WESLEY NOGUEIRA BRANDÃO

**GLUTAMATO ATRAVÉS DA SINALIZAÇÃO DO NMDAR MODULA A
RESPOSTA INATA DE CÉLULAS IMUNITÁRIAS *IN VITRO* DURANTE
HIPÓXIA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. Jean Pierre Schatzmann Peron

Versão Original

São Paulo
2017

RESUMO

BRANDÃO WN. **Glutamato através da sinalização do NMDAr modula a resposta Inata de Células Imunitárias *In Vitro* durante hipóxia.** [Tese (Doutorado em Imunologia)] São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017.

O Acidente vascular cerebral (AVC) é uma doença aguda neuroinflamatória cuja prevalência aumentou significativamente nos últimos anos. Dentre os sintomas, os mais frequentes são paralisia decorrentes da morte neuronal provocada pela privação de glicose e oxigênio. Sabe-se que, após a morte neuronal, há liberação de diversas substâncias pró-inflamatórias, tais como citocinas, DAMPs (Padrões moleculares associados ao dano), radicais livres e principalmente neurotransmissores, dentre elas o glutamato. Tais moléculas além de promover maior dano no SNC, também modulam a resposta das células imunes infiltrantes. Cada vez mais, novos indícios da ação de neurotransmissores sobre a modulação da resposta imune são gerados, contudo como essa modulação pode afetar o desenvolvimento das doenças neurodegenerativas ainda é pouco entendido. Neste contexto, o objetivo deste trabalho é averiguar como o glutamato através do seu receptor NMDA poderia modular a resposta inflamatória tanto de células residentes, como a microglia, quanto de células infiltrantes, como macrófagos e neutrófilos. Para a realização desse estudos, promovemos experimentos *in vitro* com culturas de células da microgliais, neutrófilos e macrófagos, tratados ou não com NMDA bloqueador (MK 801), as quais passaram ou não pelo processo de hipóxia durante 24 horas a 1% de O₂. Após esse período, as células e os seus produtos foram avaliados por PCR em tempo real, citometria de fluxo, e CBA. Os nossos resultados demonstraram que a sinalização por NMDAr modula a expressão de moléculas envolvidas na apresentação de antígeno em células da microglia e macrófagos, bem como na produção de óxido nítrico por neutrófilos. O seu bloqueio diminui morte celular de células da microglia e menor lesão cerebral no modelo de obstrução da artéria cerebral média (MCAO). Por fim, nossa pesquisa mostra que a sinalização NMDAr está envolvido não só com excitotoxicidade, mas também com a modulação da resposta da células inata, auxiliando a expressão de moléculas có-estimuladoras produção de citocinas e de espécies reativas do oxigênio.

Palavras-chave: Acidente vascular Cerebral. Glutamato. Células da Microglia. Hipóxia. NMDAr.

ABSTRACT

BRANDÃO WN. **Glutamate through NMDAr signaling modulates the Immune Cell Response *In Vitro* during hypoxia.** [Ph.D Thesis (Immunology)] São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017.

Cerebral vascular accident (CVA) is an acute neuroinflammatory disease whose prevalence has increased significantly in recent years. Among the symptoms, the most frequent are paralysis due to neuronal death caused by deprivation of glucose and oxygen. It is known that after neuronal death, there are several proinflammatory substances, such as cytokines, DAMPs (damage associated molecular pattern), free radicals and mainly neurotransmitters, among them glutamate. Such molecules, in addition to promoting greater CNS damage, also modulate the response of infiltrating immune cells. Increasingly, new evidence for the action of neurotransmitters on the modulation of the immune response is generated, however how such modulation may affect the development of neurodegenerative diseases is still poorly understood. In this context, the objective of this work is to investigate how glutamate through its NMDA receptor could modulate the inflammatory response in both resident cells like microglia, and infiltrating cells, such as macrophages and neutrophils. In order to perform these studies, we performed in vitro experiments with cultures of microglial cells, neutrophils and macrophages, treated or not with NMDA blocker (MK 801), which underwent hypoxia for 24 hours at 1% O₂. After this time, the cells and their products were evaluated by real-time PCR, flow cytometry, and CBA. Our results demonstrated that NMDAr signaling modulates the expression of molecules involved in the presentation of antigen in microglia and macrophages cells, as well as in the production of nitric oxide by neutrophils. Its blockade decreases cell death of microglia cells and less brain damage in the middle cerebral artery obstruction model (MCAO). Finally, our research shows that NMDAr signaling is involved not only with excitotoxicity but also with the modulation of innate cell response, aiding the expression of costimulatory molecules production of cytokines and reactive oxygen species.

Keywords: Cerebral vascular accident. Glutamate. Microglia cells. Hypoxia. NMDAr.

