidamente retirados da caixa craniana e colocados em uma placa de petri contendo tampão gelado sem cálcio e magnésio, pH 7.4 [Solução Salina Balanceada de Hanks (HBSS), HEPES 1M, pH 7.3, e Penicilina/Streptomicina]. O cerebelo, as meninges e os vasos sanguíneos foram cuidadosamente removidos e a área contendo o hipocampo, foi dissecada, cortada em cubos de 2mm² e transferida para um tubo falcon contendo a mesma solução utilizada anteriormente. Estes procedimentos foram realizados com a utilização de um microscópio de dissecação. Foi então, adicionado tripsina (0.05%) à solução contendo o tecido seguida de incubação de 15min a 37°C, sob agitação. Após o tecido ter sido lavado 2 vezes com HBSS, foi, então, mecanicamente dissociado utilizando uma pipeta Pasteur longa. A trituração foi caracterizada por repetidas sucções do tecido por aproximadamente 10 vezes. A porcentagem de células viáveis foi determinada pelo método de exclusão por trypan blue. As células foram, então, plaqueadas com meio glial (MEM, 20% glicose, piruvato, Penicilina/Streptomicina e 10% de soro de cavalo), em placa de 6 poços previamente tratada com poli-L-lisina (Sigma), na concentração de 250.000 e 90.000 células/poço para análise de Western blot (Fig. 3A) e imunofluorescência (Fig. 3B), respectivamente, e deixadas em estufa de CO₂ 5% a 37°C por aproximadamente 3h. Após este período, o meio foi retirado e trocado por meio Neurobasal suplementado com B27 e 0.5mM glutamina sem antibiótico. O meio de crescimento foi trocado 50% a cada 2 dias até a data do experimento (após 6 dias).

Com o objetivo de superexpressar as proteínas BAG-2-flag e observar seu efeito nos níveis de Tau endógena, 6 dias após o plaqueamento os neurônios foram

transfectados com os vetores contendo o RNAi para BAG-2 ou o RNAi para BAG-2 controle negativo utilizando lipofectamina (Gibco BRL, Rockville, MD, USA) (Fig 3A). Estes procedimentos foram realizados de acordo com o protocolo do fabricante. Após 48h, as células foram co-transfectadas com 1µg de vetor contendo a sequência para a proteína BAG-2-flag. O vetor vazio foi transfectado nos outros tratamentos como controle de transfecção. 24h após este procedimento as células foram lisadas para imunoblot exatamente como descrito anteriormente no final da seção “*Células COS-7, transfecções e Western blot*”. Estes experimentos tiveram como objetivo analisar os efeitos da superexpressão de BAG-2-flag e BAG-2 RNAi sobre os níveis de Tau fosforilada endógena (Fig. 3A)

Neurônios e Imunofluorescência

Com o objetivo de analisar os efeitos da superexpressão da proteína BAG-2-flag e BAG-2 RNAi sobre os níveis de Tau fosforilada endógena (Fig 3B), os vetores contendo as seqüências BAG-2 (pEGFP-C1), RNAi (BAG-2-RNAi + pEGFP-C1) e controle (BAG-2-RNAi controle negativo + pEGFP-C1) (Fig 3B) foram separadamente transfectados em neurônios de 6 dias plaqueados em placas de petri com fundo de vidro. 48h após a transfecção, os neurônios foram gentilmente lavados (3X1min) em meio aquecido MEM-H (MEM 1.423% com HEPES, NaHCO₃ 0.22%, pH 7.2) e fixados utilizando solução 4% de paraformaldeído (15min, 37°C). As células foram, então lavadas (3X1min) com PBS, permeabilizadas com 0.1% triton X-100 por 15 min, lavadas novamente em PBS (2X1min) e incubadas por 20min com solução para bloquear os sítios não específicos (MEM-H, 1% BSA, 10% soro de cavalo). Seguindo, os neurônios foram incubados com os anticorpos primários contra Tau fosforilada (PHF-1) em solução bloqueadora por 3h a temperatura ambiente, lavados (3X5min)

com PBS e incubados por mais 1h com o anticorpo secundário. Por fim, os neurônios foram lavados em PBS e visualizados em microscopia fluorescente (Nikon eclipse TE300). Todos os procedimentos após a transfecção com os vetores foram realizados no escuro para manter a fluorescência (vetores fluorescentes).

Em cada experimento (total de 3 experimentos, Fig. 3B), 100 neurônios transfectados e 100 neurônios não transfectados foram aleatoriamente escolhidos na mesma placa. Os valores de Densidade Óptica (D.O.) do axônio destes neurônios marcados positivamente para PHF-1 foram separados em quatro grupos dentro dos 200 neurônios analisados (100 transfectados, 100 não transfectados): neurônio transfectado com D.O. > 200, neurônio transfectado com D.O. < 200, neurônio não-transfectado com D.O. > 200, neurônio não-transfectado com D.O. < 200. A quantificação da densidade óptica foi realizada utilizando-se o software Metamorph e normalizada com o fundo da placa.

Microscopia eletrônica.

Com o objetivo de analisar os efeitos da supressão da proteína BAG-2 endógena sobre a formação de agregados filamentosos (Fig. 4) vetores contendo as seqüências para BAG-2 RNAi e BAG-2 RNAi controle negativo (controle) foram separadamente transfectados em neurônios de 6 dias plaqueados em placas de 6 poços. 48h após a transfecção, os neurônios foram gentilmente lavados (3X1min) e fixados em 1% de paraformaldeído e 1% de glutaraldeído, pH 7.3 por 1h a 37°C utilizando tampão fosfato de sódio 0.086M. Após terem sido lavadas (3X10min), as células foram fixadas novamente por mais 1h em tampão fosfato de mesma composição contendo Osmium (OsO_4), raspadas das placas e transferidas para eppendorfs onde foram deixadas

decantar por 10min. Após este período o sobrenadante foi retirado. Depois de diversas séries de desidratação ascendente com etanol (25%, 50%, 70%, 95%, 100%; 15 min cada) os neurônios foram embebidos em óxido de propileno 1:3, 1:2 e 1:1 (30min cada) antes de adicionar a resina de propileno. Depois de dois dias de polimerização a 65°C, os blocos contendo os neurônios foram seccionados em um micrótomo LKB V ultra. As secções foram subsequenteiramente marcadas com acetato de urânio e citrato de Reynold antes da visualização em microscópio eletrônico JEOL JEM-1230 TEM.

Células COS-7, transfecção e fluorescência

Com o objetivo de analisar a possível interação entre Tau, BAG-2 e CHIP (Fig. 5 e 6), os correspondentes vetores foram transfectados em células COS-7 de acordo com o protocolo do fabricante e visualizados após 24h em microscópio de fluorescência (Nikon eclipse TE300) utilizando os respectivos filtros para pEYFP-C1, pEGFP-C1, pDsRED2-C1 e pECFP-C1 (Clontech). Primeiramente, foi transfectado o vetor para expressar somente as proteínas BAG-2-flag (pEGFP-C1 ou pEYFP-C1), Tau (pDsRED2-C1) e CHIP (pECFP-C1) com o objetivo de visualizar o padrão de distribuição protéico em células vivas (Fig. 5a,b,c, 6a). Segundo, foi realizado uma co-transfecção de Tau (DsRed2-C1 ou pEYFP-C1) com a proteína BAG-2-flag (pEGFP-C1 ou pEYFP-C1) (Fig. 5d,e; 6 b,c,d,e). Terceiro, foi realizado uma co-transfecção de CHIP (pECFP-C1) com BAG-2-flag (pEGFP-C1) (Fig. 5f). As células foram plaqueadas em placa de petri com fundo de vidro. Todos os procedimentos após a transfecção foram realizados no escuro com o objetivo de manter a fluorescência.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando-se o teste ANOVA seguido do pós-teste de Dunnet (tratado vs. controle) ou seguida do pós-teste de comparações múltiplas de Tukey (Fig. 2A). O teste de Student também foi utilizado para comparar valores (dois valores entre si) (Fig. 1B). Todos os valores estão representados como média $\pm$ Erro Padrão da Média (E.P.M), ¥ * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, $n=3$. A estatística foi realizada utilizando o programa GRAPHPAD (Software intuitivo para Ciência, San Diego, CA, USA).

Resultados e Discussão

BAG-2 diminui os níveis de Tau fosforilada em células COS-7. Células COS-7 foram utilizadas com o objetivo de investigar os efeitos de BAG-2 sobre os níveis da proteína Tau fosforilada e não fosforilada exógena (Fig. 1A). A proteína Tau fosforilada foi detectada com os anticorpos PHF-1, T181 e S199/202. As isoformas fosforilada e não fosforilada da proteína Tau (Tau total) foram detectadas com o anticorpo Tau-5.

Transfecção de BAG-2-flag diminui drasticamente os níveis de Tau fosforilada exógena (Fig. 1A). As alterações nas marcações de PHF-1, T181 e S199/202 quando comparadas às alterações de Tau-5 na presença de BAG-2 sugerem que os efeitos predominantes de BAG-2 sejam basicamente em Tau fosforilada e não em Tau não-fosforilada. Os efeitos de BAG-2 nos níveis de Tau foram bloqueados pela presença do RNA de interferência contra o RNAm da proteína BAG-2 (Fig. 1A), sugerindo o efeito específico de BAG-2 sobre os níveis de Tau. A eficácia do RNAi foi confirmada pela ausência da banda flag na presença de BAG-2 (Fig. 1A), sugerindo mais uma vez a especificidade dos efeitos de BAG-2 sobre os níveis de Tau.

Baseando-se no fato que monômeros ou pequenos oligômeros de Tau fosforilada podem ser tóxicos para as células (Shimura *et al.*, 2004) e que estes podem induzir a formação de agregados intracelulares (Rankin *et al.*, 2007), a diminuição nos níveis de Tau fosforilada promovida pela co-chaperona BAG-2 poderia ser crucial para a manutenção da função celular. Assim, nossos resultados apontam a co-chaperona BAG-2 como uma interessante proteína alvo, com potencial farmacológico para a eliminação destas formas tóxicas. Arndt e colaboradores (2005) propuseram que BAG-2 teria uma função inibitória sobre a ligase de ubiquitina CHIP. A chaperona CHIP é responsável pela ubiquitinação específica da proteína Tau fosforilada de pacientes com Alzheimer promovendo sua degradação (Petrucelli *et al.*, 2004). Neste contexto, era de se esperar, com a superexpressão de BAG-2, um aumento nos níveis da proteína Tau, já que BAG-2 inibe CHIP, que por sua vez degrada Tau. Surpreendentemente, nós observamos uma drástica redução dos níveis de Tau na presença de BAG-2 (Fig. 1A).

Figura 1. Legenda ao lado.

Assim, o próximo passo foi verificar se a co-chaperona BAG-2 estava realmente atuando como um inibidor de CHIP através da inibição de formas ubiquitinadas da proteína Tau (proteína Tau ubiquitinada).

