CRISTIANO ROSSATO

**Estudo do Papel do Receptor Ionotrópico de
Glutamato NMDAR na Imunomodulação da
Encefalomielite Experimental Autoimune**

Tese Apresentada ao Departamento de
Imunologia do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São
Paulo, para Obtenção do Título de Doutor
em Ciências.

São Paulo
2016

CRISTIANO ROSSATO

**Estudo do Papel do Receptor Ionotrópico de
Glutamato NMDAR na Imunomodulação da
Encefalomielite Experimental Autoimune**

Tese Apresentada ao Departamento de
Imunologia do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São
Paulo, para Obtenção do Título de Doutor
em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Jean Pierre
Schatzmann Peron

Área de concentração: Imunologia

Versão original

São Paulo
2016

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Rossato, Cristiano

Estudo do Papel do Receptor Ionotrópico de
Glutamato NMDAR na Imunomodulação da Encefalomielite
Experimental Autoimune / Cristiano Rossato;
orientador Jean Pierre Schatzmann Peron. -- São
Paulo, 2016.

87 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Linfócitos T. 2. Receptores de glutamato. 3.
NMDAR. 4. MK801. 5. Encefalomielite experimental
autoimune. I. Schatzmann Peron, Jean Pierre,
orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato: Cristiano Rossato

Título da Tese: Estudo do papel do receptor de glutamato NMDAR na modulação da encefalomielite experimental autoimune

Orientador: Jean Pierre Schatzmann Peron

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:.....

Examinador(a): Assinatura:.....
Nome:
Instituição:.....

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:.....

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **66** nas fls. **07** do livro **03** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Jean Pierre Schatzmann Peron**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Estudo do papel do receptor Ionotrópico de glutamato (Nmdar) Na imunomodulação da encefalomielite autoimune experimental*" do qual participam o(s) aluno(s) **Cristiano Rossato, Verônica Mendes de Moura**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **06.06.2013, com validade de 4 anos**.

São Paulo, 11 de junho de 2013.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador-CEUA - ICB/USP

Profa. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP

Aos meus pais, Asmária e Valdir, com muito amor.

AGRADECIMENTOS

À Deus, primeiramente.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Jean Pierre Schatzmann Peron, pela oportunidade de fazer parte de seu grupo. Obrigado pelos ensinamentos, críticas sinceras, liberdade, igualdade e orientação! Conviver com você e tê-lo como orientador foram duas das mais honrosas experiências de vida que tive até o momento.

Aos meus pais, Valdir e Asmíria, pelo carinho, apoio e incentivo. Ao meu irmão Franco e sua esposa Mariana, pelas incansáveis horas de boas conversas.

À minha esposa Naieli pelo amor, compreensão, carinho e amizade. E a sua família que me acolheu de forma excelente.

Aos meus parentes queridos pela sincera admiração e apoio nos momentos mais belos.

Aos membros da banca de qualificação, o Prof. Alexandre Steiner, e os pesquisadores Evilin Naname Komegae e Vinícius Andrade Oliveira, pelas atenciosas e criteriosas observações.

Aos pesquisadores da Faculdade de Medicina de Marília, Wilson Baleotti Jr, Josiane T. Fukasawa e Roseli Nunes da Silveira Antunes, por plantar a semente do conhecimento e pelo grande incentivo durante a graduação.

Ao meu orientador de mestrado, José Ricardo Jensen, por embasar os fundamentos científicos. Sem seus ensinamentos, a mudança de fase não seria possível. Aos amigos e colegas do Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan, pela amizade e boas lembranças.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Interações Neuroimunes, Andira, Wesley e Ana, Verônica, Juliana, Glauce, Karina, Leandro, Isabella, Carolina, Carla, David, Nagela e por último, porém, não menos importante Lilian, pela amizade, carinho, alegrias e momentos de descontração durante todo esse tempo.

A todas as pessoas do laboratório do Prof. Niels pela amizade e suporte. Ao pessoal do laboratório do Prof. Gustavo por todo apoio e, acima de tudo, a amizade. Aos funcionários, amigos e colegas do Departamento de Imunologia pela amizade e descontração.

Aos amigos e colegas do Instituto Butantan, do ICB IV, da USP, da Faculdade de Medicina, da UNICAMP, UNIFESP e UNESP de Botucatu, que de alguma maneira estiveram presentes nesta caminhada.

Aos professores e pesquisadores Alexandre Alarcon Steiner, Alexandre Salgado Basso, Eliana Faquim de Lima Mauro, Frederico Azevedo da Costa Pinto, João Gustavo Pessini Amarante-Mendes, José Antônio Tavares de Albuquerque, Luiz

Roberto Giorgetti de Britto, Niels Olsen Saraiva Câmara e Rafael Ribeiro Almeida por aceitarem compor a banca de defesa.

À SBiB, pela correção da tese.

À Universidade de São Paulo por proporcionar tudo isso.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Interações Neuroimunes do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo com apoio financeiro da FAPESP e CAPES.

"Coincidence is God's way of remaining anonymous".
Albert Einstein

RESUMO

Rossato C. Estudo do papel do receptor ionotrópico de glutamato NMDAR na imunomodulação da encefalomielite experimental autoimune. [Tese (Doutorado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2016.

As células T exercem papel crucial nas respostas imunes adaptativas e em doenças autoimunes, como a esclerose múltipla. O glutamato, neurotransmissor mais abundante no SNC, age por meio de duas famílias de receptores: metabotrópico e ionotrópico. As células T são alvo do glutamato durante a ativação e apresentação de antígenos, pois está presente nas sinapses imunológicas, porém, pouco se sabe a respeito de seu papel na função das células T. Nós estudamos o papel do NMDAR nas respostas mediadas por células T. *In vitro*, o uso do antagonista MK801 reduziu a linfoproliferação e a síntese de IFN- γ e IL-17A, bem como o NMDA reduziu a proliferação e produção de IFN- γ e IL-17A. *In vivo*, o MK801 reduziu a gravidade da EAE, resultado da menor infiltração de linfócitos Th1 e Th17 no SNC. Além disso, o MK801 reduziu a expressão de *Rorc*, *Il17a*, *Stat4*, *Ccr4*, *Ccr6* e *Ifna2* no SNC. Em suma, esses dados confirmam que o NMDAR exerce papel nas funções mediadas por células T, indicando que as células T são alvos do excesso do glutamato via NMDAR em doenças neuroinflamatórias.

Palavras-chave: Linfócitos T. Receptores de glutamato. NMDAR. MK801. Encefalomielite experimental autoimune.

ABSTRACT

Rossato C. Study of the role of glutamate ionotropic receptor NMDAR in the immunomodulation of experimental autoimmune encephalomyelitis. [thesis (Ph. D. thesis in Immunology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2016.

T cells play a crucial role in adaptive immune responses and autoimmune diseases, such as multiple sclerosis. Glutamate is the most abundant neurotransmitter in the CNS, and it acts through two receptor families: metabotropic and ionotropic. T cells are target of glutamate during activation and antigen presentation, because glutamate is also present in the immunological synapses, however, little is known about its role on T cell functions. We investigated the role of NMDAR in immune-mediated T cell responses. *In vitro*, the use of the antagonist MK801 reduced T cell proliferation and cytokine production (IFN- γ e IL-17A), as well as NMDA reduced lymphocyte proliferation and IFN- γ e IL-17A production, in a dose dependent manner. *In vivo*, MK801 diminished severity of EAE, result of the minor Th1 and Th17 infiltration in the CNS. In addition, MK801 reduced *Rorc*, *Il17a*, *Stat4*, *Ccr4*, *Ccr6* and *Ifna2* expression in the CNS. In short, our data confirm that the NMDAR play a role in T cell-mediated functions, indicating that T cells are target of glutamate excess via NMDAR in neuroinflammatory diseases.