1 INTRODUÇÃO

1.1 O acidente vascular cerebral na sociedade

O acidente vascular cerebral (AVC) é uma das principais causas de morte e incapacidade no mundo. Mundialmente, esta doença atinge cerca de 16 milhões de pessoas por ano, das quais um terço é levado ao óbito (Feiging et al., 2013). Sua patogenia está relacionada com a interrupção do fornecimento de sangue para o cérebro, podendo ocorrer de duas maneiras: pelo bloqueio dos vasos sanguíneos, por um trombo ou êmbolo, caracterizando o AVC isquêmico; ou pela ruptura dos vasos sanguíneos, levando ao AVC hemorrágico. Em ambos os casos ocorre a isquemia e consequente morte das células neuronais e gliais locais (Ministério da saúde, 2013). Segundo dados da organização mundial da saúde no Brasil, cerca de 68 mil óbitos por ano são devido ao AVC, seja ele isquêmico ou hemorrágico. O impacto desses números se torna mais claro ao evidenciarmos que esta prevalência se assemelha a países como os Estados Unidos, onde estima-se uma morte a cada três minutos, tornando este um dos principais problemas de saúde pública (Figura 1) (WHO, 2004).

Cerca de 80% dos casos de acidente vascular cerebral são isquêmicos, no qual a falta de glicose e oxigênio no tecido neuronal promove uma deficiência da síntese de adenosina trifosfato (ATP) que resulta em um colapso nos mecanismos dependentes de energia. Dentre estes eventos podemos citar o estresse oxidativo, alteração do pH intracelular, precipitação de proteínas no citoplasma, inflamação e morte celular (Fonteles, 2013). Os sintomas iniciais do evento isquêmico são principalmente perda repentina da força muscular (paresias) e/ou perda da visão, dificuldade de comunicação oral, tonturas, assimetria facial e dormência em um dos lados do corpo. Quando não fatal, os pacientes que sofrem uma isquemia podem apresentar sequelas relacionadas à dificuldade na linguagem, de conectar pensamentos, de memória e de movimentos, o que diminui consideravelmente sua qualidade de vida (Kriz, Lalancette-Hébert, 2009).

São muitos os fatores que se correlacionam com o aparecimento do AVC, de fato existem atualmente mais de trezentos fatores de risco que atingem todas as populações no mundo (WHO, 2004). Pelo menos um terço de todas as doenças cardiovasculares são atribuíveis a cinco fatores: uso de tabaco, consumo de álcool, pressão arterial alta, colesterol alto e obesidade (WHO, 2011).

Figura 1 - Distribuição geográfica da Incidência de AVC para cada 100.000 habitantes em 2010

Fonte: (Feiging et al., 2014).

As lesões encontradas no AVC são dependentes do tempo de duração da isquemia, onde longos períodos resultam em lesões mais graves que as relacionadas a períodos mais curtos. Após o AVC duas regiões teciduais são evidenciadas: o *core*, ou região central, com altos níveis de necrose celular, e a região de *penumbra*, zona adjacente, contendo altas quantidades de células da glia ativadas, bem como células imunes infiltrantes (Peron et al., 2012). As lesões agudas encontradas no AVC são hipóxia dependentes, onde a morte celular ocorre devido a diversos fatores, os principais são: as reações dependentes da diminuição de ATP, excitotoxicidade e inflamação.

1.2 Neuroinflamação no desenvolvimento do AVC

Durante o processo de hipóxia, moléculas inflamatórias como proteínas de fase aguda (*Heat-shock proteins* - *HSPs*), histamina, prostaglandina e $\text{TNF-}\alpha$ (*Tumor Necrosis Factor Alpha*) são produzidas no local da injúria. Sua liberação ocorre após morte das células neuronais, e são responsáveis pela ativação das células residentes, tais como astrócitos e células da micróglia, as quais respondem com aumento da liberação de citocinas e espécies reativas do oxigênio e nitrogênio (Peron et al., 2012).

Esses componentes inflamatórios, atuam não somente nas células neurais, como também em células endoteliais da barreira hemato-encefálica, aumentando sua permeabilidade, facilitando assim a entrada de células imunes da periferia (Weinstein,

Möller, 2010). A primeira célula a adentrar são os neutrófilos, cerca de 15 horas após o início da reperfusão. Este atuará pela produção de metaloproteinase -9 (MMP9), espécies reativas do oxigênio e produção de citocinas (TNF- α , CXCL8 e CCL20), contribuindo para aumento da lesão neuronal (Easton, 2013; Xu, Jiang, 2014). Por volta do segundo dia, dá-se início a infiltração de monócitos / macrófagos, estes que, adquirem o perfil pró-inflamatório com aumento da expressão de iNOS, CD16, CD32 e CD11b com consequente aumento da lesão tecidual (Hu et al., 2013)

A ativação destas células se dá através do reconhecimento dos TLRs (*Toll-like receptors*) ou NLR (*Nod-like receptors*) aos padrões moleculares associados aos sinais de perigo (*Damage Associated Molecular Pattern* - DAMPs) provenientes de células mortas, como HSPs, ácido hialurônico e ATP (Saijo et al., 2013). Após esse reconhecimento, vias intracelulares são ativadas culminando na secreção de citocinas pró- e anti-inflamatórias responsáveis pela progressão da resposta inflamatória.