BAG-2 inibe ubiquitinação de Tau em células COS-7. Células COS-7 foram utilizadas com o objetivo de investigar os efeitos de BAG-2 sobre os níveis de Tau ubiquitinada exógena (Fig. 1B). Tau total foi detectada com o anticorpo Tau-5. Transfecção de BAG-2-flag diminuiu os níveis de Tau exógena (Fig 1B, blot à esquerda). O blot central, mesma membrana à esquerda, mas com maior tempo de exposição, apresentou uma marcação de alto peso molecular (120kD) (pontilhado vermelho). Esta banda foi posteriormente confirmada pela técnica de imunoprecipitação (blot à direita) como sendo Tau ubiquitinada. BAG-2-flag reduziu drasticamente Tau ubiquitinada (Fig 1B, seta vermelha). A redução da Tau ubiquitinada (gráfico de barras à direita da fig. 1B) foi significativamente maior que a da proteína Tau não ubiquitinada (gráfico de barras à esquerda da fig. 1B), corroborando o papel inibitório de BAG-2 sobre a ligase de ubiquitina CHIP (Arndt *et al.*, 2005). Assim, BAG-2 preveniria a ubiquitinação de Tau, bloqueando o reconhecimento desta pelo proteossomo 26S. O proteossomo 26S é conhecido por degradar proteínas de uma maneira ubiquitina-dependente (Arndt *et al.*, 2005). Se o processo de degradação da proteína Tau fosse dependente exclusivamente de CHIP e ubiquitina nós esperaríamos observar um aumento nos níveis de Tau na presença de BAG-2. No entanto, nós observamos uma diminuição nos níveis de Tau sugerindo que BAG-2 poderia estar favorecendo outra via de degradação independente de ubiquitina.

Um trabalho recentemente publicado na literatura científica mostrou que a superexpressão de BAG-1 induz um aumento nos níveis de Tau e sua supressão, uma

redução. Esta diminuição foi caracterizada por um aumento na degradação desta pelo proteossomo 20S (Elliott *et al.*, 2007). A subunidade 20S do proteossomo é conhecida por degradar proteínas de uma maneira independente de ubiquitina (Chen *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2007b). BAG-1 é conhecida por ter efeitos opostos a BAG-2. Assim, estes dados poderiam sugerir que a degradação de Tau na presença de BAG-2 poderia ser através do proteossomo 20S.

A banda de alto peso molecular correspondente a Tau ubiquitinada foi confirmada imunoprecipitando o lisado celular utilizando o anticorpo Tau-5 e marcando a membrana com ubiquitina (Fig. 1B). Uma banda de peso molecular exatamente igual ao apresentado pelo blot Tau-5 foi observada (120kD - blot central). Antes de ser encaminhada para a degradação, Tau é marcada covalentemente, tanto com cadeias de poli-ubiquitina (Cripps *et al.*, 2006) como de mono-ubiquitina (8kD) (Ii *et al.*, 1997; Iqbal & Grundke-Iqbal, 1991; Mori *et al.*, 1987; Morishima-Kawashima *et al.*, 1993). Desta forma, o peso molecular da proteína aumenta significativamente podendo facilmente dobrar ou triplicar.

BAG-2 promove degradação de Tau via proteossomo 20S em células COS-7. A via de degradação de Tau pode ser tanto ubiquitina-independente proteossomo-independente através de caspases, calpains e/ou catepsinas, como pode ainda ser direcionada para a subunidade 20S do proteossomo, sem a cadeia de ubiquitina (Chen *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2007b). Para solucionar a questão sobre qual destas vias estaria sendo a responsável pela degradação de Tau na presença de BAG-2, células expressando BAG-2 e Tau foram tratadas com os seguintes inibidores: MG132, inibidor da via proteossomo dependente ubiquitina-dependente, Lactacistina, um inibidor da via proteossomo dependente ubiquitina-independente (Delobel *et al.*, 2005) e Z-VAD, um

inibidor das caspases (Fig. 2A). Lactacistina foi capaz de inibir os efeitos de BAG-2 sobre os níveis de Tau fosforilada, embora não tenha tido efeito sobre os níveis de Tau total. Estes resultados corroboram com os dados previamente obtidos, os quais sugerem que BAG-2 estaria promovendo uma degradação específica das isoformas fosforiladas da proteína Tau. A remoção destas formas fosforiladas, as quais parecem ser tóxicas para o ambiente celular (Shimura *et al.*, 2004), é uma importante estratégia para o tratamento das doenças relacionadas com a formação de agregados (Dickey *et al.*, 2007). Por outro lado, MG132 e Z-VAD não foram capazes de inibir os efeitos de BAG-2 sobre os níveis de Tau. Além disso, MG132 reduziu ainda mais os níveis Tau. Os efeitos de MG132 sobre os níveis de Tau foram confirmados como sendo promovidos por caspases, já que Z-VAD foi capaz de inibir a diminuição dos níveis de Tau provocado por MG-132 (Fig. 2A). Outro ponto interessante é o fato que MG-132 promoveu o aparecimento de um padrão de bandas de degradação de Tau completamente diferente do padrão apresentado pelo controle (só Tau) ou com a presença de BAG-2 (Tau + BAG-2) (Fig 2C, setas vermelhas). Estes dados corroboram a afirmação que MG132 promove degradação de Tau através de caspases e que a degradação de Tau na presença de BAG-2 é independente de caspase. Neste contexto, os dados apontam BAG-2 como uma importante co-chaperona favorecendo a degradação de Tau através do proteossomo 20S de uma maneira ubiquitina-independente. Realmente a via de degradação utilizando a subunidade 20S do proteossomo foi reportada como sendo uma via ubiquitina-independente (Sheaff *et al.*, 2000; Touitou *et al.*, 2001).

Degradação pela via proteossomo 20S ubiquitina independente permite que proteínas defeituosas sejam eficientemente degradadas (Weinreb *et al.*, 1996). Exemplos de proteínas degradadas desta forma são o inibidor de quinases dependentes

de ciclina (CDK), p21^{cip1} (p21), fatores iniciantes de tradução eIF4G e eIF3a, e alfa-synuclein (alfa-syn) (Baugh & Pilipenko, 2004; Liu *et al.*, 2003; Sheaff *et al.*, 2000; Tofaris *et al.*, 2001). Evidências indicam que a proteína Tau pode também ser degradada por vias independentes de ubiquitina (Cardozo & Michaud, 2002; David *et al.*, 2002; Dickey *et al.*, 2006; Elliott *et al.*, 2007).

Em contraste com BAG-1, BAG-2 parece inibir a atividade da ligase de ubiquitina CHIP. A observação recente que supressão de BAG-1 favorece a degradação da Tau pela via ubiquitina independente 20S (Elliott *et al.*, 2007) sugere um efeito contrário na via de degradação promovido por BAG-2. Este efeito foi confirmado por nós, onde a superexpressão de BAG-2 promove a degradação de Tau pela via ubiquitina independente 20S. Assim, este contexto sugere que a proporção destas co-chaperonas no interior citoplasmático seja crucial para a regulação da degradação da proteína Tau.

Tau é degradada pela via proteossomo 26S na ausência de BAG-2 em células COS-7. Células COS-7 foram transfectadas com Tau e tratadas com inibidores específicos do proteossomo: Lactacistina, um inibidor do proteossomo 20S (via de degradação ubiquitina-independente) e MG132, um inibidor do proteossomo 26S (via de degradação ubiquitina-dependente) (Delobel *et al.*, 2005). Os anticorpos PHF-1, Tau-5, Ubiquitina e Beta-actina foram utilizados para as análises das amostras. MG132 e não lactacistina, após 1h de tratamento, provocou um aumento nos níveis de Tau, sugerindo que a via de degradação de Tau na ausência de BAG-2 seja via proteossomo ubiquitina dependente (26S). A eficácia do bloqueio do proteossomo está representada pelo aumento da ubiquitinação geral no blot marcado com a Ubiquitina (Fig. 2B, Ub). Esta via tem sido reportada como a via clássica responsável por degradar a proteína Tau. O tratamento com MG132 diferentemente de Lactacistina promoveu uma redução

drástica nos níveis de Tau fosforilada (PHF-1) e Tau não fosforilada (Tau-5) após 6h e 24h de tratamento, sugerindo a ativação de uma via de degradação independente do proteossomo. Este efeito foi confirmado como sendo caspase dependente (Fig 2A,C). Feuillet e colaboradores (2005) também reportaram uma redução nos níveis de Tau quando tratadas com MG132.

Figura 2. Legenda ao lado.

Além disso, Lactacistina não promoveu nenhuma alteração nos níveis de Tau durante o período de tratamento, sugerindo que a via 20S do proteossomo ubiquitina independente seja uma via extremamente dependente de BAG-2.

BAG-2 promove degradação de Tau em neurônios. Em neurônios, superexpressão de BAG-2 também diminui os níveis de Tau fosforilada (Fig. 3A,B). Em contraste aos dados apresentados com células COS-7, nos quais a diminuição nos níveis de Tau foi mais aparente na população de Tau fosforilada, em neurônios a diminuição das

populações Tau foforilada e Tau total foram similares (Fig. 3A). Esta diferença pode ter ocorrido devido ao fato de Tau fosforilada representar uma grande proporção de Tau total em neurônios. Estes resultados bioquímicos foram confirmados por imunofluorescência (Fig. 3B). Transfecção de BAG-2 pEGFP-C1 em neurônios (Fig. 3Bb) diminui o sinal de PHF-1 comparados com neurônios BAG-2 negativos (Fig. 3Ba) (Comparar setas brancas com setas amarelas). De 100 neurônios BAG-2 positivos analisados, 87% $\pm$ 11 apresentaram valores de densidade óptica (D.O.) abaixo de 200 e 13% $\pm$ 6 apresentaram D.O. acima de 200 (Fig. 3C). Por outro lado, neurônios BAG-2 pEGFP-C1 negativos na mesma placa apresentaram resultados opostos. 92% $\pm$ 6 dos neurônios apresentaram uma D.O. acima de 200 e 8% $\pm$ 5 abaixo de 200 (Fig. 3C). Foi utilizado o mesmo tipo de quantificação para o controle experimental.

Figura 3. Legenda ao lado.

O vetor vazio pEGFP-C1 (controle) não alterou a imunoreatividade de PHF-1 (Fig.3B,C). Estes dados confirmam o efeito de BAG-2 sobre os níveis de Tau citados anteriormente (Fig. 1A).

No entanto, estes resultados foram obtidos utilizando-se culturas primárias de neurônios do hipocampo de ratos, um sistema um pouco mais realístico por se tratar de células provenientes de áreas encefálicas afetadas em pacientes com Alzheimer.

Supressão de BAG-2 pode promover o estado anormal de Tau presente em pacientes com Alzheimer. Devido ao fato de que estudos utilizando superexpressão de proteínas exógenas podem ser altamente questionáveis, nós utilizamos um RNA de interferência (BAG-2 RNAi) com o objetivo de promover diminuição dos níveis de BAG-2 endógenos em neurônios. Este tratamento aumentou os níveis endógenos de Tau fosforilada através da marcação de PHF-1 em experimentos utilizando western blot (Fig. 3A). Os níveis aumentados da imunoreatividade ao PHF-1 foram confirmados utilizando a técnica de imunofluorescência (Fig. 3B). Neurônios co-transfectados com plasmídeos expressando o vetor puro pEGFP-C1 + BAG-2 RNAi (Fig. 3Bh) apresentaram um aumento na imunoreatividade ao PHF-1 (Fig. 3Bg) (comparar setas brancas com setas amarelas). De 100 neurônios analisados pEGFP-C1 positivos, $67\% \pm 10$ apresentaram D.O. acima de 200 e $33\% \pm 8$ apresentaram D.O. abaixo de 200 (Fig 3C). Por outro lado, neurônios pEGFP-C1 negativos na mesma placa apresentaram resultados opostos. $61\% \pm 10$ dos neurônios apresentaram uma D.O. acima de 200 e $39\% \pm 6$ abaixo de 200 (Fig. 3C). Superexpressão de pEGFP-C1 + controle negativo BAG-2 (controle), não promoveu alterações nos valores de densidade óptica da imunoreatividade de PHF-1, quando comparados a neurônios não transfectados na mesma placa (Fig. 3C- coluna do meio). Estes experimentos corroboram a idéia que a

degradação de Tau promovida por BAG-2 também é utilizada por neurônios do hipocampo de ratos.