Keywords: T Lymphocytes. Glutamate receptors. NMDAR. MK801. Experimental autoimmune encephalomyelitis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - MK801 reduz a proliferação de linfócitos T CD4 ⁺ e CD8 ⁺ <i>in vitro</i>	42
Figura 2 - MK801 reduz número total de linfócitos T CD4 ⁺ e CD8 ⁺ <i>in vitro</i>	42
Figura 3 - NMDA reduz proliferação de linfócitos T CD4 ⁺ e CD8 ⁺	43
Figura 4 - NMDA reduz número total de linfócitos T CD4 ⁺ e CD8 ⁺	44
Figura 5 - Bloqueio do NMDAR reduz a secreção de IFN- γ e IL-17A <i>in vitro</i>	45
Figura 6 - NMDAR modula a produção de citocinas de forma dose dependente	46
Figura 7 - Bloqueio do NMDAR reduz conversão de células T naíve para células Th17	47
Figura 8 - Bloqueio do NMDAR reduz conversão de células T <i>naíve</i> para células T reguladoras.....	48
Figura 9 - Bloqueio do NMDAR altera a frequência de linfócitos T CD4 ⁺ FoxP3 ⁺ não ativados	49
Figura 10 - Bloqueio do NMDAR <i>in vivo</i> reduz a gravidade da EAE.....	50
Figura 11 - MK801 reduz a proliferação de linfócitos T CD4 antígeno-específicos .	52
Figura 12 - MK801 <i>in vivo</i> reduz a produção de citocinas em animais imunizados com MOG ₃₅₋₅₅	53
Figura 13 - MK801 <i>in vivo</i> não altera a frequência das células apresentadoras de antígenos produtoras de TNF- α	54
Figura 14 - O receptor de glutamato do tipo NMDA modula expressão de moléculas envolvidas na apresentação de antígenos nas células dendríticas.....	56
Figura 15 - MK801 <i>in vivo</i> não altera a frequência das células T reguladoras	57
Figura 16 - MK801 <i>in vivo</i> reduz a infiltração de células Th1 e Th17 no SNC na EAE	59
Figura 17 - MK801 <i>in vivo</i> não altera a frequência de células mononucleares no SNC na EAE	61
Figura 18 - MK801 <i>in vivo</i> diminui a expressão de PD-L1 e I-A ^b em células mononucleares no SNC na EAE	62
Figura 19 - MK801 <i>in vivo</i> altera a expressão gênica global no SNC durante a EAE	63
Figura 20 - NMDAR modula a expressão de <i>Bdnf</i> em esplenócitos totais.....	82
Figura 21 - MK801 <i>in vivo</i> aumenta a produção de IL-10 em animais imunizados com MOG ₃₅₋₅₅	82
Figura 22 - MK801 <i>in vivo</i> altera número de células totais em animais C57BL/6	83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

7-AAD - 7-aminoactinomicina D
ACI - adenilato ciclase I
Akt - proteína quinase B ou PKB
AMPA - alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico
APC - célula apresentadora de antígeno
AVC - acidente vascular cerebral
BDNF - fator neurotrópico derivado do encéfalo
BHE - barreira hematoencefálica
BMDC - célula dendrítica derivada da medula óssea
CaMK - calmodulina quinase
cAMP - adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
CBA - citometria por arranjo de esferas
CCL - ligante de quimiocina CC
CCR - receptor de quimiocina tipo CC
CD - grupo de diferenciação
CFA - adjuvante completo de freund
CFSE - succinimidil éster diacetato de carboxifluoresceína
CREB - proteína ligadora de elemento responsivo de cAMP
CXCR - receptor de chemokine tipo CXC
DC - células dendríticas
DP - desvio padrão
EAAT - transportador de aminoácidos excitatórios (ou sistema XAG)
EAE - encefalomielite experimental autoimune
EM - esclerose Múltipla
ERK - quinase regulada por sinais extracelulares
FSC - espalhamento frontal
FoxP3 - forkhead box P3
GFP - proteína verde fluorescente
iGluR - receptor ionotrópico de glutamato
IL - interleucina

i.p - intraperitoneal
KA - kainato
LPS - lipopolissacarídeo
MAPK - proteínas quinases ativadas por mitógenos
mGluR - receptor metabotrópico de glutamato
NFAT - fator nuclear de células T ativadas
NFκB - fator nuclear de cadeia κ de linfócito B
NKT - células T matadoras naturais
NMDA - n-metil-d-aspartato
NMDAR - receptor de n-metil-d-aspartato
MBP - proteína básica de mielina
MCP-1 - proteína-1 quimiotática de monócitos
MOG - glicoproteína da mielina de oligodendrócitos
MHC - complexo principal de histocompatibilidade
PBMC - células mononucleares do sangue periférico
PD - morte celular programada
PHA - fitohemaglutinina
PKA - quinases dependente de cAMP ou proteína quinase A
PLP - proteolipoproteína
PSGL1 - glicoproteína ligante de P-selectina 1
ROS - espécies reativas de oxigênio
SDF-1α - fator 1α derivado de célula estromal
SNC - sistema Nervoso Central
SSC - espalhamento lateral
TCR - receptor de célula T
Th - T auxiliar
TNF-α - fator α de necrose tumoral
TrkB - Receptor de tirosina quinase B
VCAM-1 - molécula de adesão celular vascular 1
VLA-4 - antígeno muito tardio 4
Xc - antiporter cistina/glutamato
XAG - transportadores glutamato/aspartato
WB - western blot

LISTA DE SÍMBOLOS

α - alfa

β - beta

λ - gama

μ - mu

Sumário

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVO	32
2.1	Objetivos específicos <i>in vitro</i>	32
2.2	Objetivos específicos <i>in vivo</i>	33
3	MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1	Animais experimentais	34
3.2	Indução de EAE nos camundongos C57BL6/j	34
3.3	Extração, cultura celular e estimulação <i>in vitro</i>	35
3.4	Extração de células infiltrantes do sistema nervoso central.....	36
3.5	Dosagem de citocinas	36
3.6	Citometria de Fluxo	37
3.7	Extração, diferenciação, estimulação e ativação de células derivadas de medula óssea	38
3.8	Ensaio de conversão de células T naive em células Th17 ou T reguladoras	39
3.9	Extração de RNA e síntese de DNA complementar (cDNA)	39
3.10	Quantificação por PCR em Tempo Real	40
3.11	Análise Estatística	40
4	RESULTADOS.....	41
4.1	Ensaio de proliferação de células T CD4 ⁺ e CD8 ⁺ na presença de MK801	41
4.2	O NMDAR modula a secreção de IFN- γ , IL-17A e IL-10 <i>in vitro</i>	45
4.3	NMDAR reduz a conversão de células T naive para células Th17 e Treg	47
4.4	NMDAR age diferentemente nas células T reguladoras <i>in vitro</i>	49
4.5	Bloqueio do NMDAR reduz gravidade da EAE.....	50
4.6	Bloqueio do NMDAR reduz proliferação de células T mielina- específicas.....	51
4.7	MK801 reduz a produção de citocinas <i>in vivo</i>	53
4.8	MK801 não afeta a frequência das células apresentadoras de antígenos	54
4.9	NMDAR modula a expressão de MHC nas células apresentadoras de antígenos	55
4.10	MK801 não afeta a frequência das células T reguladoras <i>in vivo</i>	57
4.11	MK801 reduz infiltração de células Th1 e Th17 no SNC durante a EAE.....	58
4.12	MK801 reduz a expressão de MHC-II em microglia e macrófagos	60
4.13	Tratamento com MK801 modula genes na medula espinhal dos animais com EAE.....	63
5	DISCUSSÃO	64
6	CONCLUSÕES.....	74
	REFERÊNCIAS*	75
	APÊNDICE A - Resultados.....	82
	APÊNDICE B - Súmula curricular	84

1 INTRODUÇÃO

As doenças autoimunes afetam por volta de 1% da população mundial e suas principais características são respostas imunes exacerbadas que resultam na quebra de tolerância central e periférica. Dentre estas, podemos citar a esclerose múltipla (EM) que acomete o sistema nervoso central (SNC); e afeta aproximadamente 2 milhões de pessoas no mundo. Sua resposta imune é específica aos neuroautoantígenos, tais como a mielina de oligodendrócitos (MOG), proteína mielínica básica (MBP) ou a proteolipoproteína (PLP) (1). A EM se caracteriza na maioria dos casos por períodos de pico e remissão, ou pode se manifestar de forma primariamente ou secundariamente progressiva, como revisto (2-3).

Os aspectos clínicos observados nos períodos de picos na EM incluem déficits visuais, motores, sensoriais e autonômicos, dependendo da região anatômica do ataque autoimune, os quais são frequentemente seguidos de uma considerável melhora no quadro clínico e um longo período quiescente da doença chamado remissão (4). Aproximadamente um terço dos pacientes progride, dentro de uma a duas décadas, de uma forma branda da doença para a forma chamada de progressiva secundária, onde se observa uma debilitação neurológica que progride de maneira insidiosa levando a óbito, e neste caso, os picos e as remissões não são evidentes (4-5).