Atualmente, ainda não está claro se a ativação de células da microglia promove melhora ou piora no quadro do AVC. Essa dúvida persiste principalmente porque o resultado final da neuroinflamação dependerá do equilíbrio entre as respostas pró e anti-inflamatórias que estas células podem desenvolver. De fato, assim como para macrófagos, já se aceita uma divisão funcional para estas células, sendo estas divididas em M1, conhecido como classicamente ativado e M2, classificado como alternativamente ativado (Mosser, Edwards, 2009).

O fenótipo M1 está comumente associado com níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias, produção elevada de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, junto a uma alta atividade microbicida e tumoricida. Sua ativação pode ser desencadeada tanto por citocinas da resposta inata quanto adaptativa, como TNF α e IFN- γ respectivamente. Após ativados, os macrófagos começam a secretar diversas citocinas, como IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-23 e TNF α , contribuindo para a ativação futura de respostas Th1 e Th17. Embora esta ativação, promova um perfil eficaz contra agentes infecciosos, em excesso pode dar origem a lesões ao organismo, como o desenvolvimento de neoplasias, distúrbios metabólicos, participação no desenvolvimento de doenças autoimunes bem como agravamento das lesões encontradas no AVC (Murray, Wynn, 2011).

Por sua vez, o fenótipo M2 está associada com a atividade de *clearance* de células apoptóticas, aumento da expressão de receptores *scavenger*, além do aumento de

moléculas envolvidas na remodelação tecidual. Alguns autores dividem esse perfil de resposta de acordo com as ações que estas células desempenham no organismo. Entre as classificações mais aceitas está a separação da população de macrófagos M2 em macrófagos reparadores e macrófagos reguladores (Sica, Mantovani, 2012).

Os macrófagos reparadores consistem em células ativadas por IL-4 e IL-13 e que desenvolvem uma resposta anti-helmintos através de chitinases, enzimas com a capacidade de romper as ligações glicosídicas em chitina, um componente encontrado na membrana de vários helmintos (Murray, Wynn, 2011). Além dessa ação, os macrófagos reparadores expressam arginase, uma proteína importante para a recuperação da matriz celular e reparo tecidual. Em contraste com os macrófagos M1, os reparadores possuem um menor número de moléculas co-estimuladoras e MHC-II, além de níveis baixos de espécies reativas do oxigênio e nitrogênio, o que reduz a sua capacidade para apresentar antígenos aos linfócitos T auxiliares, aumentando a susceptibilidade a infecções (Mosser, Edwards, 2008).

Já os macrófagos reguladores desempenham um papel na supressão da resposta imune, atuando em conjunto de células T reguladoras (Tregs) através da produção de IL-10 e TGF- β . Ao contrário dos macrófagos reparadores, os reguladores exibem níveis razoáveis de MHC-II e moléculas co-estimulatórias, facilitando a diferenciação de linfócitos em células Tregs (Tiemessen et al., 2007). A ativação deste perfil de macrófago é mediada por uma série de fatores, entre os quais os mais distintos são células apoptóticas, IL-10 e complexos imunes. Devido ao seu perfil supressor, estas células mostram uma maior susceptibilidade a infecções além de facilitar a progressão de tumores, porém é uma das diferenciações desejadas para tratamentos de doenças neuroinflamatórias (Dudvarski Stankovic et al., 2016).

Vale observar que a diferenciação dos macrófagos a esses diferentes perfis não é irreversível. De um modo semelhante aos linfócitos T, estas células têm uma plasticidade que permite mudar de um perfil pró-inflamatório para um regulador e vice versa após alterações no microambiente. Exemplos ocorrem com o aumento da presença de células apoptóticas favorecendo a mudança para M2 e o aumento de citocinas pró-inflamatórias auxiliando a diferenciação para M1. Estas mudanças são comumente encontrados em várias patologias, podendo distinguir um bom de um mau prognóstico (MURRAY; WYNN, 2011).

O controle da diferenciação entre esses perfis são determinados em grande parte pela via intrínseca que é ativada pelo estímulo recebido. Estímulos para M1, como LPS que

ativa TLR-4 por exemplo, têm a capacidade de ativar a via do NF- κ B, com produção de citocinas como TNF α e IL-12, além de ativar o IRF3 (*Interferon regulatory factor 3*) que aumentará a produção de IFN- β (*Interferon beta*) . Estímulos de interferons, sejam eles do tipo I (IFN- α e IFN- β) ou tipo II (IFN- γ), promovem ativação de STAT1 (*signal transducer and activator of transcription 1*) e IRF5 (*Interferon regulatory factor 5*) os quais promoverão a indução da enzima iNOS (*Inducible nitric oxide synthase*) que além de produzir NO, induz a expressão de SOCS3 (*supressor of cytokine signaling 3*), cuja ação é a de bloquear STAT6 (*signal transducer and activator of transcription 6*) determinando a polarização de um macrófago M1 (Figura 2).