O aumento nos níveis de Tau fosforilada utilizando os epítomos de PHF-1 (Fig. 3A e B) sugerem que os agregados de Tau poderiam ocorrer quando a síntese de BAG-2 é inibida em neurônios. Micrografia eletrônica de neurônios tratados com BAG-2 RNAi contém agregados filamentosos (Fig. 4). Este tipo de inclusão filamentosa não é observada no controle experimental. Estes filamentos são de 13 nm, o mesmo tamanho dos filamentos de Tau agregada encontrada em pacientes com Alzheimer (Kurt *et al.*, 1997). Assim, BAG-2 teria a importante função de limpar Tau fosforilada das células, as quais estariam sujeitas a formar inclusões filamentosas, característica histopatológica marcante da doença de Alzheimer.

Figura 4. Legenda ao lado.

Localização de BAG-2 mediando degradação de Tau. Células COS-7 foram transfectadas com BAG-2-pEGFP-C1 (Fig. 5a), Tau-pDsRED (Fig. 5b) ou pECFP-C1 (Fig. 5c). O padrão de distribuição protéica foi globular formando grandes agregados para a proteína BAG-2 (Fig. 5a), filamentosa para a proteína Tau (Fig. 5b) e difusa para a proteína CHIP (Fig. 5c). Note a presença de pequenos pontos de BAG-2 no núcleo da célula na figura 5a. Quando CHIP é co-transfectada com BAG-2 (Fig. 5f) os grandes

Figura 5. Legenda ao lado.

agregados de BAG-2 (Fig. 5a) transformam-se em padrão difuso, embora os pequenos pontos no núcleo permaneçam. Estes dados sugerem uma interação entre as proteínas CHIP e BAG-2 no espaço extracelular (Fig. 5f). Esta interação foi anteriormente sugerida por Arndt e colaboradores (2005), mostrando a ação inibitória de BAG-2 sobre a atividade de CHIP. Quando Tau é co-transfectada com BAG-2 (Fig. 5d1 e d2, mesmas células, filtros diferentes; d3 sobreposição de d1 e d2) os grandes agregados da proteína BAG-2 fluorescente (Fig. 5a) transformam-se em pequenos agregados (Fig. 5d1, e1, setas). Estes pequenos agregados interagem com a proteína Tau nos microtúbulos (e3, setas brancas, amarelo: sobreposição do verde com o vermelho). As imagens na figura 5e1, e2, e3 correspondem à ampliação das regiões nas imagens d1, d2, d3. A imagem g representa uma menor ampliação das células COS-7 transfectadas com BAG-2 pEGFP-C1 mostrando os grandes agregados citoplasmáticos. As imagens h, i representam controles experimentais: h mostra uma células transfectada com vetor pEGFP vazio, i representa a co-transfecção de pEGFP + BAG-2-pEGFP. Estes dados sugerem que o vetor por si só não promove a ruptura dos grandes agregados e sim a presença de Tau. Polimerização dos microtúbulos utilizando taxol (Fig. 5k) também não permite o recrutamento da proteína BAG-2, sugerindo que a desagregação de BAG-2 seja realmente originada pela proteína Tau.

A figura 6 tem objetivo similar ao da figura 5. No entanto, foram realizados devido à alta intensidade e maior poder de visualização das proteínas fluorescentes pEYFP (amarela). A transfecção de BAG-2 resulta num padrão globular de grandes agregados de proteínas fluorescentes (Fig. 6a). Este padrão é completamente alterado pela transfecção da proteína Tau pEYFP (Fig. 6b,c,d,e). A formação de pontos espaçados e irregulares da proteína BAG-2 (Fig. 6d, e, setas brancas) que se alinham

com os microtúbulos são observados (Fig. 5 d, e, setas vermelhas - d, e correspondem à região ampliada mostrada em vermelho no painel c da figura).

Figura 6. *Legenda ao lado.*

Os resultados da associação de BAG-2 e Tau em microtúbulos foi confirmada também em neurônios (Fig. 7). Superexpressão de BAG-2 pEGFP em cultura primária de neurônios do hipocampo também origina um padrão de pequenos agregados de BAG-2 (Fig. 7a,b,c). O sinal de BAG-2 se encontra tanto nos axônios e dendritos (Fig. 7a, maior intensidade de luz) como no corpo celular (Fig. 7c, menor intensidade de luz). Um ponto interessante que pode explicar o padrão de grandes agregados de BAG-2 em células COS-7 e pequenos agregados em neurônios na ausência de Tau exógena pode

Figura 7. *Legenda ao lado.*

ser devido ao fato que células COS-7 não possuem Tau endógena (observe a ausência da banda Tau nos blots da figura 1A na ausência de Tau exógena) enquanto neurônios possuem (observe a presença da banda Tau nos blots da fig. 3A na ausência de Tau exógena). Quando Tau-DsRED2 foi transfectado juntamente com BAG-2 pEGFP em

neurônios (Fig. 7d), o padrão de pequenos agregados da proteína BAG-2 (Fig. 7c) foi completamente alterado, transformando-se em uma distribuição filamentosa (Fig. 7d1) que co-localiza com a proteína Tau (Fig. 7d2). As imagens e,f mostram o padrão de distribuição da proteína BAG-2 pEGFP-C1 quando Tau é transfectada. Observe o padrão filamentoso da proteína BAG-2, diferentemente do observado na figura 7c.

O estado cinético fosforilado da proteína Tau controla a ligação desta aos microtúbulos e cria um estado vulnerável predispondo Tau a se auto-associar. Esta auto-associação forma os agregados que ao final podem levar o neurônio à morte. Assim, a melhor posição de decisão da triagem da proteína Tau é sobre os microtúbulos. Tau em associação com os microtúbulos pode atuar atraindo BAG-2. A redistribuição citológica da proteína BAG-2 na presença de outra proteína é uma característica também encontrada em outras moléculas da família BAG como, por exemplo, a da proteína BAG-1. Bcl-2 pode causar uma redistribuição de BAG-1 de um padrão citosólico difuso para um padrão pontuado localizado em organelas (Takayama *et al.*, 1998). BAG-2, muito provavelmente, atua no excesso de Tau sobre os microtúbulos. Excesso da proteína Tau nos microtúbulos pode ser considerado uma fonte de filamentos de Tau (Ackmann *et al.*, 2000; Lu & Kosik, 2001).

Conclusões

Inclusões e agregados protéicos são características patológicas marcantes de muitas doenças neurodegenerativas incluindo a doença de Alzheimer. A presença destas inclusões fosforiladas e ubiquitinadas sugere defeitos na triagem, reciclagem e degradação da proteína Tau pelo proteossomo 26S (ubiquitina dependente). Além disso, sabe-se que monômeros ou pequenos oligômeros de Tau fosforilada podem ser tóxicos

para o ambiente intracelular. Desta maneira, a isoforma fosforilada da proteína Tau tem importância fundamental para a vulnerabilidade celular na formação de agregados.

Nossos dados sugerem que a co-chaperona BAG-2 pode favorecer a degradação das isoformas fosforiladas da proteína Tau nos microtúbulos de neurônios provenientes do hipocampo pela subunidade 20S do proteossomo (Fig. 8). A subunidade 20S do proteossomo é conhecida por degradar proteínas de uma maneira ubiquitina-independente. Sabendo-se que a fosforilação de Tau diminui a afinidade desta pelos microtúbulos e que a isoforma fosforilada pode ser tóxica para a célula, a localização desta eficiente via de degradação sobre os microtúbulos pode ser de extrema importância para evitar o acúmulo de agregados, os quais podem ocorrer quando Tau se fosforila e se torna livre dos microtúbulos.

O proteossomo 26S parece ter importância significativa sobre a degradação da proteína Tau em certas condições como, por exemplo, na ausência de BAG-2. Quando esta via é bloqueada diretamente por inibidores da 26S, Tau parece se tornar um substrato para a ação das caspases. No entanto, a ativação da via das caspases representa uma estratégia perigosa para livrar as células de Tau fosforilada porque as caspases funcionam de uma forma que desliga vias protetoras e liga vias destrutivas, as quais podem levar a destruição celular com conseqüente morte. No entanto, quando a via 26S (dependente de ubiquitina) é bloqueada por BAG-2 (BAG-2 inibe CHIP e impossibilita a ubiquitinação de Tau com conseqüente bloqueio da via 26S) a degradação de Tau passa a ser promovida pelo proteossomo 20S de uma maneira aparentemente mais eficiente (Fig. 8). A via 26S parece permitir a agregação protéica, a qual poderia levar a morte neuronal.

Estes resultados sugerem a importante função da co-chaperona BAG-2 para os processos de degradação da proteína Tau. A desregulação dos níveis de BAG-2

endógeno poderia comprometer a degradação de Tau via 26S e induzir a célula a formação de agregados, uma decisão importante para se livrar dos efeitos tóxicos promovidos pelos monômeros ou pequenos oligômeros de Tau fosforilada, mas que ao final poderiam colaborar e/ou promover a destruição e morte celular.

Modelo

Figura 8. *Legenda ao lado.*

CAPÍTULO IV

Considerações e Conclusões Finais

Como descrito no capítulo I, o neurônio pode ser encarado como a unidade funcional fundamental do sistema nervoso. Estes, por sua vez, produzem, veiculam, integram e processam os sinais elétricos capazes de codificar todas as informações do ambiente corporal externo e interno (Lent, 2001; Purves *et al.*, 1996a). No entanto, os neurônios operam em grandes conjuntos, e não isoladamente. Estes conjuntos de neurônios formam os chamados circuitos ou redes neurais (Lent, 2001; Purves *et al.*, 1996b).

Sendo assim, o sistema nervoso pode ser caracterizado por um mosaico de redes neurais altamente organizadas as quais promovem o controle e a manutenção de nossas atividades vitais diárias. Existem diversas redes neurais responsáveis por tarefas específicas como, por exemplo, a auditiva, a dos sentidos químicos (olfatória, gustatória e outros sistemas de detecção química), a somestésica (tato, propriocepção, termossensibilidade e dor), a responsável pela motricidade corporal, memória, linguagem, respiração, controle da pressão arterial entre muitas outras.