Na EM, é evidente a participação das células T CD4⁺. Por exemplo, dentro do SNC, os linfócitos T CD4 e CD8 e células NKT são encontrados em conjunto com as células B e macrófagos nas regiões perivasculares (1). Além disso, anticorpos policlonais são encontrados presentes no líquido cefalorraquidiano, o que sugere que parte da lesão ocasionada na EM é mediada também por deposição de

imunocomplexos e ativação do sistema complemento (6-7).

Uma boa parcela dos dados acerca da fisiopatologia da esclerose múltipla surgiu de modelos animais, como a encefalomielite autoimune experimental (EAE). As origens da EAE datam da década de 1920, quando Koritschoner e Schweinburg induziram inflamação na coluna vertebral de coelhos por meio de inoculação de medula espinhal humana (6). Na década de 1930, Thomas Rivers tentou reproduzir as complicações cerebrais associadas com a vacinação da raiva pela imunização repetida com tecido do SNC em macacos *Rhesus sp.* e coelhos (8). Desde então, a EAE foi desenvolvida em diferentes espécies, incluindo roedores e primatas, e a partir destes estudos, tornou-se claro que a EAE pode reproduzir vários aspectos clínicos, neuropatológicos e imunológicos da esclerose múltipla (9–11).

A EAE pode ser induzida em animais susceptíveis por imunização com antígenos neurais purificados de homogenatos cerebrais, tais como os citados anteriormente: proteína básica de mielina (MBP), proteolipoproteína (PLP) e glicoproteína da mielina de oligodendrócitos (MOG) quando emulsificados em adjuvante completo de Freund. Em camundongos C57BL/6j, a encefalomielite autoimune experimental é induzida pela imunização com MOG₃₅₋₅₅, enquanto que em SJL/j o PLP₁₃₉₋₁₅₁ é o mais utilizado (12). Os animais C57BL/6j têm uma doença com pico aos 15 dias e remissão aproximadamente ao 30º dia pós-imunização, ao passo que os SJL/j apresentam cinética inicial com evolução progressiva a partir do segundo mês (13). Vale ressaltar que assim como EAE, a EM depende de fatores genéticos, particularmente genes do complexo principal de histocompatibilidade, como o HLA-DRB01, que tem sido associado ao estabelecimento da doença.

A transferência adotiva de células T encefalitogênicas específicas para antígenos neurais também induzem EAE (14). Subsequentemente, ocorre a quebra

da barreira hemato-encefálica seguida de infiltração por células T CD4, T CD8, monócitos, macrófagos e neutrófilos, cujas citocinas e fatores inflamatórios ativam células residentes como microglia e astrócitos. O resultado final deste processo inflamatório é desmielinização secundária à intensa morte de oligodendrócitos (15).

A mielina pode ser encontrada no sistema nervoso central. Além disso, a capacidade preferencial das células T mielina-específicas em infiltrar o SNC implica na previa ativação nos tecidos periféricos. Células T específicas para mielina de oligodendrócitos podem ser detectadas nos órgãos linfóides secundários (5-6). No entanto, não se sabe ao certo como tais células T são ativadas na periferia sendo que os oligodendrócitos residem apenas no SNC. Aparentemente, as células apresentadoras de antígenos presentes no SNC migram para os linfonodos drenantes e as ativam, haja vista que exista uma intensa circulação de células do SNC para a periferia e vice versa, como sugerido por trabalhos recentes (16-17).

No modelo de EAE espontânea, em camundongos que expressam o TCR transgênico específico para a proteína proteolipídica (PLP) ou proteína básica de mielina (MBP), as respostas de células T específicas parecem ser ativadas primariamente nos linfonodos cervicais drenantes do SNC (8-9). É possível que alguns antígenos de mielina do SNC sejam normalmente apresentados nos linfonodos cervicais e, em certas condições, podem desencadear a ativação de células T, por exemplo, como resultado de *bystander activation* ou mimetismo molecular, a despeito de agentes patogênicos específicos não terem sido conclusivamente identificados como desencadeadores de esclerose múltipla. É importante pensar que moléculas secretadas durante a apresentação de antígenos pode levar a ativação ou anergia das células T, como as citocinas e possivelmente o glutamato, recentemente descrito como presente na sinapse imunológica (18).

Todavia, pouco se sabe a seu respeito na fisiologia das células T.

Após ativadas na periferia, as células T infiltram o SNC em diferentes ambientes dependendo de sua via de entrada. Por exemplo, atravessar a barreira hematoquímica culmina no espaço subaracnóide, que é a região entre as membranas aracnóideia e pia-máter, onde circula o líquido (4). Por outro lado, atravessar a barreira hemato-encefálica entra no espaço perivascular, que separa a membrana basal da membrana limitante glial. A membrana basal é ligada às células endoteliais dos vasos, enquanto que a membrana limitante glial constitui os astrócitos e as células microgliais.

Na ausência de inflamação, as células endoteliais do cérebro não expressam moléculas de adesão para o contato com as células T ativadas, portanto, tais células não aderem à parede do vaso (4,10). Por outro lado, as células T atravessam a barreira hematoquímica, na ausência da inflamação, por meio de selectinas e moléculas de adesão constitutivamente expressas, o que leva a ideia de que a vigilância imune ocorra principalmente no espaço subaracnóide (4).

Sabidamente a infiltração de linfócitos T CD4 no SNC é dependente de receptores de quimiocinas, como o CCR6, para células Th17 (19) e da integrina VLA-4 para linfócitos Th1 (20). O ligante de CCR6, o CCL20 (do inglês: *CC-chemokine ligand 20*) é constitutivamente expresso por células epiteliais do plexo coróide em camundongos e em seres humanos, o que corrobora a ideia de que as células T atravessam primeiramente a barreira hematoquímica para iniciar a doença (11). Em contraste, o estímulo de células endoteliais da barreira hematoencefálica (BHE) com a interleucina-17 induz descolamento das *GAP junctions* e aumento de MCP-1, IL-6 e IL-8 (CXCL8), facilitando a transmigração de linfócitos Th17, a qual amplifica a resposta inflamatória local culminando na morte de neurônios e

oligodendróцитos mediada por granzima B (21). Tais achados são bem fundamentados na literatura, embora não sabemos se o bloqueio do NMDAR na periferia poderia alterar a infiltração de células no SNC em animais com EAE.

A inflamação na EAE pode ser observada inicialmente no espaço subaracnóide, reforçando a ideia deste ser o local inicial de infiltração de células T (12). Estudos recentes de imagem apontam que o espaço subaracnóide poderia ser o sítio onde as células T CD4 previamente ativadas na periferia seriam reativadas por APCs, e o reconhecimento dos ligantes cognatos resultaria em agregados celulares e proliferação de células T no próprio espaço subaracnóide (13). Essa reativação seria seguida pela ativação das células endoteliais perivasculares, permitindo o recrutamento de células T no espaço perivascular.

Embora os detalhes do processo de indução de inflamação do SNC sejam ainda pouco compreendidos, um estudo sugere que a ativação das células T, possivelmente no espaço subaracnóide, desencadeia tanto a ativação das células da microglia localizadas abaixo da membrana pial, quanto a lesão axonal local, conduzindo à degeneração Wallerina. A ativação de células da microglia distais regula positivamente a expressão de moléculas de adesão na vasculatura parenquimal, bem afastada do espaço subaracnóide (14). Além disso, os astrócitos exercem papel fundamental na manutenção do processo inflamatório. Estes expressam IL-17r e são capazes de secretar altos níveis de quimiocinas e metaloproteinases quando ativadas pela IL-17A (22).

A produção de quimiocina e a sinalização do fator de necrose tumoral (TNF- α) parecem exercer um papel importante na migração e ativação de células T CD4 do espaço perivascular para o parênquima (15). Foi proposto que a força da reativação das células T CD4 determina o grau de inflamação subsequente do parênquima, e

não a capacidade das células T infiltrar o espaço perivascular (16). Tal força depende não apenas da afinidade do TCR com o seu ligante, como do número de complexos epítipo de mielina-MHC disponíveis na superfície da APCs. O aumento da inflamação associado com a presença de células T fortemente reativadas no espaço subaracnóide é atribuído a um aumento da produção de quimioquinas dependente de células T. Em contraste, quando as células T são fracamente ativadas, a expressão de PD-1 (*Programmed cell death protein 1*) aumenta, a qual está associada com a morte de células T (1). Em 2009, foi demonstrado que esse mecanismo era dependente de células dendríticas que aumentava a expressão de PD-1 em células T reguladoras antígeno-específicas, evidenciando o papel das células dendríticas como importantes indutoras de tolerância na EAE (23).