Para que haja a polarização para o perfil M2 regulador, são necessários estímulos que ativem os fatores de transcrição STAT-3 (*signal transducer and activator of transcription 3*) e c-Maf, os quais induzem o aumento da expressão de IL-4r, ARG1 (*Arginase-1*) e IL-10, além de bloquear a via clássica do NF- κ B (*nuclear factor kappa B*). Já para o perfil M2 reparador, são necessários ativação de IRF-4 (*Interferon regulatory factor 4*), responsável pelo bloqueio da via do IRF-5, e expressão de STAT-6 (*signal transducer and activator of transcription 6*) que induz ARG1 e PPAR γ (*Peroxisome proliferator-activated receptor gamma*). Junto a estes a ativação de STAT6 induz ativação de SOCS1 (*supressor of cytokine signaling 1*) que bloqueia a via do STAT1 mantendo a polarização no perfil M2, (Sica, Mantovani, 2012).

Figura 2 - Mecanismo de polarização dos macrófagos. Esquema das vias intrínsecas ativadas nos macrófagos após estímulos indutores dos perfis M1 e M2.

Fonte: (Sica, Mantovani, 2012).

A predominância de resposta M1 leva a um quadro de maior lesão neuronal provocado principalmente por espécies reativas do oxigênio e nitrogênio (ROS e NOS), piroptose por ativação do inflamassoma, além de diminuição de fatores tróficos. Contudo se a ativação da microglia tiver como preferência o perfil M2, haverá aumento da produção dos fatores neurotróficos, como BDNF (*Brain-derived neurotrophic factor*) e GDNF (*Glial cell line-derived neurotrophic factor*), aumento da fagocitose de células mortas, bem como auxílio no desenvolvimento de novos vasos para nutrir este ambiente (Kohman, Rhodes, 2013; Von Bernhardt et al., 2015).

1.3 Reações dependentes da diminuição de ATP

O Sistema Nervoso Central (SNC) utiliza principalmente a via de fosforilação oxidativa como fonte de energia sendo, portanto, o oxigênio e a glicose seus principais substratos. O metabolismo celular é mantido através do equilíbrio entre a formação e a degradação do ATP (Dirnagl et al., 1999; Tian et al., 2017).

Após minutos de oclusão durante um AVC isquêmico o fluxo sanguíneo é interrompido e há o acúmulo de substratos intracelulares como os produtos de degradação do ATP (adenosina e purinas), além de metabólicos ácidos que levam a uma alteração do pH celular, a diminuição dos substratos e do pH cessa o transporte de elétrons, alterando assim o funcionamento da mitocôndria (Figura 3) (Brouns, De Deyn, 2009; Tian et al., 2017).

Com a diminuição do transporte de oxigênio a via de glicólise anaeróbica é ativada, levando a um acúmulo de lactato, este além de ser uma das marcas do AVC isquêmico é um dos possíveis responsáveis pelos danos posteriores, como aumento da área de infarto e piora no quadro neurológico. Vale ressaltar que, com as vias glicolíticas alteradas há uma diminuição no consumo de glicose gerando uma hiperglicemia local, a qual também é responsável pelo aumento da região de infarto e das sequelas neurológicas (Durukan, Tatlisumak, 2007; Brouns, De Deyn, 2009;).

O mal funcionamento da mitocôndria, bem como o escasso acesso de substratos, diminui a produção de ATP o que prejudica a ação dos transportadores dependentes de ATP como a $\text{Na}^+ / \text{K}^+ - \text{ATPase}$, resultando em um aumento na concentração intracelular de Na^+ . Esta alteração na estabilidade da membrana celular leva à uma persistente despolarização, permitindo a entrada de Ca^{2+} e portanto a liberação de neurotransmissores, como por exemplo do glutamato (Smith, 2004).

O aumento da entrada da Ca^{2+} induz a uma série de eventos intracelulares, como ativação de calpaínas e fosfolipases, que degradam a matriz extra e intracelular. Além disso, o aumento da concentração de cálcio no interior da célula é capaz de alterar a permeabilidade da membrana mitocondrial, facilitando a formação de ROS, bem como a saída de citocromo C, o que ativa a via intrínseca da apoptose (Dirnagl et al., 1999; Smith, 2004).

Figura 3 - Esquema dos mecanismos de morte neuronal desenvolvidos pela diminuição do ATP.

Fonte: Figura adaptada de Hossmann (2009).

Ao mesmo tempo, os processos dependentes de energia, como a recaptura de glutamato pelos astrócitos, e pela membrana pré-sináptica ficam impedidos, o que posteriormente contribui para o aumento de glutamato na fenda sináptica desenvolvendo o quadro de excitotoxicidade (DIRNAGL et al., 1999; Brouns; De Deyn, 2009).