A variabilidade genética humana origina redes neurais altamente fortalecidas devido a seus excelentes componentes celulares e moleculares que favorecem o seu correto funcionamento. No entanto, muitas vezes, a variabilidade genética origina redes neurais enfraquecidas as quais não necessariamente resultam na patologia em si mas podem predispor o indivíduo a uma maior sensibilidade aos fatores ambientais que, ao final, podem desencadear o aparecimento da patologia. Assim, estas patologias são resultantes de múltiplos fatores genéticos e não genéticos (ambientais) e são conhecidas como doenças multifatoriais (Lynn *et al.*, 1885).

Moléculas neuromodulatórias podem atuar fortalecendo estas redes neurais, colaborando com o controle de patologias. Neste contexto o objetivo geral deste trabalho foi estudar a ação de duas moléculas neuromodulatórias endógenas, a adenosina e a co-chaperona BAG-2, sobre redes neurais específicas associadas à hipertensão essencial e à doença de Alzheimer, contribuindo, assim, para o melhor entendimento, controle e prevenção destas patologias.

O primeiro artigo científico do presente trabalho (Capítulo II) demonstra que os receptores A1 de adenosina, além de estarem distribuídos de forma heterogênea dentro do núcleo do trato solitário (NTS) estão aumentados em ratos hipertensos quando comparados a ratos normotensos. Esta diferença parece preceder o desenvolvimento da hipertensão nestes animais (Carrettiero & Fior-Chadi, 2008). O segundo artigo científico (Capítulo II) descreve que os receptores A1 de adenosina são capazes de aumentar tanto o número como a afinidade dos receptores alfa₂-adrenérgicos dentro de núcleos específicos do NTS (Carrettiero *et al.*, 2008a). Esta ação modulatória é diferenciada em ratos hipertensos quando comparados a ratos normotensos, sugerindo uma importante alteração associada à hipertensão nestes animais. No terceiro artigo científico (Capítulo II) foi observado que a ação modulatória desencadeada pelos receptores A1 de adenosina sobre os receptores alfa₂-adrenérgicos é dependente de fosfolipase C (PLC) e parece, também, ser diferenciada em ratos hipertensos quando comparados a ratos normotensos (Carrettiero & Fior, 2008).

Neste contexto, os resultados destes três trabalhos sugeriram que a ativação dos receptores A1 de adenosina, em certas condições, poderia estar sensibilizando sistemas hipotensores dentro de subnúcleos específicos do NTS através dos receptores alfa₂-adrenérgicos utilizando fosfolipase C como mensageiro intracelular. Este mecanismo

poderia estar associado ao desenvolvimento da hipertensão essencial e poderia ser um importante alvo farmacológico para o controle da hipertensão essencial.

O Capítulo III analisou os possíveis efeitos da co-chaperona BAG-2 sobre a proteína Tau. Agregados de Tau são uma das características histopatológicas marcantes encontradas no encéfalo de pacientes com mal de Alzheimer. Foi demonstrado, no presente trabalho, um elegante mecanismo de degradação da proteína Tau fosforilada- uma isoforma considerada tóxica para o ambiente intracelular- através da co-chaperona BAG-2 (Carrettiero *et al.*, 2008b). Esta molécula tem a capacidade de inibir a atividade da chaperona CHIP, uma ligase de ubiquitina, impossibilitando a ubiquitinação e conseqüente degradação da proteína Tau pela via proteossomo ubiquitina-dependente. Foi observado que a proteína BAG-2 se associa fisicamente à proteína Tau, alterando a via de degradação ubiquitina-dependente para uma via não muito usual, ubiquitina-independente. A supressão da proteína BAG-2 pode levar a formação de agregados filamentosos, sugerindo que o efeito modulatório da proteína BAG-2 poderia favorecer a remoção dos agregados intracelulares encontrados em pacientes com a doença de Alzheimer.

Assim, este trabalho sugeriu que BAG-2 poderia ser um importante alvo farmacológico para o tratamento do mal de Alzheimer favorecendo a degradação seletiva de proteínas consideradas tóxicas (Tau hiperfosforilada).

É importante ressaltar neste momento que de maneira nenhuma estamos encarando estas moléculas neuromodulatórias como a solução determinística para estas patologias. Estamos somente sugerindo que os efeitos da adenosina e da co-chaperona BAG-2 poderiam ser benéficos para o contexto geral das patologias relacionadas à hipertensão e ao mal de Alzheimer, respectivamente, colaborando, para o fortalecimento das redes neurais associadas.

Por exemplo, para o mal de Alzheimer, muitas estratégias têm sido elaboradas para seu tratamento, incluindo um aumento da função colinérgica, diminuição da formação de beta amiloide, inibição de proteínas quinases associadas à fosforilação de Tau, diminuição da neuroinflamação entre muitas outras (Schmitt *et al.*, 2004). Assim, o aumento da atividade da co-chaperona BAG-2, também poderia ser uma estratégia importante, contribuindo para o tratamento da patologia de Alzheimer. Além disso, a remoção dos agregados intracelulares da proteína Tau pela BAG-2 em pacientes com esta patologia poderia solucionar uma das grandes questões envolvendo as doenças neurodegenerativas: estes agregados são causa ou consequência das patologias neurodegenerativas?

Outro ponto interessante no contexto geral do trabalho é o fato que as duas moléculas estudadas favorecem vias não canônicas, isto é, vias não convencionais para os processos em questão. Por exemplo, a modulação dos receptores alfa₂-adrenérgicos pelos receptores A1 de adenosina acontece via fosfolipase C (PLC), uma via não muito usual para os receptores A1 de adenosina (Carrettiero & Fior, 2008). No caso da co-chaperona BAG-2, podemos notar que a degradação da proteína Tau na presença desta molécula passa a ocorrer de uma forma independente de ubiquitina e dependente de proteossomo, uma via também não muito usual (Carrettiero *et al.*, 2008b). Estes resultados apontam a extrema plasticidade dos sistemas biológicos que ainda estão longe de serem desvendados por completo pela literatura científica.

Considerando a hipertensão essencial e o mal de Alzheimer como resultantes de múltiplos fatores genéticos e não genéticos (ambientais), estas patologias são consideradas doenças multifatoriais (Lynn *et al.*, 1885). Neste sentido, uma parte das pesquisas hoje em dia tenta encontrar os genes susceptíveis responsáveis diretamente pelo enfraquecimento das redes neurais associadas.

Estudos de associação entre polimorfismos e hipertensão foram realizados e muitos genes foram encontrados. Podemos citar a enzima conversora de angiotensina (ECA) (Hilbert *et al.*, 1991), β_2 -adrenérgicos (Li *et al.*, 2007a), interleucina-6, 10 e 12 (Timasheva *et al.*, 2008), ABCA1 e ROS1 (Yamada *et al.*, 2008), aldosterona (White *et al.*, 1999), renina (Mansego *et al.*, 2008), angiotensinogênio (Basarici & Suleymanlar, 2007), NOS (Huang *et al.*, 1995) e muitos outros.

Um número considerável de genes que conferem susceptibilidade ao mal de Alzheimer também foram descritos. Estes genes parecem estar relacionados, basicamente, à formação de agregados, estresse oxidativo e resposta inflamatória. Por exemplo, podemos citar, para a formação de agregados, a proteína precursora de beta amiloide (APP) (Goate *et al.*, 1991), preselinina (PS1 e PS2) (Combarros *et al.*, 1999), apolipoproteína E (APOE) (Poirier *et al.*, 1993), cistatina C (Palsdottir *et al.*, 1989), ubiquitina 1 (Xue & Jia, 2006), alfa2-macroglobulina (Blacker *et al.*, 1998); para estresse oxidativo, a óxido nítrico sintase (NOS2, NOS3) (Singleton *et al.*, 2001); e para resposta inflamatória, IL-1 alfa (Nicoll *et al.*, 2000), IL-1 beta, IL-6 (Ravaglia *et al.*, 2006) e TNF alfa (Alvarez *et al.*, 2002).

No entanto, nenhum destes genes, incluindo os descritos para a hipertensão essencial ou para o mal de Alzheimer, parecem estar relacionados diretamente ao desenvolvimento da doença em humanos. Assim, podemos perceber que a alta complexidade das variações genéticas envolvidas, tanto no aparecimento da hipertensão essencial como na patologia do mal de Alzheimer, sugerem que estas patologias possam estar relacionadas ao enfraquecimento gênico variável de diversos componentes específicos que poderiam aumentar a sensibilidade do indivíduo a variações ambientais que, ao final, poderiam resultar no aparecimento destas patologias. Estes componentes estão pouco a pouco surgindo na literatura. Futuramente, quando estes componentes já

estiverem esclarecidos e suas relações com o aparecimento das patologias estiverem desvendadas, será fácil fortalecer os sistemas com fármacos ou evitar variações ambientais específicas.

Por enquanto, a ação conjunta de diferentes substâncias que atuem em diversos componentes dentro do sistema, favorecendo uma diminuição da pressão arterial ou favorecendo a sobrevivência neuronal, poderiam ser benéficas para as patologias como a hipertensão essencial ou o mal de Alzheimer. Estas substâncias resultariam em um fortalecimento dos sistemas, diminuindo, assim, a susceptibilidade dos indivíduos a desenvolver tais patologias.

Neste sentido, o presente trabalho sugere que os efeitos da adenosina e da co-chaperona BAG-2, poderiam ser alvos farmacológicos interessantes para o contexto geral das patologias relacionadas à hipertensão e ao mal de Alzheimer, respectivamente, que em conjunto com outras substâncias, poderiam colaborar para o fortalecimento de redes neurais geneticamente enfraquecidas, as quais predispõem os indivíduos a desenvolver tais patologias. No entanto, são necessários estudos mais aprofundados *in vivo* para confirmar o real efeito destas moléculas.

BIBLIOGRAFIA GERAL

- Ackmann M., Wiech H. & Mandelkow E. (2000): Nonsaturable binding indicates clustering of tau on the microtubule surface in a paired helical filament-like conformation. *J Biol Chem* **275**, 30335-43.
- Aden U., Herlenius E., Tang L.Q. & Fredholm B.B. (2000): Maternal caffeine intake has minor effects on adenosine receptor ontogeny in the rat brain. *Pediatr Res* **48**, 177-83.
- Allgaier C., Greber R. & Hertting G. (1991): Studies on the interaction between presynaptic alpha 2-adrenoceptors and adenosine A1 receptors located on noradrenergic nerve terminals. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **344**, 187-92.
- Alvarez V., Mata I.F., Gonzalez P., Lahoz C.H., Martinez C., Pena J., Guisasola L.M. & Coto E. (2002): Association between the TNFalpha-308 A/G polymorphism and the onset-age of Alzheimer disease. *Am J Med Genet* **114**, 574-7.
- Amendt K., Czachurski J., Dembowski K. & Seller H. (1979): Bulbospinal projections to the intermediolateral cell column: a neuroanatomical study. *J Auton Nerv Syst* **1**, 103-7.
- Antunes V.R., Bonagamba L.G. & Machado B.H. (2005): Hemodynamic and respiratory responses to microinjection of ATP into the intermediate and caudal NTS of awake rats. *Brain Res* **1032**, 85-93.
- Arendt T., Bigl V., Arendt A. & Tennstedt A. (1983): Loss of neurons in the nucleus basalis of Meynert in Alzheimer's disease, paralysis agitans and Korsakoff's Disease. *Acta Neuropathol* **61**, 101-8.
- Arndt V., Daniel C., Nastainczyk W., Alberti S. & Hohfeld J. (2005): BAG-2 acts as an inhibitor of the chaperone-associated ubiquitin ligase CHIP. *Mol Biol Cell* **16**, 5891-900.
- Bahr V., Oelkers W. & Diederich S. (2003): [Monogenic hypertension]. *Med Klin (Munich)* **98**, 208-17.
- Barraco R.A., Campbell W.R., Schoener E.P., Shehin S.E. & Parizon M. (1987): Cardiovascular effects of microinjections of adenosine analogs into the fourth ventricle of rats. *Brain Res* **424**, 17-25.
- Barraco R.A., el-Ridi M.R., Ergene E. & Phillis J.W. (1991): Adenosine receptor subtypes in the brainstem mediate distinct cardiovascular response patterns. *Brain Res Bull* **26**, 59-84.
- Barraco R.A., Janusz C.J., Polasek P.M., Parizon M. & Roberts P.A. (1988): Cardiovascular effects of microinjection of adenosine into the nucleus tractus solitarius. *Brain Res Bull* **20**, 129-32.
- Barraco R.A., O'Leary D.S., Ergene E. & Scislo T.J. (1996): Activation of purinergic receptor subtypes in the nucleus tractus solitarius elicits specific regional vascular response patterns. *J Auton Nerv Syst* **59**, 113-24.
- Barraco R.A. & Phillis J.W. (1991): Subtypes of adenosine receptors in the brainstem mediate opposite blood pressure responses. *Neuropharmacology* **30**, 403-7.
- Basarici I. & Suleymanlar G. (2007): Angiotensinogen M235T gene polymorphism in essential hypertension/angiotensinogen M235T polymorphism and left