Mais recentemente, foi demonstrado que o glutamato derivado das células dendríticas poderia inibir ou estimular a proliferação de células T, modulando a secreção de IL 2, IL-6, IL-10, TNF- α e IFN- γ (18). Além disso, o glutamato é capaz de induzir morte celular por excitotoxicidade em neurônios (24), entretanto, pouco se sabe a respeito do papel do glutamato na indução de morte celular em linfócitos via NMDAR.

Na ausência de um processo inflamatório, a maioria das DCs residentes apresenta um fenótipo imaturo, caracterizado pela alta capacidade endocítica e baixa expressão de moléculas coestimulatórias e MHC-II (25). No entanto, ao interagir com ligantes microbianos, citocinas inflamatórias ou CD40L, as células dendríticas se ativam podendo estimular a célula T *naïve* ou ainda re-estimular as células T efetoras (26). No SNC, as DCs são primariamente encontradas nas meninges e plexo coróide, regiões ricas de vasos. A inflamação no SNC é acompanhada pela entrada de células dendríticas no SNC. As DCs do SNC são as

mais eficientes em reativar células T CD4⁺ mielina-específicas, ao passo que as microglias e monócitos infiltrantes apresentam papéis distintos na patogênese da EAE (27).

Sabe-se que a ativação das células T mielina-específica desencadeia a expansão de microglias residentes e posteriormente o recrutamento de células mielóides. Em experimentos de quimera de medula óssea, foi observado que a ativação de microglias residentes representaria um dos passos iniciais na patogênese da EAE, que precede e desencadeia a infiltração de células mononucleares do sangue (17-18).

Consistente com essa ideia, a depleção de monócitos ou macrófagos melhora os sinais clínicos da EAE (23,25). Da mesma forma, o bloqueio ou a deleção genética do receptor de quimiocina CCR2, envolvido na circulação de monócitos, previne a doença grave e pode levar a rápida remissão (28). Recentemente, foi observada forte correlação entre a infiltração de monócitos e a progressão ao estágio paralítico da EAE. Mais interessante, os monócitos infiltrantes desaparecem na fase de recuperação, o que evidencia seu papel crucial na progressão da EAE (27). Logo, seria plausível elucubrar que o bloqueio do NMDAR na periferia alteraria o perfil de células inflamatórias do SNC e assim a progressão da EAE.

Bem como os monócitos e células T CD4, as células T CD8 também medeiam a inflamação no SNC. Foi demonstrado que ao inocular o vírus da coriomeningite linfocítica no parênquima cerebral, as células T CD8 vírus-específicas aparecem primeiramente no espaço subaracnóide (29). No entanto, o mecanismo de infiltração de células T CD8 no SNC permanece pouco conhecido. A microscopia intravital em camundongos mostrou que as células T CD8 isoladas de pacientes com esclerose múltipla aderem mais fortemente às vênulas das meninges cerebrais inflamadas do

que as células T CD4 ou células T CD8 de pacientes saudáveis (30). Tal aderência dependia de PSGL1 (do inglês: *P-selectin glycoprotein ligand 1*). Por exemplo, o receptor de PSGL1 é expresso constitutivamente na microvasculatura do plexo coróide. Em contraste, células T CD4 de pacientes na fase aguda da esclerose múltipla mostraram expressão de VCAM-1 (do inglês: *Vascular cell adhesion protein 1*) ao invés de PSGL-1 (30). O desenvolvimento de novas lesões no SNC também se correlacionou com a expressão de CCR5 e CXCR3 (do inglês: *CXC-chemokine receptor 3*) por células T CD8 periféricas (31), sugerindo que as células T CD8 podem contribuir na patogênese da EM em humanos. Por outro lado, sabidamente, as células T CD8 podem eliminar células T CD4 residentes (32). Além disso, a presença de CD8 tem sido associada ao fenótipo de proteção na EAE (33). Vale ressaltar que embora o papel das células T CD8 no SNC pode ser controverso, a infiltração de células T no sítio inflamatório depende da expansão clonal periférica, portanto, mecanismos de sobrevivência ou morte celular na periferia também poderiam modular o estabelecimento da doença.

Ao infiltrarem o sistema nervoso central, as células do sistema imune entram em contato com neurotransmissores, dentre eles: serotonina, dopamina e glutamato. Além disso, diversos tipos celulares (microglia, astrócitos, neurônios, oligodendrócitos) secretam ou regulam os níveis de neurotransmissores no SNC, em especial, o glutamato.

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do SNC, sua liberação é transitória na fenda sináptica neuronal e os níveis de glutamato são finamente regulados pelos astrócitos (34). Com isso, o glutamato contribui para a neurotransmissão, exercendo principalmente a função cognitiva, como aprendizado e memória. Com base em sua homologia de sequência e ativação seletiva, os

receptores de glutamato são divididos em duas famílias: i) os ionotrópicos, como AMPA, KA e NMDA (alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico; cainato e N-metil-D-aspartato, respectivamente); e ii) os metabotrópicos, com oito membros na família, onde o mGlu1R e 5R são essencialmente acoplados à fosfolipase C, enquanto que os mGlu2R, 3R, 4R, 6R, 7R e 8R são acoplados negativamente a proteína G (35).

Sob condições fisiológicas, a depuração do glutamato é realizada por meio do transportador de glutamato de alta afinidade dependente de Na^+ /aspartato/cistina (sistema XAG), o qual é expresso principalmente em astrócitos (36); e através de transportadores de aminoácidos excitatórios (EAATs ou XAG - sistema), também expressos em astrócitos, além de oligodendrócitos e neurônios (37). Em contraste, em condições patológicas, como AVC ou EM, há depleção dos astrócitos locais, com subsequente repovoamento de microglias. Dependendo do contexto de ativação, as microglias expressam diferentes níveis do *antiporter* cistina/glutamato (sistema-Xc) e de transportadores glutamato/aspartato (sistema-XAG) (37,38). Assim, o equilíbrio dos sistemas transportadores de glutamato pode levar a uma acumulação ou depuração do glutamato extracelular (37-38).

A presença do glutamato no microambiente pode estimular células que expressam seus receptores, e a sinalização por ele mediada foi descrita não apenas no SNC (39), mas também em células de vários tecidos periféricos (40). Recentes evidências apontam para um papel importante dos iGluR e mGluR (40-41) em células efectoras e no desenvolvimento das células T. Por exemplo, a ausência do receptor mGLUR4 favorece a diferenciação de células Th17 agravando o quadro de EAE em animais C57BL/6j imunizados com MOG₃₅₋₅₅. Por outro lado, o tratamento com agonistas (do mesmo receptor) induziu aumento de células T reguladoras (42).

No entanto, há escassez de dados no que se refere ao papel do NMDAR durante a diferenciação de células T.

Mais recentemente, foi demonstrado efeito inibitório mediado pelo mGlu5R na proliferação de células T por meio da inibição da IL-6 (18), enquanto que o efeito co-estimulador desencadeado pelo mGlu1R é mediado pelo aumento da secreção de IL 2, IL-6, IL-10, TNF- α e IFN- γ (18). A expressão de mGluR em células T humanas em repouso foi confirmada para os mGlu1R, mGlu2R, mGlu3R e mGlu8R (43). No entanto, a funcionalidade para tais receptores não foi comprovada (44). Observou-se que aumento de cálcio intracelular induz expressão de c-fos e c-Jun, as quais dependem do estímulo via mGluRs do grupo I (45). Este achado contrasta com o trabalho anterior (41) no qual não foram observadas alterações nos níveis intracelulares de cálcio após o estímulo dos mGluRs do grupo I em células T humanas. Relatou-se que, ao contrário das células T humanas, os linfócitos de roedores podem expressar mGluR do grupo III, mas não os mGluR do grupo I ou grupo II (40).

Em 1997, (46) foi demonstrado que o glutamato (radiomarcado) era capaz de ligar aos linfócitos do sangue humano, sugerindo a presença de receptores de glutamato e/ ou seus transportadores nas células T. Posteriormente, foi observado que a expressão dos receptores de glutamato pode variar dependendo do estágio de maturação, por exemplo, os timócitos imaturos (CD4⁻/CD8⁻) expressam preferencialmente o mGlu1R, enquanto o mGlu5R está presente em células maduras (CD4⁺/CD8⁺ e CD4⁺/CD8⁻). Os mGlu2/3R são indiferentemente expressos em todos os níveis de maturação (47). Por análise de imunohistoquímica foi possível concluir que timócitos corticais de ratos (imaturos) expressam fracamente os mGlu2/3R e mGlu4R, e que os timócitos medulares expressam ainda o mGlu5R

(48).