1.4 Excitotoxicidade

Além das citocinas, quimiocinas e mediadores lipídicos, durante o AVC, ocorre também uma massiva liberação do neurotransmissor glutamato (Killestein et al., 2005). O glutamato é um dos principais neurotransmissores envolvidos na comunicação neuronal, principalmente no aprendizado e memória. Este é armazenado em vesículas de neurônios pré-sinápticos e a despolarização da membrana induz sua liberação e consequente ativação dos neurônios pós-sinápticos por meio dos seus receptores, os quais são divididos em duas

famílias: os receptores metabotrópicos acoplados a proteína G (mGLURs 1-8), e os ionotrópicos que ativam canais iônicos (AMPA, Kainato e NMDA) (Kew, Kemp, 2005).

Os receptores metabotrópicos são classificados em três subgrupos com base nas sequências homólogas de seus aminoácidos. São eles: grupo I (mGluR1 e mGluR5), grupo II (mGluR2 e mGluR3), grupo III (mGluR4, mGluR6, mGluR7 e mGluR8) (Pin, Duvoisin, 1995). Os receptores do grupo I estão relacionados com a hidrólise de fosfolipídios de membrana; os receptores do grupo II são ativados por 1S,3R - ACPD e os do grupo III por L - AP4, ambos modulam a atividade da adenilato ciclase (Duvoisin et al., 1995).

Já os receptores ionotrópicos compõem uma família de canais iônicos caracterizados de acordo com seu agonista mais seletivo: N-metil-D-aspartato (NMDA), alfa-amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazolepropionato (AMPA) e kainato (KA). Os receptores AMPA e KA são permeáveis a Na^+ e K^+ e são responsáveis pela rápida ativação da neurotransmissão excitatória no SNC. O receptor do subtipo NMDA ativa canais de Na^+ , K^+ , sendo altamente permeável a Ca^{2+} (Segovia et al., 2001).

O NMDAr é o receptor ionotrópico de glutamato de maior afinidade, envolvido em inúmeros processos fisiológicos e patológicos do sistema nervoso central (SNC). Vale ressaltar que a ação do glutamato sobre o AVC se dá principalmente através da ativação desse receptor (Nandhu et al., 2011).

Sua ação é dependente de despolarização prévia para que ocorra o deslocamento do íon Mg^{2+} , o qual bloqueia seu canal, junto da ligação de dois agonistas, glicina e o glutamato. Essa ativação promove a passagem dos íons de sódio, potássio e principalmente do cálcio, que promove ativação de vias intrínsecas. O NMDAr compreende um tetrâmero formado por duas subunidades Nr1, as quais se ligam a glicina e outras duas subunidades que se ligam ao glutamato. Dentre estas temos seis opções: as subunidades Nr2A-D, comumente expressas nas porções anteriores do cérebro, diencéfalo, mesencéfalo e nas células granulares do cerebelo; há também a subunidade Nr3A-B, estas são menos comuns e expressas principalmente nos períodos iniciais do desenvolvimento, além de neurônios motores e na medula espinal. Recentemente tem se observado que determinadas conformações do NMDAr podem levar tanto a fenômenos importantes para a sobrevivência das células neurais quanto a morte das mesmas (Luo T et al., 2011).

Já foi demonstrado que durante insultos ao SNC as células da microglia são capazes de promover proteção neuronal através do aumento da sinalização glutamatérgica. Esse

fenômeno ocorre, uma vez que ao se ativarem estas células são capazes de interagir fisicamente com neurônios bloqueando a sinalização de neurotransmissores inibitórios. Desta maneira, há um aumento da transdução do sinal excitatório via NMDAr e consequentemente um aumento na transcrição de fatores tróficos como BDNF (*Brain-derived neurotrophic factor*) e GDNF (*Glial cell line-derived neurotrophic factor*) (Chen et al., 2014).

Por outro lado, Habbas e colaboradores demonstraram recentemente que essa sinalização também pode ser modulada por astrócitos de forma deletéria. No modelo animal da esclerose múltipla, o aumento da produção de $\text{TNF-}\alpha$ por leucócitos infiltrantes do SNC induz aumento na produção de glutamato por astrócitos, este glutamato age sobre os neurônios do hipocampo prejudicando o processo de aprendizado desses animais (Habbas et al., 2015).

Em 2010, Hardingham e Bading hipotetizaram que a diferença entre produção de fatores tróficos, ou indução da morte celular é dependente da região do neurônio que foi estimulada. Assim, uma ativação extra-sináptica do NMDAr resultaria em morte neuronal, enquanto que nas fendas sinápticas promoveria a sobrevivência ou ativação. Estas diferenças são resultado da ativação de diferentes vias bem como do perfil de transcrição gênica gerado (Figura 4).