- ventricular indices in treated hypertensive patients with normal coronary arteries. *Anadolu Kardiyol Derg* **7**, 449; author reply 449-50.
- Baugh J.M. & Pilipenko E.V. (2004): 20S proteasome differentially alters translation of different mRNAs via the cleavage of eIF4F and eIF3. *Mol Cell* **16**, 575-86.
- Bence N.F., Sampat R.M. & Kopito R.R. (2001): Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation. *Science* **292**, 1552-5.
- Bendiske J., Caba E., Brown Q.B. & Bahr B.A. (2002): Intracellular deposition, microtubule destabilization, and transport failure: an "early" pathogenic cascade leading to synaptic decline. *J Neuropathol Exp Neurol* **61**, 640-50.
- Berridge M.J. (1998): Neuronal calcium signaling. *Neuron* **21**, 13-26.
- Berry R.W., Abraha A., Lagalwar S., LaPointe N., Gamblin T.C., Cryns V.L. & Binder L.I. (2003): Inhibition of tau polymerization by its carboxy-terminal caspase cleavage fragment. *Biochemistry* **42**, 8325-31.
- Bhalla U.S. & Iyengar R. (1999): Emergent properties of networks of biological signaling pathways. *Science* **283**, 381-7.
- Biber K., Klotz K.N., Berger M., Gebicke-Harter P.J. & van Calcar D. (1997): Adenosine A1 receptor-mediated activation of phospholipase C in cultured astrocytes depends on the level of receptor expression. *J Neurosci* **17**, 4956-64.
- Bisserbe J.C., Patel J. & Marangos P.J. (1985): Autoradiographic localization of adenosine uptake sites in rat brain using [3H]nitrobenzylthioinosine. *J Neurosci* **5**, 544-50.
- Blacker D., Wilcox M.A., Laird N.M., Rodes L., Horvath S.M., Go R.C., Perry R., Watson B., Jr., Bassett S.S., McInnis M.G., Albert M.S., Hyman B.T. & Tanzi R.E. (1998): Alpha-2 macroglobulin is genetically associated with Alzheimer disease. *Nat Genet* **19**, 357-60.
- Blessing W.W., Goodchild A.K., Dampney R.A. & Chalmers J.P. (1981): Cell groups in the lower brain stem of the rabbit projecting to the spinal cord, with special reference to catecholamine-containing neurons. *Brain Res* **221**, 35-55.
- Borbely A.A. & Tobler I. (1989): Endogenous sleep-promoting substances and sleep regulation. *Physiol Rev* **69**, 605-70.
- Bradford M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-54.
- Burnstock G. (2007): Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol Rev* **87**, 659-797.
- Cardozo C. & Michaud C. (2002): Proteasome-mediated degradation of tau proteins occurs independently of the chymotrypsin-like activity by a nonprocessive pathway. *Arch Biochem Biophys* **408**, 103-10.
- Carrettiero D.C., Almeida R.S. & Fior-Chadi D.R. (2008a): Adenosine modulates alpha2-adrenergic receptors within the nucleus tractus solitarii of normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Artigo submetido ao Hypertension Research*.
- Carrettiero D.C. & Fior-Chadi D.R. (2004): Adenosine A1 receptor distribution in the nucleus tractus solitarii of normotensive and spontaneously hypertensive rats. *J Neural Transm* **111**, 465-73.
- Carrettiero D.C. & Fior-Chadi D.R. (2008): Age-dependent changes in adenosine A1 receptor distribution and density within the nucleus tractus solitarii of normotensive and hypertensive rats. *Artigo submetido ao Journal of Neural transmission*.

- Carrettiero D.C. & Fior D.R. (2008): Adenosine modulates alpha2-adrenergic receptors through phospholipase C in brainstem cell culture of rats. *Artigo pronto para submissão*.
- Carrettiero D.C., Papagiannakopoulos T.P. & Kosik K.S. (2008b): Tau Protein Triage on the Microtubule Prevents Filament Assembly and is Regulated by miR-128a. *Artigo pronto para submissão*.
- Chalmers J., MacMahon S., Mancia G., Whitworth J., Beilin L., Hansson L., Neal B., Rodgers A., Ni Mhurchu C. & Clark T. (1999): 1999 World Health Organization-International Society of Hypertension Guidelines for the management of hypertension. Guidelines sub-committee of the World Health Organization. *Clin Exp Hypertens* **21**, 1009-60.
- Chen X., Chi Y., Bloecher A., Aebersold R., Clurman B.E. & Roberts J.M. (2004): N-acetylation and ubiquitin-independent proteasomal degradation of p21(Cip1). *Mol Cell* **16**, 839-47.
- Combarros O., Alvarez-Arcaya A., Oterino A., Berciano J., Delgado-Rodriguez M., Pena N., Fernandez-Viadero C., Luis Perez-Lopez J., Setien S. & Carvajal A. (1999): Polymorphisms in the presenilin 1 and presenilin 2 genes and risk for sporadic Alzheimer's disease. *J Neurol Sci* **171**, 88-91.
- Corby P.M., Bretz W.A., Hart T.C., Schork N.J., Wessel J., Lyons-Weiler J. & Paster B.J. (2007): Heritability of oral microbial species in caries-active and caries-free twins. *Twin Res Hum Genet* **10**, 821-8.
- Correia-de-Sa P., Adaes S., Timoteo M.A., Vieira C., Magalhaes-Cardoso T., Nascimento C. & Duarte-Araujo M. (2006): Fine-tuning modulation of myenteric motoneurons by endogenous adenosine: on the role of secreted adenosine deaminase. *Auton Neurosci* **126-127**, 211-24.
- Cripps D., Thomas S.N., Jeng Y., Yang F., Davies P. & Yang A.J. (2006): Alzheimer disease-specific conformation of hyperphosphorylated paired helical filament-Tau is polyubiquitinated through Lys-48, Lys-11, and Lys-6 ubiquitin conjugation. *J Biol Chem* **281**, 10825-38.
- Cunha R.A., Constantino M.C., Sebastiao A.M. & Ribeiro J.A. (1995): Modification of A1 and A2a adenosine receptor binding in aged striatum, hippocampus and cortex of the rat. *Neuroreport* **6**, 1583-8.
- Daly J.W. (1982): Adenosine receptors: targets for future drugs. *J Med Chem* **25**, 197-207.
- Dampney R.A. (1981): Functional organization of central cardiovascular pathways. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **8**, 241-59.
- Dampney R.A. (1994): Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. *Physiol Rev* **74**, 323-64.
- Dampney R.A., Goodchild A.K., Robertson L.G. & Montgomery W. (1982): Role of ventrolateral medulla in vasomotor regulation: a correlative anatomical and physiological study. *Brain Res* **249**, 223-35.
- David D.C., Layfield R., Serpell L., Narain Y., Goedert M. & Spillantini M.G. (2002): Proteasomal degradation of tau protein. *J Neurochem* **83**, 176-85.
- Davies P. & Maloney A.J. (1976): Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet* **2**, 1403.
- De Jong W. (1974): Noradrenaline: central inhibitory control of blood pressure and heart rate. *Eur J Pharmacol* **29**, 179-81.
- Deeley K., Letra A., Rose E.K., Brandon C.A., Resick J.M., Marazita M.L. & Vieira A.R. (2008): Possible association of amelogenin to high caries experience in a Guatemalan-Mayan population. *Caries Res* **42**, 8-13.

- Delobel P., Leroy O., Hamdane M., Sambo A.V., Delacourte A. & Buee L. (2005): Proteasome inhibition and Tau proteolysis: an unexpected regulation. *FEBS Lett* **579**, 1-5.
- Demand J., Alberti S., Patterson C. & Hohfeld J. (2001): Cooperation of a ubiquitin domain protein and an E3 ubiquitin ligase during chaperone/proteasome coupling. *Curr Biol* **11**, 1569-77.
- DeQuattro V. & Lee D.D. (1991): Blood pressure reactivity and sympathetic hyperactivity. Predictors of hypertension. *Am J Hypertens* **4**, 624S-628S.
- Dickey C.A., Kamal A., Lundgren K., Klosak N., Bailey R.M., Dunmore J., Ash P., Shoraka S., Zlatkovic J., Eckman C.B., Patterson C., Dickson D.W., Nahman N.S., Jr., Hutton M., Burrows F. & Petrucelli L. (2007): The high-affinity HSP90-CHIP complex recognizes and selectively degrades phosphorylated tau client proteins. *J Clin Invest* **117**, 648-58.
- Dickey C.A., Yue M., Lin W.L., Dickson D.W., Dunmore J.H., Lee W.C., Zehr C., West G., Cao S., Clark A.M., Caldwell G.A., Caldwell K.A., Eckman C., Patterson C., Hutton M. & Petrucelli L. (2006): Deletion of the ubiquitin ligase CHIP leads to the accumulation, but not the aggregation, of both endogenous phospho- and caspase-3-cleaved tau species. *J Neurosci* **26**, 6985-96.
- Dickstein D.L., Kabaso D., Rocher A.B., Luebke J.I., Wearne S.L. & Hof P.R. (2007): Changes in the structural complexity of the aged brain. *Aging Cell* **6**, 275-84.
- Ding H., Matthews T.A. & Johnson G.V. (2006): Site-specific phosphorylation and caspase cleavage differentially impact tau-microtubule interactions and tau aggregation. *J Biol Chem* **281**, 19107-14.
- Dumanchin C., Camuzat A., Campion D., Verpillat P., Hannequin D., Dubois B., Saugier-Verber P., Martin C., Penet C., Charbonnier F., Agid Y., Frebourg T. & Brice A. (1998): Segregation of a missense mutation in the microtubule-associated protein tau gene with familial frontotemporal dementia and parkinsonism. *Hum Mol Genet* **7**, 1825-9.
- Dumont J.E., Pecasse F. & Maenhaut C. (2001): Crosstalk and specificity in signalling. Are we crosstalking ourselves into general confusion? *Cell Signal* **13**, 457-63.
- Ekonomou A., Pagonopoulou O. & Angelatou F. (2000): Age-dependent changes in adenosine A1 receptor and uptake site binding in the mouse brain: an autoradiographic study. *J Neurosci Res* **60**, 257-65.
- Elbaz A., Dufouil C. & Alperovitch A. (2007): Interaction between genes and environment in neurodegenerative diseases. *C R Biol* **330**, 318-28.
- Elliott E., Tsvetkov P. & Ginzburg I. (2007): BAG-1 associates with Hsc70/tau complex and regulates the proteasomal degradation of tau protein. *J Biol Chem.*
- Esler M., Julius S., Zweifler A., Randall O., Harburg E., Gardiner H. & DeQuattro V. (1977): Mild high-renin essential hypertension. Neurogenic human hypertension? *N Engl J Med* **296**, 405-11.
- Ferre S. (1997): Adenosine-dopamine interactions in the ventral striatum. Implications for the treatment of schizophrenia. *Psychopharmacology (Berl)* **133**, 107-20.
- Ferre S., Fredholm B.B., Morelli M., Popoli P. & Fuxe K. (1997): Adenosine-dopamine receptor-receptor interactions as an integrative mechanism in the basal ganglia. *Trends Neurosci* **20**, 482-7.
- Ferre S., Fuxe K., von Euler G., Johansson B. & Fredholm B.B. (1992): Adenosine-dopamine interactions in the brain. *Neuroscience* **51**, 501-12.
- Ferre S., Snaprud P. & Fuxe K. (1993): Opposing actions of an adenosine A2 receptor agonist and a GTP analogue on the regulation of dopamine D2 receptors in rat neostriatal membranes. *Eur J Pharmacol* **244**, 311-5.

