



**PROVAS ACADÉMICAS**  
NA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE LISBOA  
INSTITUTO DE FORMAÇÃO AVANÇADA

---

**Doutoramento:**

Ciências Biomédicas

**Nome do Aluno:**

Joana Fernandes Esteves Soares Coelho

**Tema da Tese:**

Presynaptic mechanisms in the hypoxia-induced suppression of synaptic transmission in the rat hippocampus

**Área:**

Ciências Biomédicas

**Especialidade:**

Neurociências

**Data da Defesa:**

30-06-2010

**Classificação:**

Aprovado com Distinção e Louvor por Maioria

**Júri:**

Presidiu o Vice - Presidente do Conselho Científico da FMUL, Professor Doutor José Melo Cristino e estiveram presentes os vogais Doutores: Bruno Frenguelli, da Universidade de Dundee, Reino Unido, Rodrigo Pinto Santos Antunes Cunha, Universidade de Coimbra, Paulo Jorge da Silva Correia de Sá, Universidade do Porto, Alexandre Valério de Mendonça, Ana Maria Ferreira de Sousa Sebastião e Maria José de Oliveira Diógenes Nogueira, todos da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa.



**PROVAS ACADÉMICAS**  
NA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE LISBOA  
INSTITUTO DE FORMAÇÃO AVANÇADA

---

### RESUMO

A redução dos níveis de oxigénio (hipóxia) provoca a rápida inibição da actividade neuronal; este efeito é considerado um mecanismo neuroprotector, pois permite minimizar alterações dos níveis de carga energética celular provocadas pela redução de oxigénio. A adenosina (um produto de degradação do ATP) desempenha um papel determinante nos eventos que resultam na inibição da transmissão sináptica. Os níveis de extracelulares de adenosina aumentam cerca de 100 vezes em situações de stress celular, de que a hipóxia é um exemplo (Pedata et al., 1993). A consequente activação dos receptores de subtipo A1 é considerada responsável pelos efeitos inibitórios da hipóxia sobre a actividade neuronal. No entanto, o bloqueio destes receptores durante a hipóxia, permite revelar um componente inibitório da transmissão sináptica, que persiste mesmo na ausência dos efeitos mediados pelo receptor A1 (Canhão et al., 1994, Fowler, 1989).

Os estudos foram efectuados num modelo *in vitro* de fatias de hipocampo de rato. O hipocampo é um modelo particularmente adequado para estudo dos efeitos da hipóxia em circuitos neuronais por ter marcada vulnerabilidade funcional quando exposta a insultos hipóxicos/isquémicos tanto *in vivo* como *in vitro* (Aitken & Schiff, 1986, Kirino et al., 1985); adicionalmente, a conectividade celular e principais neurotransmissores presentes no hipocampo são bem conhecidos. Assim, foi medida a modificação da actividade neuronal durante a hipóxia em fatias de hipocampo, recorrendo a técnicas de electrofisiologia, acoplada, quando necessário, a imagiologia de fluorescência para monitorizar a entrada de cálcio em terminais pré-sinápticos. A superfusão de fatias de hipocampo com uma solução salina saturada com uma mistura gasosa de 95% N<sub>2</sub> e 5% O<sub>2</sub>, causou um decréscimo do valor de pressão parcial de oxigénio em solução 10% dos valores de oxigénio em solução durante normóxia (~80%), acompanhada de uma marcada inibição da transmissão sináptica sem modificação da despolarização de elementos celulares na proximidade do eléctrodo de registo. A re-introdução da solução oxigenada (95%O<sub>2</sub> 5%CO<sub>2</sub>) resultou na recuperação da transmissão sináptica para valores comparáveis à fase de normóxia.

O antagonista dos receptores para a adenosina do subtipo A1 atenuou em cerca de 50% a inibição da transmissão sináptica causada pela hipóxia. Este fenómeno, já anteriormente descrito, revela a importância destes receptores no bloqueio da actividade sináptica durante a hipóxia. Para identificar os processos responsáveis pela restante redução da transmissão sináptica causada por hipóxia, começou-se por se definir se este efeito resultava de modificações funcionais pré- ou pós-sinápticas. Um protocolo de estimulação por pulso emparelhado, que permite avaliar a predominância de efeitos pré- sinápticos, indicou uma origem pré-sináptica dos mecanismos da supressão da transmissão sináptica causados por hipóxia. Com efeito, mesmo na ausência de efeitos mediados pelos receptores A1, a supressão da transmissão sináptica mantém a sua natureza pré-sináptica. Este resultado sugere que outros receptores presentes nas terminações sinápticas possam ter um papel importante na depressão da transmissão sináptica causada por hipóxia. É conhecido que outros receptores, como os receptores muscarínicos da acetilcolina,  $\alpha$ 2- adrenérgicos e o receptor do subtipo GABAB para o ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), estão presentes no hipocampo e inibem a libertação de glutamato (Boehm, 1999, Fernandez de Sevilla et al., 2002, Thompson & Gahwiler, 1992), e é conhecido que insultos isquémicos aumenta os níveis dos ligandos deste receptores (Kolluri & Lakshmi, 1989, Kumagae & Matsui, 1991). Assim, antagonistas selectivos destes receptores foram utilizados para bloquear a activação por agonistas endógenos durante a hipóxia de modo a clarificar o papel de cada um destes receptores pré-sinápticos na