Durante a ativação do NMDAr na fenda sináptica, ocorre o influxo de Ca^{2+} o qual ativa CaMK-IV (*calmodulin-dependent protein kinase IV*) esta promove o recrutamento do CBP (*CREB binding protein*) e ativação do fator de transcrição CREB (*cyclic-AMP response element binding protein*). O CREB por sua vez vai iniciar a transcrição de diversos genes anti-apoptóticos, principalmente por promoverem mitocôndrias mais resistentes ao estresses tóxico e oxidativo. Dentre os genes expressos podemos citar: Atf3 (*transcription factor 3*), Btg2 (*B-cell translocation gene 2*), Bcl6 (*B-cell lymphoma 6*), GADD45gamma (*growth arrest and DNA damage induced gene 45 gamma*), Nr4a1 (*nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1*) e do BDNF (*neurotrophin brain-derived neurotrophic factor*). Outro fator de transcrição envolvido nessa via de sinalização do Ca^{2+} é o NFAT (*nuclear factor of activated T-cells*) ativado após a fosforilação de ERK $\frac{1}{2}$ (*extracellular signal-regulated kinase -1/2*) pelo influxo de Ca^{2+} (Hardingham, Bading, 2010).

Além de aumentar a expressão de genes anti-apoptóticos, a sinalização pelo NMDAr suprime a ação de fatores de transcrição pró-apoptóticos como o FOXO (*forkhead box O*),

que está envolvido principalmente nos processos de injúria e carência de fatores tróficos. Dentre os genes ativados por este fator estão: Bin (*Bcl2-like protein 11*), Puma (*apoptotic protease fator 1*) e FasL (*Fas ligand*). Essa supressão é proveniente da ativação da via PI3K (*phosphatidyl inositol 3-kinase*) e Akt (*Protein kinase B*) que por sua vez promove fosforilação e exportação nuclear do FOXO, impedindo assim sua ação (Luo T, 2011).

Contudo se a ativação do NMDAr ocorre em regiões extra-sinápticas, há desativação da CREB, anulando assim sua atividade anti-apoptótica. Tal fenômeno é dependente da ação da proteína *Jacob*, a qual quando se encontra intra-nuclearmente promove a desfosforilação de CREB (Dieterich et al., 2008). Outra ação da ativação extra-sináptica é a inibição da fosforilação da via da ERK1/2 pela inibição da proteína *Ras*, uma quinase que se encontra anterior nessa via. Por fim, a ação da Akt é inibida e o fator de transcrição FOXO passa a translocar para o núcleo iniciando a transcrição dos genes pró-apoptóticos (Myung et al., 2005).

Dentre as hipóteses para as diferentes ações do NMDAr, esta a composição das subunidades que o compõe. Nesse caso as ações se dão quase exclusivamente pelas subunidades Nr2A e NR2B. A Nr2A se localiza preferencialmente na fenda sináptica e auxilia na sobrevivência da célula através da ativação da PI3K e Akt, bem como a ativação da CaMK IV com fosforilação de CREB e expressão do fator trófico BDNF. Por outro lado a fração Nr2B é a mais prevalente nas porções extra-sinápticas atuando na ativação de FOXO e no decaimento de CREB (Parsons, Raymond, 2014).

A subunidade Nr2B também está associada com a *SynGAP (Ras GTPase activating protein)* que promove a diminuição da ativação da ERK ^{1/2} (Luo T et al., 2011), além de promover o aumento da sinalização de p38, a qual induz apoptose através da ativação de caspase 3 (Xiao et al., 2011).

Figura 4 - Efeitos opostos da sinalização do NMDAR dependente de sua posição. A) Representação da via de ativação de CREB pela ativação sináptica do NMDAR, junto as mudanças promovidas pela sinalização extrassináptica. B) Atuação da sinalização do NMDAR sobre a ativação (sinalização extrassináptica) ou inibição (sinalização sináptica) do fator de transcrição FOXO.

Fonte: (Hardingham, Bading, 2010).

Ainda mais complexo que esta resposta ambígua do glutamato é a capacidade dos neurotransmissores atuarem não apenas nas células residentes do SNC, como também nas células imunes. Já foi demonstrado que a dopamina produzida por células T reguladoras possui a capacidade de suprimir a ativação dos demais linfócitos através do aumento da atividade de AMP cíclico (Cosentino et al., 2007). Outro exemplo, são as células dendríticas que produzem tanto serotonina quanto glutamato e utilizam esses neurotransmissores para facilitar a ativação dos linfócitos T durante a apresentação antigênica (O'Connel et al., 2012).

Vale destacar que a resposta dos neurotransmissores parece atuar não somente em células maduras como também podem influenciar o desenvolvimento de timócitos durante o processo de maturação tímica. Affaticati e colaboradores demonstraram que o glutamato produzido pelas células dendríticas tímicas age nos receptores do tipo NMDA presentes nos timócitos aumentando seu influxo de cálcio culminando na indução de apoptose dessas células via caspase-3. Desta forma, o mecanismo descrito teria uma ação chave no controle de clones autorreativos, auxiliando no processo de tolerância (O'Connell et al., 2006; Pacheco et al., 2006; Cosentino et al., 2007; Affaticati et al., 2011).

Com estes achados, podemos afirmar que a ação dos neurotransmissores no AVC se estende muito além da sua ação direta na excitotoxicidade de neurônios, uma vez que não só as células residentes do SNC, mas também as células imunes infiltrantes, possuem receptores para o mesmo, podendo ter suas respostas moduladas pelos mesmos (Boldyrev et al., 2012).