- Feuillet S., Blard O., Lecourtois M., Frebourg T., Campion D. & Dumanchin C. (2005): Tau is not normally degraded by the proteasome. *J Neurosci Res* **80**, 400-5.
- Fior D.R. & Fuxe K. (1995): Bradykinin modulation of alpha 2-adrenoceptors in the nucleus tractus solitarii of the rat. An in vitro autoradiographical study. *Neuropharmacology* **34**, 81-8.
- Fior D.R., Yang S.N., Ganten U., Ganten D. & Fuxe K. (1995): Evidence for a differential modulation of the alpha-2 adrenoceptors by angiotensin II in the nucleus tractus solitarii of the spontaneously hypertensive and the Wistar-Kyoto normotensive rats. *Brain Res* **679**, 168-77.
- Fior D.R., Yang S.N., Hedlund P.B., Narvaez J.A., Agnati L.F. & Fuxe K. (1994): Evidence for an antagonistic angiotensin II/alpha 2-adrenoceptor interaction in the nucleus tractus solitarii. *Eur J Pharmacol* **262**, 271-82.
- Franco R., Lluís C., Canela E.I., Mallol J., Agnati L., Casado V., Ciruela F., Ferre S. & Fuxe K. (2007): Receptor-receptor interactions involving adenosine A1 or dopamine D1 receptors and accessory proteins. *J Neural Transm* **114**, 93-104.
- Fredholm B.B. (1995): Purinoceptors in the nervous system. *Pharmacol Toxicol* **76**, 228-39.
- Fredholm B.B., Abbracchio M.P., Burnstock G., Daly J.W., Harden T.K., Jacobson K.A., Leff P. & Williams M. (1994): Nomenclature and classification of purinoceptors. *Pharmacol Rev* **46**, 143-56.
- Freissmuth M., Selzer E. & Schutz W. (1991): Interactions of purified bovine brain A1-adenosine receptors with G-proteins. Reciprocal modulation of agonist and antagonist binding. *Biochem J* **275** (Pt 3), 651-6.
- Fuxe K., Ferre S., Canals M., Torvinen M., Terasmaa A., Marcellino D., Goldberg S.R., Staines W., Jacobsen K.X., Lluís C., Woods A.S., Agnati L.F. & Franco R. (2005): Adenosine A2A and dopamine D2 heteromeric receptor complexes and their function. *J Mol Neurosci* **26**, 209-20.
- Gamblin T.C., Chen F., Zambrano A., Abrahams A., Lagalwar S., Guillozet A.L., Lu M., Fu Y., Garcia-Sierra F., LaPointe N., Miller R., Berry R.W., Binder L.I. & Cryns V.L. (2003): Caspase cleavage of tau: linking amyloid and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 10032-7.
- Gao Z.G. & Jacobson K.A. (2007): Emerging adenosine receptor agonists. *Expert Opin Emerg Drugs* **12**, 479-92.
- Gerwins P. & Fredholm B.B. (1992a): ATP and its metabolite adenosine act synergistically to mobilize intracellular calcium via the formation of inositol 1,4,5-trisphosphate in a smooth muscle cell line. *J Biol Chem* **267**, 16081-7.
- Gerwins P. & Fredholm B.B. (1992b): Stimulation of adenosine A1 receptors and bradykinin receptors, which act via different G proteins, synergistically raises inositol 1,4,5-trisphosphate and intracellular free calcium in DDT1 MF-2 smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 7330-4.
- Goate A., Chartier-Harlin M.C., Mullan M., Brown J., Crawford F., Fidani L., Giuffra L., Haynes A., Irving N., James L. & et al. (1991): Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* **349**, 704-6.
- Goedert M. & Crowther R.A. (1989): Amyloid plaques, neurofibrillary tangles and their relevance for the study of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **10**, 405-6; discussion 412-4.

- Gomes J.A., Li X., Pan H.L. & Eisenach J.C. (1999): Intrathecal adenosine interacts with a spinal noradrenergic system to produce antinociception in nerve-injured rats. *Anesthesiology* **91**, 1072-9.
- Green A., Johnson J.L. & DiPette D.J. (1990): Decrease in A1 adenosine receptors in adipocytes from spontaneously hypertensive rats. *Metabolism* **39**, 1334-8.
- Green K.G. (1991): British MRC trial of treatment for mild hypertension--a more favorable interpretation. *Am J Hypertens* **4**, 723-4.
- Gudermann T., Kalkbrenner F., Dippel E., Laugwitz K.L. & Schultz G. (1997a): Specificity and complexity of receptor-G-protein interaction. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* **31**, 253-62.
- Gudermann T., Kalkbrenner F. & Schultz G. (1996): Diversity and selectivity of receptor-G protein interaction. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **36**, 429-59.
- Gudermann T., Schoneberg T. & Schultz G. (1997b): Functional and structural complexity of signal transduction via G-protein-coupled receptors. *Annu Rev Neurosci* **20**, 399-427.
- Guimaraes S. & Albino-Teixeira A. (1996): Hypertension due to chronic blockade of P1-purinoceptors. *J Auton Pharmacol* **16**, 367-70.
- Guyenet P.G. (2006): The sympathetic control of blood pressure. *Nat Rev Neurosci* **7**, 335-46.
- Hamos J.E., Oblas B., Pulaski-Salo D., Welch W.J., Bole D.G. & Drachman D.A. (1991): Expression of heat shock proteins in Alzheimer's disease. *Neurology* **41**, 345-50.
- Harris-Warrick R.M. & Marder E. (1991): Modulation of neural networks for behavior. *Annu Rev Neurosci* **14**, 39-57.
- Heale B.S., Soifer H.S., Bowers C. & Rossi J.J. (2005): siRNA target site secondary structure predictions using local stable substructures. *Nucleic Acids Res* **33**, e30.
- Hilbert P., Lindpaintner K., Beckmann J.S., Serikawa T., Soubrier F., Dubay C., Cartwright P., De Gouyon B., Julier C., Takahashi S. & et al. (1991): Chromosomal mapping of two genetic loci associated with blood-pressure regulation in hereditary hypertensive rats. *Nature* **353**, 521-9.
- Hope A.D., de Silva R., Fischer D.F., Hol E.M., van Leeuwen F.W. & Lees A.J. (2003): Alzheimer's associated variant ubiquitin causes inhibition of the 26S proteasome and chaperone expression. *J Neurochem* **86**, 394-404.
- Huang P.L., Huang Z., Mashimo H., Bloch K.D., Moskowitz M.A., Bevan J.A. & Fishman M.C. (1995): Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature* **377**, 239-42.
- Hur E.M. & Kim K.T. (2002): G protein-coupled receptor signalling and cross-talk: achieving rapidity and specificity. *Cell Signal* **14**, 397-405.
- Hutton M., Lendon C.L., Rizzu P., Baker M., Froelich S., Houlden H., Pickering-Brown S., Chakraverty S., Isaacs A., Grover A., Hackett J., Adamson J., Lincoln S., Dickson D., Davies P., Petersen R.C., Stevens M., de Graaff E., Wauters E., van Baren J., Hillebrand M., Joosse M., Kwon J.M., Nowotny P., Che L.K., Norton J., Morris J.C., Reed L.A., Trojanowski J., Basun H., Lannfelt L., Neystat M., Fahn S., Dark F., Tannenberg T., Dodd P.R., Hayward N., Kwok J.B., Schofield P.R., Andreadis A., Snowden J., Craufurd D., Neary D., Owen F., Oostra B.A., Hardy J., Goate A., van Swieten J., Mann D., Lynch T. & Heutink P. (1998): Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature* **393**, 702-5.