supressão da transmissão sináptica pela hipóxia. Apenas na presença do antagonista selectivo para os receptores A1 para a adenosina foi possível evidenciar um efeito mediado pelos receptores muscarínicos para a acetilcolina, especificamente pelo receptor do subtipo M2; nem os receptores  $\alpha$ 2-adrenérgicos nem GABAB parecem contribuir para a depressão da transmissão sináptica durante a hipóxia, mesmo na ausência do efeito mediado pelos receptores A1. Todavia, é claro que os efeitos mediados pelo receptor A1 predominam, inclusive ocluindo as acções de outros receptores pré-sinápticos. Conclui-se que cerca de 70% do efeito inibitório da hipóxia na transmissão sináptica é mediada pela acção de receptores pré-sinápticos, presumivelmente sobre a libertação de glutamato, permanecendo os mecanismos responsáveis pelos restantes 30% por identificar. O estudo da dinâmica de entrada de cálcio nos terminais pré-sinápticos revelou que, durante a hipóxia, a inibição da transmissão sináptica reflecte a redução da entrada de cálcio nos terminais. De facto, a relação entre o influxo de cálcio e a probabilidade de libertação de neurotransmissor manteve-se com valores semelhantes aos observados em normóxia; isto sugere que o processo de supressão da transmissão sináptica decorre da inibição regulada, e não da perda de efeitos reguladores, da libertação de neurotransmissor. Neste contexto, o efeito mediado pelo receptor A1 da adenosina é atribuível à inibição de canais de cálcio de tipo N, já que, é necessário bloquear os receptores A1 para readmitir a entrada de cálcio através destes canais durante a hipóxia. O efeito da hipóxia sobre a actividade de outros canais de cálcio, nomeadamente R, T e também P e Q é menos clara. Nas condições experimentais utilizadas a inibição dos canais de cálcio P e Q não produziu efeitos claros quer na presença quer na ausência de efeitos mediados pelos receptores A1. O bloqueio dos canais de cálcio P e Q revelou uma tendência, não significativa, para inibir a transmissão sináptica na ausência de bloqueio dos receptores A1, e uma facilitação dos valores máximos de depressão da transmissão sináptica em condições de bloqueio simultâneo dos receptores A1 e canais P ou Q, o que estaria de acordo com os mecanismos descritos para os estes receptores em condições de normóxia (Wu & Saggau, 1994). Os efeitos neuroprotectores resultantes da activação dos receptores A1 (patentes na recuperação da transmissão sináptica para valores semelhantes ao do período anterior ao insulto hipóxico) são reproduzidos por bloqueadores dos canais de cálcio do tipo N quando os receptores A1 estão bloqueados. No entanto, uma exposição prolongada (1 hora) a hipóxia modificou a eficiência dos receptores A1 adenosina, reflexo de uma diminuição da densidade destes receptores na membrana avaliada utilizando ensaios de ligação com ligando marcado radioactivamente, assim como Western blot. Esta alteração tem implicações para os mecanismos neuroprotectores baseados na activação e acção dos receptores A1 durante períodos prolongados, e reitera o papel dos receptores A1 como primeira linha de protecção em situações agudas de insulto. Por outro lado, os receptores do subtipo A2A têm a capacidade de alterar os níveis extracelulares de adenosina através da modulação da actividade de transportadores equilibrativos de nucleósidos, num mecanismo dependente da activação de proteína cinase C. Esta regulação dos níveis de adenosina e poderá também condicionar a neuroprotecção exercida pela adenosina.

Em conclusão, a supressão da transmissão sináptica é um fenómeno regulado e dependente de modificações pré-sinápticas da entrada de cálcio com efeitos na libertação de neurotransmissores, mediado predominantemente por receptores A1 para a adenosina, mas para o qual também contribuem outros receptores pré-sinápticos, nomeadamente os receptores da acetilcolina do subtipo M2; a participação destes últimos pode ser relevante em situações de hipóxia prolongada, quando as respostas mediadas pelos receptores A1 para a adenosina sofrem dessensibilização.