Em 2001, Lombardi et al. foram os pioneiros na descrição da presença de iGluRs em linfócitos T humanos. Os autores demonstraram a funcionalidade dos receptores NMDA, AMPA, bem como receptores KA potenciando o estímulo com PHA ou anti-CD3, os quais induziram o aumento de cálcio intracelular (49). Dois anos depois, Ganor et al. demonstraram que a expressão do receptor de AMPA, iGlu3R, em células T humanas em repouso, promove a adesão mediada por integrina, laminina e fibronectina, e a migração quimiotática induzida pela SDF-1 (50). Normalmente, as células T aderem a tais glicoproteínas de matriz extracelular apenas quando ativadas. O glutamato também regula a migração quimiotática de células T em relação a SDF-1 α (do inglês: *Stromal cell-derived factor -1 α*). O SDF-1 α (ou CXCL12) é expresso constitutivamente tanto na periferia quanto no sistema nervoso e desempenha um papel fundamental em diversas funções imunes e neuronais (50). No entanto, há escassez de dados na literatura acerca do papel do NMDAR na monta da resposta imune periférica e subsequente infiltração de linfócitos T no SNC.

Além dos estudos realizados em células T humanas, Boldyrev et al. (51) demonstraram que linfócitos de roedores também expressam os receptores de NMDA, e medeiam o aumento de cálcio intracelular e espécies reativas de oxigênio (ROS), entretanto, pouco se sabe se o NMDAR modula a produção de citocinas. Sabidamente, os receptores de glutamato (mGluRs e iGluRs) expressos nas células T também apresentam vários ligantes, como a homocisteína e seus derivados metabólicos (ácido canforsulfônico, o ácido homocistéico, ácido sulfínico e ácido cistéico) (52-53); e metabólitos do triptofano (ácido quinolínico e ácido quinurênico). Enquanto o ácido quinolínico é agonista, o ácido quinurênico é antagonista do

NMDAR. No entanto, se fazem necessários mais estudos a fim de integrar o papel dos receptores de NMDA na produção de citocinas pelas células T.

As respostas imunes adaptativas são iniciadas principalmente nos órgãos linfóides secundários quando os antígenos são levados e apresentados às células T por uma célula apresentadora de antígenos (APC), que orienta a ativação e a diferenciação dos linfócitos T virgens (54-55). As DCs imaturas (iDC) residem na maioria dos tecidos, a fim de captar antígenos; são expostas a sinais de perigo produzidos por microrganismos, citocinas inflamatórias, nucleotídeos, e dano celular (56). Após a exposição a tais fatores, as DCs perdem a sua capacidade fagocítica, migram para os gânglios linfáticos drenantes, e maturam adquirindo elevados níveis de proteínas de membrana do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) e moléculas coestimuladoras (CD80 e CD86), além de produzir altos níveis de citocinas.

Nos gânglios linfáticos, as DCs maduras (mDC) apresentam o antígeno capturado e processado às células T, o que leva a polarização dos linfócitos em direção às distintas subpopulações, Th1, Th2 e Th17 (54,55,57). Recentemente, foi demonstrado que durante a maturação e apresentação de antígenos, as DCs liberam glutamato através do sistema-Xc (18). Além disso, após a injeção do adjuvante completo de freund, os níveis de glutamato aumentam em gânglios linfáticos (58). Com isso, sugere-se que o glutamato liberado pelas DCs participaria diretamente na diferenciação das células T durante a apresentação de antígenos. Por exemplo, foi demonstrado o glutamato liberado pelas DCs age, via mGlu5R, diretamente na fase inicial da interação com as células T durante a apresentação de antígenos. Tal receptor é acoplado positivamente à adenilato ciclase (41), o que prejudicaria a produção de IL-6 e, consequentemente, a proliferação de células T

(18). O mecanismo mediado pelo mGlu5R impediria a ativação das células T quando um antígeno não específico é apresentado por uma APC. Assim, o estímulo do mGlu5R poderia levar à anergia de células T não específicas nos nódulos linfáticos (59).

O estímulo do iGlu3R, pelo glutamato contribui para manter a atividade migratória de células T em repouso (50). Por outro lado, o mGlu1R, o qual é acoplado à via de sinalização ERK (41), parece ser o único receptor de glutamato induzido por ativação durante a apresentação de antígenos (18,41). Deste modo, os efeitos inibitórios do mGlu5R são atenuados, ocorrendo o aumento das citocinas Th1 (IL-2 e IFN- γ) e pró-inflamatórias (IL-6 e TNF- α) induzidas pela apresentação de antígenos (18). O efeito coestimulador mediado pelo mGlu1R, em combinação com o efeito inibitório mediado pelo mGlu5R pode constituir um mecanismo de regulação fino, no qual pequenas diferenças na intensidade do estímulo desencadeado pelo TCR permitiria diferentes decisões de destino de célula T entre células T antígeno específica e não específica. Assim, é esperado que a desregulação da liberação de glutamato pelas DCs, ou da sinalização mediada mGluR poderia promover o destino celular imprevisto no que diz respeito à subpopulações de células T. Tais mecanismos teriam implicações importantes para a fisiopatologia da autoimunidade, bem como para doenças de imunodeficiência.

Sabidamente, os receptores metabotrópicos regulam os receptores de NMDAR (60), portanto, é plausível sugerir que os receptores do tipo NMDA participaria na diferenciação das células T.

Os eventos intracelulares desencadeados pelo receptor NMDA devem-se ao aumento influxo de Ca^{2+} . O cálcio intracelular ativa proteínas do grupo da Calmodulina proteína kinase (CaMK). Os membros da cascata da CaMK citosólica regulam a sobrevivência celular através da fosforilação de Akt (proteína kinase B, PKB); e a transcrição gênica através da ativação indireta das MAP kinases, principalmente ERK1/2 que translocam para o núcleo e fosforilam fatores de transcrição como o CREB. Além disso, a CaMK em conjunto com a Calcineurina fosforila o NFAT citoplasmático que migra ao núcleo celular e aumenta expressão dos genes *Foxp3* e *Il2* (interleucina-2) (61).

A Calmodulina Kinase IV (CaMKIV) pode fosforilar e inativar a adenilato ciclase I (ACI), diminuindo o AMP cíclico (cAMP). Níveis elevados de cAMP ativam as cinases dependente de cAMP (PKA), por meio da retroalimentação negativa; a PKA fosforila e inativa a CaMKK. A CaMKK e CaMKIV são também encontradas no núcleo e estimulam a transcrição de genes por meio da fosforilação de fatores de transcrição. Por exemplo, a PKA pode fosforilar o CREB na Ser133, a qual também pode ser alvo da CaMKIV. Isoladamente, a CaMKIV ativa fracamente a transcrição de genes através da fosforilação de CREB, entretanto, sob ativação de CaMKK, a transcrição é fortemente aumentada (62-63).

O fator de transcrição CREB regula diversas funções celulares, incluindo proliferação, sobrevivência e diferenciação. Pode ser induzido por fatores de crescimento e sinais inflamatórios e medeia subsequentemente a transcrição de genes contendo o elemento responsivo de cAMP, tais como: *Il2*, *Il6*, *Il10*, e *Tnfa*. Além disso, foi proposto que a fosforilação de CREB, dependente ou não de ERK 1/2, inibe diretamente a ativação de NF- κ B pelo bloqueio da ligação da proteína ligadora de CREB ao complexo NF- κ B, limitando as respostas próinflamatórias. O

CREB também induz sinais de sobrevivência antiapoptóticos em monócitos e macrófagos. Em células T e B, a ativação de CREB promove proliferação e sobrevivência e regula diferencialmente as respostas Th1, Th2, e Th17 (64). Principalmente, a ativação de CREB é essencialmente necessária para a geração e manutenção de células T regulatórias, pois liga diretamente no sítio 180 do promotor do gene *IL2* (64-65).