- Ii K., Ito H., Tanaka K. & Hirano A. (1997): Immunocytochemical co-localization of the proteasome in ubiquitinated structures in neurodegenerative diseases and the elderly. *J Neuropathol Exp Neurol* **56**, 125-31.
- Illes P., Rickmann H., Brod I., Bucher B. & Stoclet J.C. (1989): Subsensitivity of presynaptic adenosine A1-receptors in caudal arteries of spontaneously hypertensive rats. *Eur J Pharmacol* **174**, 237-51.
- Iqbal K. & Grundke-Iqbal I. (1991): Ubiquitination and abnormal phosphorylation of paired helical filaments in Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol* **5**, 399-410.
- Jackson E.K. (1987): Role of adenosine in noradrenergic neurotransmission in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol* **253**, H909-18.
- Johansson B., Georgiev V. & Fredholm B.B. (1997): Distribution and postnatal ontogeny of adenosine A2A receptors in rat brain: comparison with dopamine receptors. *Neuroscience* **80**, 1187-207.
- Jonasson A., Eriksson C., Jenkinson H.F., Kallestal C., Johansson I. & Stromberg N. (2007): Innate immunity glycoprotein gp-340 variants may modulate human susceptibility to dental caries. *BMC Infect Dis* **7**, 57.
- Julius S. (1996): The evidence for a pathophysiologic significance of the sympathetic overactivity in hypertension. *Clin Exp Hypertens* **18**, 305-21.
- Kishino T., Lalande M. & Wagstaff J. (1997): UBE3A/E6-AP mutations cause Angelman syndrome. *Nat Genet* **15**, 70-3.
- Kitada T., Asakawa S., Hattori N., Matsumine H., Yamamura Y., Minoshima S., Yokochi M., Mizuno Y. & Shimizu N. (1998): Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* **392**, 605-8.
- Kivell B.M., McDonald F.J. & Miller J.H. (2001): Method for serum-free culture of late fetal and early postnatal rat brainstem neurons. *Brain Res Brain Res Protoc* **6**, 91-9.
- Klinger M., Freissmuth M. & Nanoff C. (2002): Adenosine receptors: G protein-mediated signalling and the role of accessory proteins. *Cell Signal* **14**, 99-108.
- Kubo T., Kihara M., Hata H. & Misu Y. (1987): Cardiovascular effects in rats of alpha 1 and alpha 2 adrenergic agents injected into the nucleus tractus solitarii. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **335**, 274-7.
- Kubo T. & Misu Y. (1981): Pharmacological characterisation of the alpha-adrenoceptors responsible for a decrease of blood pressure in the nucleus tractus solitarii of the rat. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **317**, 120-5.
- Kubo T. & Su C. (1983): Effects of adenosine on [3H]norepinephrine release from perfused mesenteric arteries of SHR and renal hypertensive rats. *Eur J Pharmacol* **87**, 349-52.
- Kurt M.A., Davies D.C. & Kidd M. (1997): Paired helical filament morphology varies with intracellular location in Alzheimer's disease brain. *Neurosci Lett* **239**, 41-4.
- Lee R.M., Triggle C.R., Cheung D.W. & Coughlin M.D. (1987): Structural and functional consequence of neonatal sympathectomy on the blood vessels of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* **10**, 328-38.
- Lent R. (2001): Cem bilhões de neurônios : conceitos fundamentais de neurociência. Capítulo 1 e 2 - Primeiros conceitos da Neurociência. Capítulo 2 - Nascimento, Vida e Morte do Sistema Nervoso. pp 1-63, Editora Atheneu. Texto introdutório sobre a estrutura do sistema nervoso.
- Leroy E., Anastasopoulos D., Konitsiotis S., Lavedan C. & Polymeropoulos M.H. (1998): Deletions in the Parkin gene and genetic heterogeneity in a Greek family with early onset Parkinson's disease. *Hum Genet* **103**, 424-7.

- Li N.F., Zhou L., Li T., Wang H.M., Liu H. & Hu J.L. (2007a): [Association between the +491C/T polymorphism of beta2-adrenergic receptor gene and risk of essential hypertension in Kazakns of Xinjiang]. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi* **35**, 706-9.
- Li X., Amazit L., Long W., Lonard D.M., Monaco J.J. & O'Malley B.W. (2007b): Ubiquitin- and ATP-independent proteolytic turnover of p21 by the REGgamma-proteasome pathway. *Mol Cell* **26**, 831-42.
- Litersky J.M. & Johnson G.V. (1992): Phosphorylation by cAMP-dependent protein kinase inhibits the degradation of tau by calpain. *J Biol Chem* **267**, 1563-8.
- Liu C.W., Corboy M.J., DeMartino G.N. & Thomas P.J. (2003): Endoproteolytic activity of the proteasome. *Science* **299**, 408-11.
- Londos C., Cooper D.M. & Wolff J. (1980): Subclasses of external adenosine receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**, 2551-4.
- Lu M. & Kosik K.S. (2001): Competition for microtubule-binding with dual expression of tau missense and splice isoforms. *Mol Biol Cell* **12**, 171-84.
- Lynn B.J., John C.C., Raymond L.W. & Motta P.A. (1885): Genética Médica - Capítulo 1 e 10.
- Mansego M.L., Redon J., Marin R., Gonzalez-Albert V., Martin-Escudero J.C., Fabia M.J., Martinez F. & Chaves F.J. (2008): Renin polymorphisms and haplotypes are associated with blood pressure levels and hypertension risk in postmenopausal women. *J Hypertens* **26**, 230-237.
- Marangos P.J., Patel J. & Stivers J. (1982): Ontogeny of adenosine binding sites in rat forebrain and cerebellum. *J Neurochem* **39**, 267-70.
- Matias A., Albino-Teixeira A., Polonia J. & Azevedo I. (1991): Long-term administration of 1,3-dipropyl-8-sulfophenylxanthine causes arterial hypertension. *Eur J Pharmacol* **193**, 101-4.
- Matias A., Zimmer F.J., Lorenzen A., Keil R. & Schwabe U. (1993): Affinity of central adenosine A1 receptors is decreased in spontaneously hypertensive rats. *Eur J Pharmacol* **244**, 223-30.
- Mayeux R. (2006): Genetic epidemiology of Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord* **20**, S58-62.
- McClure J.M., O'Leary D.S. & Scislo T.J. (2005): Stimulation of NTS A1 adenosine receptors evokes counteracting effects on hindlimb vasculature. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **289**, H2536-42.
- Mori M.A., Gomar J.L., Diaz de Bustamante A., Ananias A., Pinel I. & Martinez-Frias M.L. (1987): Partial duplication 16p resulting from a 3:1 segregation of a maternal reciprocal translocation. *Am J Med Genet* **26**, 203-6.
- Morishima-Kawashima M., Hasegawa M., Takio K., Suzuki M., Titani K. & Ihara Y. (1993): Ubiquitin is conjugated with amino-terminally processed tau in paired helical filaments. *Neuron* **10**, 1151-60.
- Morrison J.H. & Hof P.R. (1997): Life and death of neurons in the aging brain. *Science* **278**, 412-9.
- Mosqueda-Garcia R., Tseng C.J., Appalsamy M., Beck C. & Robertson D. (1991): Cardiovascular excitatory effects of adenosine in the nucleus of the solitary tract. *Hypertension* **18**, 494-502.
- Mosqueda-Garcia R., Tseng C.J., Appalsamy M. & Robertson D. (1989): Modulatory effects of adenosine on baroreflex activation in the brainstem of normotensive rats. *Eur J Pharmacol* **174**, 119-22.

- Munshi R., Pang I.H., Sternweis P.C. & Linden J. (1991): A1 adenosine receptors of bovine brain couple to guanine nucleotide-binding proteins Gi1, Gi2, and Go. *J Biol Chem* **266**, 22285-9.
- Neves S.R. & Iyengar R. (2002): Modeling of signaling networks. *Bioessays* **24**, 1110-7.
- Neves S.R., Ram P.T. & Iyengar R. (2002): G protein pathways. *Science* **296**, 1636-9.
- Nicoll J.A., Mrak R.E., Graham D.I., Stewart J., Wilcock G., MacGowan S., Esiri M.M., Murray L.S., Dewar D., Love S., Moss T. & Griffin W.S. (2000): Association of interleukin-1 gene polymorphisms with Alzheimer's disease. *Ann Neurol* **47**, 365-8.
- Nishizuka Y. (1992): Membrane phospholipid degradation and protein kinase C for cell signalling. *Neurosci Res* **15**, 3-5.
- Nomura M., Ohtsuji M. & Nagata Y. (1985): Changes in the alpha-adrenoceptors in the medulla oblongata including nucleus tractus solitarius of spontaneously hypertensive rats. *Neurochem Res* **10**, 1143-54.
- Nunomura A., Perry G., Aliev G., Hirai K., Takeda A., Balraj E.K., Jones P.K., Ghanbari H., Wataya T., Shimohama S., Chiba S., Atwood C.S., Petersen R.B. & Smith M.A. (2001): Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* **60**, 759-67.
- Okamoto K. & Aoki K. (1963): Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J* **27**, 282-93.
- Oppenheim R.W. (1999): Programmed cell death. Capítulo 20 de Fundamental Neuroscience (M. zigmound e outros, Orgs), Academic Press. Nova York, EUA. pp 417-450. Texto avançado sobre mecanismos regresivos do desenvolvimento.
- Pagonopoulou O. & Angelatou F. (1992): Reduction of A1 adenosine receptors in cortex, hippocampus and cerebellum in ageing mouse brain. *Neuroreport* **3**, 735-7.
- Palkovits M. (1985): Distribution of neuroactive substances in the dorsal vagal complex of the medulla oblongata. *Neurochem. Int.* **7**, 213-219.
- Palsdottir A., Thorsteinsson L., Jonsdottir S., Arnason A., Snaedal J., Magnusson T., Snorrason E., Ingibergsdottir R., Abrahamson M., Olafsson I. & et al. (1989): Study of restriction fragment length polymorphism in the cystatin C gene of elderly patients with dementia and aged Down's syndrome patients. *Prog Clin Biol Res* **317**, 235-9.
- Paxinus G. & Watson C. (1986): The rat brain in stereotaxic coordinates. *Academic Press, San Diego*.
- Perez N., Sugar J., Charya S., Johnson G., Merrill C., Bierer L., Perl D., Haroutunian V. & Wallace W. (1991): Increased synthesis and accumulation of heat shock 70 proteins in Alzheimer's disease. *Brain Res Mol Brain Res* **11**, 249-54.
- Petrucelli L., Dickson D., Kehoe K., Taylor J., Snyder H., Grover A., De Lucia M., McGowan E., Lewis J., Prihar G., Kim J., Dillmann W.H., Browne S.E., Hall A., Voellmy R., Tsuboi Y., Dawson T.M., Woloizin B., Hardy J. & Hutton M. (2004): CHIP and Hsp70 regulate tau ubiquitination, degradation and aggregation. *Hum Mol Genet* **13**, 703-14.
- Phillis J.W., Scislo T.J. & O'Leary D.S. (1997): Purines and the nucleus tractus solitarius: effects on cardiovascular and respiratory function. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **24**, 738-42.
- Poirier J., Davignon J., Bouthillier D., Kogan S., Bertrand P. & Gauthier S. (1993): Apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer's disease. *Lancet* **342**, 697-9.