Sendo assim, avaliar o papel do glutamato sobre a função das células imunes infiltrantes do SNC, tais como neutrófilos, macrófagos e linfócitos, bem como na sua repercussão sobre a resposta das células da glia durante um processo neuroinflamatório se torna um objetivo primordial para a melhor compreensão do desenvolvimento das doenças neurodegenerativas ou neuroinflamatórias, bem como na formulação de novas estratégias de tratamento.

6 CONCLUSÕES

- Os processos de hipóxia e reoxigenação diminuem a viabilidade das células da microglia;
- Durante a reoxigenação ocorre diminuição da atividade das enzimas antioxidantes;
- Células da microglia expressam o NMDAr e produzem glutamato;
- Bloqueio da sinalização do NMDAr em células da microglia durante hipóxia melhora viabilidade celular;
- A sinalização do NMDAr participa da diferenciação de macrófagos para o perfil M1;
- A sinalização do NMDAr atua sobre a produção de NO por neutrófilos;
- Leucócitos produzem glutamato;
- O bloqueio do NMDAr por MK801 reduz área infartada no modelo de MCAO.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS*

- Affaticati P et al. Sustained calcium signalling and caspase-3 activation involve NMDA receptors in thymocytes in contact with dendritic cells. *Cell death and differentiation*.2011; 18 (1): 99–108.
- Banerjee R. *Redox Biochemistry*. Willey-Interscience.2008
- Boldyrev AA, Bryushkova EA, Vladychenskaya EA. NMDA receptors in immune competent cells. *Biochemistry. Biokhimiia*. 2012;77(2):128–34.
- Brouns R, De Deyn PP. The complexity of neurobiological processes in acute ischemic stroke. *Clinical Neurology and Neurosurgery*. 2009; 111(6): 483–495.
- Brüne B et al. Redox control of inflammation in macrophages. *Antioxidants & redox signaling*. 2013; 19 (6): 595–637.
- Chen, Z. et al. Microglial displacement of inhibitory synapses provides neuroprotection in the adult brain. *Nature communications*. 2014; 5 (n): 4486.
- Cosentino M, et al. Human CD4+CD25+ regulatory T cells selectively express tyrosine hydroxylase and contain endogenous catecholamines subserving an autocrine/paracrine inhibitory functional loop. *Blood*. 2007; 109 (2): 632–642.
- Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke : an integrated view. *trends neuroscience*. 1999; 22(n):391–397.
- Dourado DFAR, et al. Glutathione transferase: New model for glutathione activation. *Chemistry - A European Journal*. 2008; 14 (31): 9591–9598.
- Dudvarski Stankovic N, et al. Microglia–blood vessel interactions: a double-edged sword in brain pathologies. *Acta Neuropathologica*.2016; 131 (3): 347–363.
- Durukan A, Tatlisumak T. Acute ischemic stroke: Overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*.2007; 87 (1): 179–197.
- Duvoisin RM, Zhang C, Ramonell KA. Novel metabotropic glutamate receptor expressed in the retina and olfactory bulb. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1995; 15(4): 3075–83.

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. [2011 Jul 15]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Fann DYW, et al. Pathogenesis of acute stroke and the role of inflammasomes. *Ageing Research Reviews*. 2013; 12(4):941–966.

Feigin V, et al. Global and regional burden of stroke during 1990-2010: findings from the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 2014; 383(n): 245-54.

Fonteles AA. Efeito neuroprotetor do ácido rosmarínico no dano neuronal, déficit de memória e resposta inflamatória de camundongos submetidos à isquemia cerebral focal permanente. [Dissertação (Mestre em Farmacologia)]. Fortaleza: Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará; 2013

Francisco LM, Sage PT, Sharpe AH. The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunological Reviews*. 2010; 236 (1): 219–242.

Habbas S, et al. Neuroinflammatory TNF Impairs Memory via Astrocyte Signaling. *Cell*. 2015; 163 (7): 1730–1741.

Hardingham GE, Bading H. Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders. *Nature reviews*. 2010; 11 (10) 682–96.

Hill WD, et al. The NF- κ B inhibitor diethylthiocarbamate (DDTC) increases brain cell death in a transient middle cerebral artery occlusion model of ischemia. *Brain research bulletin*. 2001; 55 (3): 375–386.

Hossmann KA. Pathophysiological basis of translational stroke research. *Folia Neuropathol*. 2009; 47 (3): 213-27.

Hu X, et al. Microglia/macrophage polarization dynamics reveal novel mechanism of injury expansion after focal cerebral ischemia. *Stroke*. 2012; 43 (11): 3063-70.

Keir ME, et al. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol*. 2008; 26 (n): 677–704.

Kew JN, Kemp JA. Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. *Psychopharmacology (Berl)*. 2005; 179 (0033-3158): 4–29.

Kohman RA, Rhodes JS. Neurogenesis, inflammation and behavior. *Brain, Behavior, and Immunity*. 2013; 27 (1): 22–32.