Diante do exposto, apesar da grande quantidade de dados acerca da biologia do NMDAR em neurônios, ainda não há dados definitivos a respeito das consequências geradas pela ativação do NMDAR em células do sistema imune. Por exemplo, o NMDAR poderia regular a sobrevivência, ativação e diferenciação das células T? A fim de melhor compreender a fisiologia do NMDAR nas células T, nós elaboramos experimentos *in vivo* e *in vitro* na presença do antagonista ou do agonista do NMDAR. Nos experimentos *in vivo*, nós imunizamos animais C57BL/6 com o neuroantígeno, MOG₃₅₋₅₅, enquanto que nos experimentos *in vitro*, nós utilizamos o MOG₃₅₋₅₅ ou o ativador policlonal anti-CD3. Vale salientar que a escolha desses sistemas mimetiza o contexto de resposta imune a fim de entender se (1) O NMDAR participa da fisiologia do linfócito T (2) A infiltração celular no SNC e a resposta imune global estariam alteradas se bloqueamos o NMDAR na periferia durante a monta da resposta imune.

As respostas para tais perguntas contribuem primariamente para o avanço no conhecimento da neuroimunologia; e ultimamente para o surgimento de novas estratégias terapêuticas para doenças neoplásicas, autoimunes e infecciosas, nas quais os linfócitos T exercem papel fundamental.

2 OBJETIVO

Avaliar o papel do receptor de glutamato NMDA na modulação da resposta imune dos linfócitos T CD4 no modelo de EAE.

2.1 Objetivos específicos *in vitro*

- a) Avaliar o perfil de citocinas secretadas por linfócitos T CD4 ativados *in vitro* na presença ou não de MK801 ou *N-metil-D- aspartato*;
- b) Avaliar por PCR em tempo real a transcrição dos genes que codificam NMDAR, IL-10, IL-17A, IFN- γ , TNF- α e IL-6 em linfócitos T CD4 ativados *in vitro* na presença ou não de MK801 ou *N-metil-D- aspartato*;
- c) Avaliar a proliferação celular *in vitro* com anti-CD3 na presença ou não de MK801 ou NMDA.

2.2 Objetivos específicos *in vivo*

Grupos experimentais: animais C57Bl/6 imunizados com 150µg de MOG₃₅₋₅₅ e tratados ou não com MK801 (0,3 mg/kg) nos dias 0, 1, 2, 3, 4 e 5 pós-imunização. Foram avaliados os seguintes parâmetros:

- a) Frequência de linfócitos Th1, Th17 e Tregs nos linfonodos e baço de animais com EAE ao dia 7 pós- imunização;
- b) Frequência de linfócitos Th1, Th17 e Tregs infiltrantes do SNC de animais com EAE nos dias de pico da doença;
- c) Frequência e fenótipo de macrófagos nos linfonodos e baço de animais com EAE ao dia 7 pós-imunização;
- d) Frequência e fenótipo de microglia no SNC dos animais com EAE nos dias de pico de doença;
- e) Dosar as citocinas IL-2, IL-4, IL-10, IL-17A, IFN-γ e TNF-α nos sobrenadantes de células mononucleares infiltrantes do SNC e de esplenócitos totais.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais experimentais

Foram utilizados camundongos C57BL6/j, fêmeas com 2 a 3 meses de idade mantidos no Biotério de Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP). Os animais foram mantidos em microisoladores contendo 5 animais em cada, com água e ração *ad libitum*. Todos os experimentos foram realizados sob as diretrizes da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

3.2 Indução de EAE nos camundongos C57BL6/j

Os animais foram imunizados por via subcutânea com 200 μ L de uma solução contendo 150 μ g de MOG₃₅₋₅₅ emulsificados em CFA (v/v) a 10 mg/mL de BCG (*Bacillus Calmette-Guérin*). Adicionalmente, foram dadas nos períodos 0 e 48 horas após imunização, 0,2 μ g de toxina de *Bordetella pertussis* (Sigma – Aldrich, São Paulo, SP. Brasil) em 200 μ L de PBS por via intraperitoneal. O grupo experimental foi tratado com 0,3 mg/Kg de MK801 (Sigma) sendo a primeira dose presente na emulsão de MOG₃₅₋₅₅ e outras 4 doses em dias consecutivos por via intraperitoneal. Os animais foram seguidos diariamente e o grau de doença distribuído da seguinte forma:

- 0) sem doença;
- 1) perda do tônus de cauda;

- 2) flacidez ou fraqueza de membros posteriores;
- 3) paralisia de membros posteriores;
- 4) fraqueza de membros posteriores;
- 5) paralisia de membros posteriores ou morte.

3.3 Extração, cultura celular e estimulação *in vitro*

Após a eutanásia, baço e linfonodos inguinais superficiais, periaórticos e sub-axilares foram retirados macerados em PBS. Após maceração cada baço foi adicionado de 2 mL de tampão de lise por 2-3 minutos. As amostras foram então adicionadas de 20-30 mL de PBS e centrifugadas a 450 g por 5 minutos a 4 °C e então ressuspendidas em 5-10 mL de meio RPMI com 10 % SFB. 1×10^6 células foram plaqueadas por poço em placas de 96 poços de fundo redondo. Concomitantemente as amostras foram adicionadas ou não dos seguintes estímulos: NMDA (100 – 3000 μ M), MK801 (100-1000 μ M, Sigma) na presença ou não de anti-CD3 (1-2 μ g/mL, Biolegend, San Diego, CA, USA). As placas foram incubadas por 24, 48 ou 72 h a 36 °C e 5% de CO₂. Nos ensaios de proliferação, antes do estímulo com o anti-CD3, as células foram incubadas com CFSE (5 μ M, Thermo Fisher, São Paulo, SP. Brasil) por 15 minutos em 1 mL de meio RPMI sem suplemento; posteriormente 14 mL de meio RPMI completo foram adicionados ao tubo e então centrifugados. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas e plaqueadas como citado anteriormente. Para os experimentos com os animais com EAE, foi seguido o mesmo protocolo, sendo que os animais estavam ao 7º ou ao 15º dia pós-imunização.

3.4 Extração de células infiltrantes do sistema nervoso central

Após a eutanásia, os animais tiveram o encéfalo e medula espinal extraídos e dissociados em tubo de 50 mL contendo 4 mL de uma solução de 2,5 mg/mL de colagenase D (Roche, São Paulo, SP. Brasil) em HBSS com Ca^{2+} e Mg^{2+} (solução estoque: 10 mg/mL de colagenase D em DMEM) e mantidos por 45-60 minutos em banho maria a 37 °C. A reação foi parada com 60 μL de EDTA (0,5 M) em 15 mL HBSS sem Ca^{2+} e Mg^{2+} . As amostras foram processadas em separadores celulares (cell strainer- BD Falcon, BD bioscience, San Jose, CA, USA) e centrifugadas a 450 g por 5 minutos a 4 °C, retirando o sobrenadante. O pellet formado foi ressuspensionado em 6 mL de Percoll (Sigma) a 25%, e posteriormente, lentamente vertido em novos tubos de 15 mL com 2 mL de Percoll 75% (a partir de percol 100% + HBSS 10X diluído 1:10). O tubo foi centrifugado a 900 g por 20 minutos a temperatura ambiente, sem freio. A fase superior composta de mielina foi desprezada. O anel formado por células mononucleares na intersecção das soluções de Percoll 25% e Percoll 75% foi coletado e transferido para novos tubos de 15 mL contendo DMEM gelado. As células foram centrifugadas a 450 g por 5 minutos a 4 °C e o pellet foi ressuspensionado em 2 mL de meio DMEM. Em seguida, as células foram contadas e utilizadas como desejado.

3.5 Dosagem de citocinas

Os animais foram sacrificados em câmara de CO_2 seguido por deslocamento cervical. As células mononucleares do baço, linfonodos e SNC foram extraídas e cultivadas em DMEM suplementado com 0,1 mM de aminoácidos não essenciais,

0,1 mM de vitaminas, 2 mM de L-glutamina, 100 µg/mL de gentamicina, 0,05 mM de 2β-mercaptoetanol, 1 mM de piruvato de sódio, todos da Gibco BRL (Rockville, MD, USA) e 5% de SFB (Hyclone, GE Healthcare, Chicago, IL, USA) 72 horas, dependendo da citocina analisada, na presença ou não de MOG₃₅₋₅₅ a 50 µg/mL ou 1 µg/mL de anti-CD3. O sobrenadante foi congelado a -80 °C. Foram utilizados kits de CBA da BD Pharmingen, de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante.