- Purves D., Augustine G.J., Fitzpatrick D., Katz L.C., LaMantia A.-S. & McNamara J.O. (1996a): The organization of the nervous system. Capítulo 1 de Neuroscience, pp 1-35. Sinauer Associates, Sunderland, EUA. Texto introdutório sobre o sistema nervoso central.
- Purves D., Augustine G.J., Fitzpatrick D., Katz L.C., LaMantia A.-S. & McNamara J.O. (1996b): Sensation and Sensory processing. Capítulo 8-14 de Neuroscience, pp. 147 a 287. Sinauer Associates, Sunderland, EUA. Texto didático amplo: dos receptores até o córtex cerebral.
- Rankin C.A., Sun Q. & Gamblin T.C. (2007): Tau phosphorylation by GSK-3 β promotes tangle-like filament morphology. *Mol Neurodegener* **2**, 12.
- Raper J.A. & Tessier-Lavigne (1999): Growth cones and axon pathfinding. Capítulo 18 de Fundamental Neuroscience, Academic Press. Nova York, EUA. pp. 519-549. Texto avançado sobre formação de redes neurais. .
- Ravaglia G., Paola F., Maioli F., Martelli M., Montesi F., Bastagli L., Bianchin M., Chiappelli M., Tumini E., Bolondi L. & Licastro F. (2006): Interleukin-1 β and interleukin-6 gene polymorphisms as risk factors for AD: a prospective study. *Exp Gerontol* **41**, 85-92.
- Reis D.J. (1981): The nucleus tractus solitarius and experimental neurogenic hypertension: evidence for a central neural imbalance hypothesis of hypertensive disease. *Adv Biochem Psychopharmacol* **28**, 409-20.
- Reis D.J., Granata A.R., Joh T.H., Ross C.A., Ruggiero D.A. & Park D.H. (1984): Brain stem catecholamine mechanisms in tonic and reflex control of blood pressure. *Hypertension* **6**, 117-15.
- Richardson P.J. (1997): Asthma. Blocking adenosine with antisense. *Nature* **385**, 684-5.
- Ritchie K. & Lovestone S. (2002): The dementias. *Lancet* **360**, 1759-66.
- Rivkees S.A. (1995): The ontogeny of cardiac and neural A1 adenosine receptor expression in rats. *Brain Res Dev Brain Res* **89**, 202-13.
- Robertson D., Biaggioni I. & Tseng C.J. (1988): Adenosine and Adenine Nucleotides ed. D.M Paton (Taylor and Francis, London), p. 241.
- Rojo L.E., Fernandez J.A., Maccioni A.A., Jimenez J.M. & Maccioni R.B. (2008): Neuroinflammation: implications for the pathogenesis and molecular diagnosis of Alzheimer's disease. *Arch Med Res* **39**, 1-16.
- Ruppert V. & Maisch B. (2003): Genetics of human hypertension. *Herz* **28**, 655-62.
- Sahara N., Murayama M., Mizoroki T., Urushitani M., Imai Y., Takahashi R., Murata S., Tanaka K. & Takashima A. (2005): In vivo evidence of CHIP up-regulation attenuating tau aggregation. *J Neurochem* **94**, 1254-63.
- Schedl A. (2007): Renal abnormalities and their developmental origin. *Nat Rev Genet* **8**, 791-802.
- Schliebs R. (2005): Basal forebrain cholinergic dysfunction in Alzheimer's disease--interrelationship with beta-amyloid, inflammation and neurotrophin signaling. *Neurochem Res* **30**, 895-908.
- Schliebs R. & Arendt T. (2006): The significance of the cholinergic system in the brain during aging and in Alzheimer's disease. *J Neural Transm* **113**, 1625-44.
- Schmitt B., Bernhardt T., Moeller H.J., Heuser I. & Frolich L. (2004): Combination therapy in Alzheimer's disease: a review of current evidence. *CNS Drugs* **18**, 827-44.
- Scislo T.J., Kitchen A.M., Augustyniak R.A. & O'Leary D.S. (2001): Differential patterns of sympathetic responses to selective stimulation of nucleus tractus solitarius purinergic receptor subtypes. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **28**, 120-4.

- Scislo T.J. & O'Leary D.S. (1998): Activation of A2a adenosine receptors in the nucleus tractus solitarius inhibits renal but not lumbar sympathetic nerve activity. *J Auton Nerv Syst* **68**, 145-52.
- Scislo T.J. & O'Leary D.S. (2000): Differential role of ionotropic glutamatergic mechanisms in responses to NTS P(2x) and A(2a) receptor stimulation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **278**, H2057-68.
- Scislo T.J. & O'Leary D.S. (2002): Mechanisms mediating regional sympathoactivatory responses to stimulation of NTS A(1) adenosine receptors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **283**, H1588-99.
- Scislo T.J. & O'Leary D.S. (2005): Purinergic mechanisms of the nucleus of the solitary tract and neural cardiovascular control. *Neurol Res* **27**, 182-94.
- Sebastiao A.M. & Ribeiro J.A. (1996): Adenosine A2 receptor-mediated excitatory actions on the nervous system. *Prog Neurobiol* **48**, 167-89.
- Selkoe D.J. (2001): Alzheimer's disease results from the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid beta-protein. *J Alzheimers Dis* **3**, 75-80.
- Sheaff R.J., Singer J.D., Swanger J., Smitherman M., Roberts J.M. & Clurman B.E. (2000): Proteasomal turnover of p21Cip1 does not require p21Cip1 ubiquitination. *Mol Cell* **5**, 403-10.
- Shimura H., Miura-Shimura Y. & Kosik K.S. (2004): Binding of tau to heat shock protein 27 leads to decreased concentration of hyperphosphorylated tau and enhanced cell survival. *J Biol Chem* **279**, 17957-62.
- Singleton A.B., Gibson A.M., McKeith I.G., Ballard C.G., Edwardson J.A. & Morris C.M. (2001): Nitric oxide synthase gene polymorphisms in Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies. *Neurosci Lett* **303**, 33-6.
- Snyder H., Mensah K., Theisler C., Lee J., Matouschek A. & Wolozin B. (2003): Aggregated and monomeric alpha-synuclein bind to the S6' proteasomal protein and inhibit proteasomal function. *J Biol Chem* **278**, 11753-9.
- St Lambert J.H., Dashwood M.R. & Spyer K.M. (1996): Role of brainstem adenosine A1 receptors in the cardiovascular response to hypothalamic defence area stimulation in the anaesthetized rat. *Br J Pharmacol* **117**, 277-82.
- St Lambert J.H., Thomas T., Burnstock G. & Spyer K.M. (1997): A source of adenosine involved in cardiovascular responses to defense area stimulation. *Am J Physiol* **272**, R195-200.
- Staessen J.A., Wang J., Bianchi G. & Birkenhager W.H. (2003): Essential hypertension. *Lancet* **361**, 1629-41.
- Takami T., Ito H. & Suzuki T. (1993): Decreased norepinephrine content in the medulla oblongata in severely hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **20**, 161-7.
- Takayama S., Krajewski S., Krajewska M., Kitada S., Zapata J.M., Kochel K., Knee D., Scudiero D., Tudor G., Miller G.J., Miyashita T., Yamada M. & Reed J.C. (1998): Expression and location of Hsp70/Hsc-binding anti-apoptotic protein BAG-1 and its variants in normal tissues and tumor cell lines. *Cancer Res* **58**, 3116-31.
- Takayama S., Xie Z. & Reed J.C. (1999): An evolutionarily conserved family of Hsp70/Hsc70 molecular chaperone regulators. *J Biol Chem* **274**, 781-6.
- Tao S. & Abdel-Rahman A.A. (1993): Neuronal and cardiovascular responses to adenosine microinjection into the nucleus tractus solitarius. *Brain Res Bull* **32**, 407-17.
- Timasheva Y.R., Nasibullin T.R., Zakirova A.N. & Mustafina O.E. (2008): Association of interleukin-6, interleukin-12, and interleukin-10 gene polymorphisms with essential hypertension in tatars from Russia. *Biochem Genet* **46**, 64-74.

- Tipton C.M., Sturek M.S., Oppliger R.A., Matthes R.D., Overton J.M. & Edwards J.G. (1984): Responses of SHR to combinations of chemical sympathectomy, adrenal demedullation, and training. *Am J Physiol* **247**, H109-18.
- Tofaris G.K., Layfield R. & Spillantini M.G. (2001): alpha-synuclein metabolism and aggregation is linked to ubiquitin-independent degradation by the proteasome. *FEBS Lett* **509**, 22-6.
- Touitou R., Richardson J., Bose S., Nakanishi M., Rivett J. & Allday M.J. (2001): A degradation signal located in the C-terminus of p21WAF1/CIP1 is a binding site for the C8 alpha-subunit of the 20S proteasome. *Embo J* **20**, 2367-75.
- Tseng C.J., Biaggioni I., Appalsamy M. & Robertson D. (1988): Purinergic receptors in the brainstem mediate hypotension and bradycardia. *Hypertension* **11**, 191-7.
- Tseng C.J., Ger L.P., Lin H.C. & Tung C.S. (1995): Attenuated cardiovascular response to adenosine in the brain stem nuclei of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* **25**, 278-82.
- Unnerstall J.R., Kopajtic T.A. & Kuhar M.J. (1984): Distribution of alpha 2 agonist binding sites in the rat and human central nervous system: analysis of some functional, anatomic correlates of the pharmacologic effects of clonidine and related adrenergic agents. *Brain Res* **319**, 69-101.
- van Calker D., Muller M. & Hamprecht B. (1978): Adenosine inhibits the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells. *Nature* **276**, 839-41.
- van Calker D., Muller M. & Hamprecht B. (1979): Adenosine regulates via two different types of receptors, the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells. *J Neurochem* **33**, 999-1005.
- van Giersbergen P.L., Palkovits M. & De Jong W. (1992): Involvement of neurotransmitters in the nucleus tractus solitarius in cardiovascular regulation. *Physiol Rev* **72**, 789-824.
- Von Euler G. & Fuxe K. (1987): Neurotensin reduces the affinity of D-2 dopamine receptors in rat striatal membranes. *Acta Physiol Scand* **131**, 625-6.
- Von Euler G., Fuxe K., Van der Ploeg I., Fredholm B.B. & Agnati L.F. (1989): Pertussis toxin treatment counteracts intramembrane interactions between neuropeptide Y receptors and alpha 2-adrenoceptors. *Eur J Pharmacol* **172**, 435-41.
- Weaver D.R. (1993): A2a adenosine receptor gene expression in developing rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* **20**, 313-27.
- Weaver D.R. (1996): A1-adenosine receptor gene expression in fetal rat brain. *Brain Res Dev Brain Res* **94**, 205-23.
- Weinreb P.H., Zhen W., Poon A.W., Conway K.A. & Lansbury P.T., Jr. (1996): NACP, a protein implicated in Alzheimer's disease and learning, is natively unfolded. *Biochemistry* **35**, 13709-15.
- White P.C., Hautanen A. & Kupari M. (1999): Aldosterone synthase (CYP11B2) polymorphisms and cardiovascular function. *J Steroid Biochem Mol Biol* **69**, 409-12.
- White P.J., Rose-Meyer R.B. & Hope W. (1996): Functional characterization of adenosine receptors in the nucleus tractus solitarius mediating hypotensive responses in the rat. *Br J Pharmacol* **117**, 305-8.
- Williams M. (1989): Adenosine antagonists. *Med Res Rev* **9**, 219-43.
- Xue S. & Jia J. (2006): Genetic association between Ubiquitin Carboxy-terminal Hydrolase-L1 gene S18Y polymorphism and sporadic Alzheimer's disease in a Chinese Han population. *Brain Res* **1087**, 28-32.

- Yamada S., Ashizawa N., Nakayama K., Tomita T. & Hayashi E. (1989): Decreased density of alpha 2-adrenoceptors in medulla oblongata of spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol* **13**, 440-6.
- Yamada S., Ishima T., Hayashi M., Tomita T. & Hayashi E. (1984): Reduced alpha 2-adrenoceptor binding in lower brainstem of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Jpn J Pharmacol* **35**, 468-70.
- Yamada Y., Kato K., Yoshida T., Yokoi K., Matsuo H., Watanabe S., Ichihara S., Metoki N., Yoshida H., Satoh K., Aoyagi Y., Yasunaga A., Park H., Tanaka M. & Nozawa Y. (2008): Association of polymorphisms of ABCA1 and ROS1 with hypertension in Japanese individuals. *Int J Mol Med* **21**, 83-9.
- Yang S.N., Fior D.R., Hedlund P.B., Agnati L.F. & Fuxe K. (1994): Antagonistic regulation of alpha 2-adrenoceptors by neuropeptide Y receptor subtypes in the nucleus tractus solitarii. *Eur J Pharmacol* **271**, 201-12.