Kreutzberg GW. Microglia: A sensor for pathological events in the CNS. *Trends in Neurosciences*. 1996; 19 (8): 312–318.

Kritis AA, et al. Researching glutamate - induced cytotoxicity in different cell lines: a comparative/collective analysis/study. *Frontiers in cellular neuroscience*. 2015; 9 (n): 91.

Kriz J, Lalancette-Hébert M. Inflammation, plasticity and real-time imaging after cerebral ischemia. *Acta Neuropathologica*. 2009; 117 (5): 497–509.

Lai TW, Shyu WC, Wang YT. Stroke intervention pathways: NMDA receptors and beyond. *Trends in Molecular Medicine*. 2011; 17 (5): 266–275.

Lee S, et al. Middle cerebral artery occlusion methods in rat versus mouse models of transient focal cerebral ischemic stroke. *Neural Regeneration Research*. 2014; 9(7): 757–758.

Luo T, Wu W, Chen B. NMDA receptor signaling: death or survival?. *Front Biol (Beijing)*. 2011; 4 (164): 468–476.

Mattson MP, Meffert MK. Roles for NF-kappaB in nerve cell survival, plasticity, and disease. *Cell death and differentiation*. 2006; 13 (5): 852–860.

Ministério da saúde, [homepage on the Internet]. [acesso em: 2013 mai. 20]. Disponível em: <http://www.brasil.gov.br/sobre/saude/saude-do-idoso/acidente-vascular-cerebral-avc>

Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature reviews Immunology*. 2008; 8 (12): 958–69.

Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nature Reviews Immunology*. 2011; 11 (11): 723–737.

Myung JK, et al. Differential roles of NR2A- and NR2B-containing NMDA receptors in Ras-ERK signaling and AMPA receptor trafficking. *Neuron*. 2005; 46 (5): 745–760.

Nandhu MS, et al. Glutamate and NMDA receptors activation leads to cerebellar dysfunction and impaired motor coordination in unilateral 6-hydroxydopamine lesioned Parkinson's rat: Functional recovery with bone marrow cells, serotonin and GABA. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2011; 353 (1-2): 47–57.

O'Connell PJ, et al. A novel form of immune signaling revealed by transmission of the inflammatory mediator serotonin between dendritic cells and T cells. *Blood*. 2006; 107 (3): 1010–1017.

Pacheco R, et al. Glutamate Released by Dendritic Cells as a Novel Modulator of T Cell Activation. *The Journal of Immunology*. 2006; 177 (n): 6695– 6704.

Parsons MP, Raymond LA. Extrasynaptic NMDA receptor involvement in central nervous system disorders. *Neuron*. 2014; 82 (2): 279–293.

Peron JPS, et al. Central Nervous System Resident Cells in Neuroinflammation : A Brave New World. 2012.

Pin JP, Duvoisin R. The metabotropic glutamate receptors: Structure and functions. *Neuropharmacology*. 1995; 34 (1): 1–26.

Saijo K, Crotti A, Glass CK. Regulation of microglia activation and deactivation by nuclear receptors. *Glia*. 2013; 61 (1): 104–111.

Segovia G, et al. Glutamatergic neurotransmission in aging: A critical perspective. *Mechanisms of Ageing and Development*. 2011; 122 (1) 1–29.

Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *Journal of Clinical Investigation*. 2012; 122 (3): 787–795.

Smith WS. Pathophysiology of Focal Cerebral Ischemia: a Therapeutic Perspective. *Journal of Vascular and Interventional Radiology*. 2004; 15 (1) S3–S12.

Takaki J, et al. L-glutamate released from activated microglia downregulates astrocytic L-glutamate transporter expression in neuroinflammation: the “collusion” hypothesis for increased extracellular L-glutamate concentration in neuroinflammation. *Journal of neuroinflammation*. 2012; 9 (1): 275.

Tian F, et al. Blood purine measurements as a rapid real-time indicator of reversible brain ischaemia. *Purinergic Signalling*. 2017.

Tiemessen MM, et al. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce alternative activation of human monocytes/macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007; 104 (49) 19446–51.

Von Bernhardi R, Eugén-Von Bernhardi I, Rugén J. Microglial cell dysregulation in brain aging and neurodegeneration. *Frontiers in Aging Neuroscience*. 2015; 7 (n): 1–21.

Weinstein JR, Möller T. Microglia in ischemic brain injury. *Future Neurology*. 2010; 5 (2): 227–246.

WHO - World Health Organization . Global Atlas on Cardiovascular Disease Prevention And Control. 2011; 164.

WHO - World Health Organization . The atlas of heart disease and stroke. 2004; 112.

Xiao L, et al. Switching of N-Methyl-D-aspartate (NMDA) receptor-favorite intracellular signal pathways from ERK1/2 protein to p38 mitogen-activated protein kinase leads to developmental changes in NMDA neurotoxicity. *Journal of Biological Chemistry*. 2011; 286 (23): 20175–20193.

Xu X, Jiang Y. The yin and yang of innate immunity in stroke. *BioMed Research International*. 2014; 2014 (n): 807978.