3.6 Citometria de Fluxo

Células de linfonodos, baço ou mononucleares infiltrantes do SNC foram incubadas por 20 minutos com anti-CD16/32 da (eBioscience, San Diego, CA, USA) para evitar a ligação inespecífica e posteriormente incubadas com anticorpos específicos por 30 minutos. Inicialmente, utilizamos os anticorpos: anti-CD4, anti-CD11b, anti-CD45, na concentração de 0,5 µg/10⁶ células. As células foram lavadas em PBS e levadas ao citômetro FACS Accuri C6 (BD). Para análise das citocinas intracelulares, 1x10⁶ células foram plaqueadas e estimuladas ou não com MOG₃₅₋₅₅ (50 µg/mL), anti-CD3 (1-2 µg/mL) na presença de brefeldina A (1 µg/mL, Sigma). Após 12 horas, PMA (50 ng/mL, Sigma) e Ionomicina (1 µg/mL, Sigma) foram adicionadas as amostras e incubadas por mais 5 horas. Para análise de células dendríticas e macrófagos utilizamos LPS (1 µg/mL, Sigma) durante 6 horas na presença de brefeldina A (1 µg/mL, Sigma). Após incubação as placas foram centrifugadas a 450 g por 5 minutos a 4 °C. As amostras seguiram então como o descrito acima seguido da etapa de permeabilização, fixação e marcação das citocinas. Para tanto, após a marcação de superfície, as amostras foram centrifugadas novamente e ressuspensas em 50 µL de cytofix/cytoperm (BD

Pharmingen®) por 30 minutos. Após esse período, foram adicionados 50 µL de permwash (BD Pharmingen®) e as placas foram centrifugadas novamente e o sobrenadante descartado. Após homogeneização ao vórtex, as amostras receberam 25 µL de permwash contendo os anticorpos anti-IL-17 FITC ou anti-IFN- γ APC ou anti-TNF- α APC (Células dendríticas) na diluição de 1:100 e incubadas a 4 °C durante 30 minutos. Após incubação as amostras foram lavadas e ressuspensas em 200 µL de paraformaldeído a 1%. As aquisições foram realizadas no citômetro de fluxo FACS Accuri C6® (BD Pharmingen®) adquirido com verba do projeto (FAPESP JP número: 2011/18703-2).

3.7 Extração, diferenciação, estimulação e ativação de células derivadas de medula óssea

Para extração das células da medula óssea, retiramos os fêmures e tíbias de camundongos C57BL/6, e realizado o lavado de medula óssea. Posteriormente, cultivamos as células em meio RPMI suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) e 1% de Antibiótico (penicilina, estreptomicina) em placas de 24 poços, durante sete dias em estufa a 37°C, na presença do fator estimulador de colônia granulocítica e monocítica (GM-CSF). Nos 0, 4° e 7° dias foram adicionados 20 ng/ml de GM-CSF. No 7° dia as células dendríticas são estimuladas com LPS 1 µg/mL e cultivadas por 24 horas tornando-as células dendríticas maduras. As células foram utilizadas no 8° dia. Em um volume final de 2 mL foram plaqueadas 5×10^5 células por poço.

3.8 Ensaio de conversão de células T naive em células Th17 ou T reguladoras

Para extração das células T, retiramos os linfonodos e baço de camundongos C57BL/6. Maceramos os órgãos linfoides em separador celular (70 μ M) e isolamos as células CD4⁺ CD62L⁺ por separação magnética (MACS Miltenyi, Bergisch Gladbach, Germany). O rendimento girou em torno de 94%. Cultivamos 5x10⁴ células em meio IMDM (Th17) ou RPMI (Treg) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) e 1% de Antibiótico (penicilina, estreptomicina) em placas de 96 poços, com anti-CD3 ligado a placa (2 μ g/ml; eBioscience) e anti-CD28 (2 μ g/ml; Biolegend) durante 5 dias em estufa à 37 °C. Para diferenciação Th17 foram adicionados TGFb (10 ng/ml, Sigma), IL-23 e IL-6 (30 ng/ml, Sigma), enquanto que as condições Treg receberam apenas TGFb (10 ng/mL, Sigma). Nas últimas 4 horas, as células Th17 foram incubadas com Brefeldina (1x) PMA (*Phorbol Myristate Acetate*) (50 ng/mL) e ionomicina (1 μ g/mL) ambos da Sigma.

3.9 Extração de RNA e síntese de DNA complementar (cDNA)

O mRNA foi extraído pelo reagente Trizol (Invitrogen, EUA) e a concentração do RNA total purificado determinado em espectrofotômetro a 260/280 nm. A integridade e qualidade das preparações foram verificadas por eletroforese em gel de agarose 1,0%. A síntese de cDNA foi realizada por meio de reação de transcrição reversa a partir do RNA total purificado. Para tanto, foram adicionados Oligo (dT), água livre de RNase e dNTPs ao RNA. A mistura foi incubada a 65 °C por 5 minutos. Após este período, a reação foi interrompida por imersão em gelo por 1 minuto. Em

seguida foram adicionados o tampão específico 5X concentrado (250 mM Tris-HCL pH 8,3, 375 mM KCL e 15 mM MgCl₂), Ditioneitol e a enzima SuperScript III RNase H- Reverse Transcriptase (Invitrogen, EUA). As amostras foram aquecidas a 50 °C por 50 minutos e as reações inativadas a 70 °C por 15 minutos. Utilizamos termocicladores da Applied Biosystems.

3.10 Quantificação por PCR em Tempo Real

Foi avaliada a expressão de mRNA das células dos compartimentos coletados em variadas condições, por PCR em tempo real (qPCR), particularmente o RT² Profiler™ PCR array (Qiagen, São Paulo, SP. Brasil). Cada amostra de cDNA convertido a partir do kit anterior foi adicionada a uma reação contendo os iniciadores das citocinas ou receptores. As reações foram incubadas no aparelho Applied Biosystems HTT 7500. A expressão gênica é dada relacionando o grupo controle com o grupo tratado (MK801) e os gráficos são gerados a partir do sítio de internet do próprio fabricante.

3.11 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software computacional *GraphPad Prism*® (GraphPad Software, Inc. La Jolla, CA USA, versão 5.0). Os testes t-Student e ANOVA foram utilizados, seguidos pelo pós-teste de Tukey. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Os dados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão ou média $\pm$ erro padrão nas curvas EAE.

4 RESULTADOS

4.1 Ensaio de proliferação de células T CD4⁺ e CD8⁺ na presença de MK801

Resolvemos iniciar nossos estudos avaliando se o NMDAR seria capaz de modular a resposta linfoproliferativa de células T efetoras obtidas de animais C57BL/6. O ensaio de proliferação de esplenócitos (**Figura 1A e B**) frente o estímulo com anti-CD3 na presença do antagonista MK801 demonstrou que o bloqueio do NMDAR diminuiu significativamente a proliferação e o número total tanto de linfócitos T CD4⁺ quanto de T CD8⁺ (**Figura 2A e B**).

Figura 1 - MK801 reduz a proliferação de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ *in vitro*. Esplenócitos totais foram marcados com CFSE (2,5 µg/mL) e plaqueados na presença ou não de anti-CD3 (1 µg/mL) e de MK801 nas referidas doses e cultivados por 72h. Dados representativos de 3 experimentos independentes. Em **A**, células CD4⁺; Em **B**, células CD8⁺. One-way Anova. Média ± DP. *p< 0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

Figura 2 - MK801 reduz número total de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ *in vitro*. Cultura de esplenócitos totais (5×10^6) plaqueados na presença ou não de anti-CD3 (1 µg/mL) e de MK801 nas referidas doses e cultivados por 72h. Dados representativos de 3 experimentos independentes. Em **A**, células CD4⁺; Em **B**, células CD8⁺. One-way Anova. Média ± DP. *p< 0,05; ***p<0,001.

Por outro lado, o estímulo do NMDAR por meio da adição do agonista NMDA na cultura de esplenócitos marcados com CFSE estimulados com anti-CD3 só foi capaz de diminuir a proliferação nas concentrações superiores a 400 μ M. Esse efeito foi observado tanto nas células CD4⁺ quanto em células CD8⁺ (**Figura 3A e B**). Uma redução significativa no número total de células só foi observado na dose de 2 mM de NMDA (**Figura 4A e B**).

Figura 3 - NMDA reduz proliferação de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺. Esplenócitos totais foram marcados com CFSE (2,5 μ g/mL) e plaqueados na presença ou não de anti-CD3 (1 μ g/mL) ou de NMDA nas referidas doses e cultivados por 72h. Em **A**, células CD4⁺; Em **B**, células CD8⁺. Dados representativos de 3 experimentos independentes. Média $\pm$ DP. One-way Anova * $p < 0,05$. Média $\pm$ DP.

Figura 4 - NMDA reduz número total de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺. Cultura de esplenócitos totais (5×10^6) plaqueados na presença ou não de anti-CD3 (1µg/mL) ou de NMDA nas referidas doses e cultivados por 72h. Em **A**, células CD4⁺; Em **B**, células CD8⁺. Dados representativos de 3 experimentos independentes. Média $\pm$ DP. One-way Anova * $p < 0,05$. Média $\pm$ DP.

4.2 O NMDAR modula a secreção de IFN- γ , IL-17A e IL-10 *in vitro*

Para avaliar o perfil de citocinas, nós coletamos sobrenadante obtido do ensaio de proliferação de esplenócitos e foi possível observar que o bloqueio do NMDAR pelo MK801 reduziu a produção do IFN- γ e da IL-17A (**Figura 5A e B**), ao passo que o estímulo com o NMDA (200 μ M) restaurou a produção de ambas as citocinas, como observado na figura 4. Além disso, as concentrações de 0,4 mM e 1 mM induzem aumento da produção de IFN- γ e IL-17A (**Figura 6A e B**) em esplenócitos estimulados com anti-CD3, enquanto que doses mais elevadas, como 2 mM ou 3 mM reduzem a produção das mesmas. A citocina anti-inflamatória IL-10 apresentou-se reduzida mesmo nas doses mais baixas, como a de 100 μ M (**Figura 5C**).

Figura 5 - Bloqueio do NMDAR reduz a secreção de IFN- γ e IL-17A *in vitro*. Ensaio de dosagem de citocinas por citometria de fluxo de sobrenadante de esplenócitos cultivados com ou sem anti-CD3 (1 μ g/mL) por 72h na presença ou não do agonista e/ou antagonista do NMDAR. Em **A**, dosagem de IFN- γ ; Em **B**, de IL-17A. One-way Anova * $p < 0,05$. Média $\pm$ DP.

Figura 6 - NMDAR modula a produção de citocinas de forma dose dependente. Dosagem de citocinas pelo método CBA (*Cytometric Bead Array*) no sobrenadante de esplenócitos estimulados com anti-CD3 (2 μ g/mL) por 72h na presença ou não de NMDA em diferentes concentrações (100-3000 μ M). Em **A**, dosagem de IFN- γ ; em **B**, IL-17; em **C**, IL-10. Dados representativos de 2 experimentos independentes. One-way Anova * $p < 0,05$ em relação ao anti-CD3 sem NMDA.

4.3 NMDAR reduz a conversão de células T naíve para células Th17 e T reguladoras

Para avaliar o papel do NMDAR na diferenciação das células T, cultivamos células T *naíve* em condições diferenciadoras para Th17, na presença ou não do NMDA e combinado ou não com o MK801. De forma interessante, como demonstrado na figura 6, observamos um ligeiro aumento da diferenciação das células Th17 na presença do NMDA na concentração de 100 μM (**Figura 7A**), enquanto que o bloqueio pelo MK801 (500 μM) (**Figura 7B**) reduziu para menos de 1% a diferenciação das células Th17. Em relação às células T reguladoras, o NMDA na concentração de 20 μM aumentou a diferenciação das células Tregs, ao passo que o bloqueio pelo MK801, em ambas as concentrações, reduziu a diferenciação das células T reguladoras (**Figura 8A e B**).

Figura 7 - Bloqueio do NMDAR reduz conversão de células T naíve para células Th17. Ensaio de diferenciação e citometria de fluxo de células diferenciadas em condições Th17 na presença do agonista (NMDA) e/ou diferentes doses do antagonista (MK801). Painel superior: **A**, controle, NMDA 20 μM e 100 μM , sem MK801. No painel inferior: **B**, representação gráfica. **C**, NMDA 20 μM + 100 μM MK801; NMDA 100 μM + 500 μM MK801. Gates indicam células CD4⁺IL-17⁺Foxp3⁻.

Figura 8 - Bloqueio do NMDAR reduz conversão de células T *naïve* para células T reguladoras. Ensaio de diferenciação e citometria de fluxo de células diferenciadas em condições Tregs na presença de TGF- β (20 ng/mL) e do agonista (NMDA) e/ou diferentes doses do antagonista (MK801). Paineis superior: **A**, controle, NMDA 20 μ M e 100 μ M, sem MK801. No painel inferior: **B**, representação gráfica. **C**, NMDA 20 μ M + 100 μ M MK801; NMDA 100 μ M + 500 μ M MK801. *Gates* indicam células CD4⁺Foxp3⁺.

4.4 NMDAR age diferentemente nas células T reguladoras *in vitro*

Para avaliar o papel do NMDAR na sobrevivência das células FoxP3⁺, nós conduzimos ensaios de citometria de fluxo utilizando animais FoxP3 GFP, a qual está localizada sob o promotor do gene *Foxp3* e evidencia as células T reguladoras. Foi possível identificar uma redução nas células CD4⁺ FoxP3⁺ quando os esplenócitos foram cultivados na presença apenas do antagonista do NMDAR, principalmente nas doses 0,5 mM e 1 mM (**Figura 9A**). Não foi possível identificar diferença significativa quando utilizamos o agonista do NMDAR (**Figura 9B**).

Figura 9 - Bloqueio do NMDAR altera a frequência de linfócitos T CD4⁺ FoxP3⁺ não ativados. Cultivo de esplenócitos com ou sem anti-CD3 (1 μg/mL) por 72h na presença do agonista e/ou antagonista do NMDAR em diferentes concentrações (μM). Em **A**, frequência de células FoxP3⁺, sem estímulo anti-CD3+anti-CD28; Em **B**, com estímulo anti-CD3+anti-CD28. Dados representativos de 2 experimentos independentes. One-way Anova * p < 0,05. Média ± DP.

4.5 Bloqueio do NMDAR reduz gravidade da EAE

Para estudar o papel do NMDAR na imunomodulação *in vivo*, utilizamos o modelo da EAE em animais C57BL/6 imunizados com MOG₃₅₋₅₅ em adjuvante completo de Freund, como descrito nos materiais e métodos. Os animais foram acompanhados diariamente analisando o escore clínico da doença, conforme descrito no material e métodos. De forma interessante, como demonstrado na figura 10, os animais imunizados e tratados com o antagonista MK801 apresentaram uma redução significativa na EAE quando comparados aos controles.

Figura 10 - Bloqueio do NMDAR *in vivo* reduz a gravidade da EAE. Escore clínico da EAE em animais C57BL/6 imunizados com MOG₃₅₋₅₅ (150 µg/animal). Os animais do grupo MK801 receberam injeções diárias do antagonista (0,3 mg/Kg) até o dia 5, como ilustrado pelas setas claras. O pico da doença ocorre aproximadamente no 14º dia pós-imunização (DPI). A seta preta indica o dia da eutanásia. Dados representativos de 5 experimentos independentes. Two-way ANOVA. Média ± SEM. *p=0,036. n= 5-8 animais por grupo.

4.6 Bloqueio do NMDAR reduz proliferação de células T mielina-específicas

Para avaliar se o NMDAR age nas células T mielina-específicas, nós realizamos ensaio de proliferação antígeno específico ao dia 7 pós-imunização. Como pode ser observado na figura 11, de fato a presença do MK801 reduziu a proliferação de células T antígeno-específicas, ao passo que o NMDA não apresentou efeito. Além disso, o MK801 induziu um aumento significativo na produção de IL-10 (**Figura 11C**). Quando incubamos as células por 30 minutos com o MK801 ou NMDA, as diferenças observadas na capacidade proliferativa das células e na síntese de IL-10 desaparecem.

Figura 11 - MK801 reduz a proliferação de linfócitos T CD4 antígeno-específicos. Ensaio de proliferação de esplenócitos e linfonodos retirados ao dia 7 pós-imunização de animais imunizados com MOG₃₅₋₅₅ (150 µg) em adjuvante completo de freund (CFA). As células foram marcadas com CFSE (2,5 µg/mL) e cultivadas com MOG₃₅₋₅₅ (100 µg/mL) por 72h na presença do agonista (500 µM) e/ou antagonista MK801 (100 µM). O grupo “30 min” recebeu o estímulo por apenas 30 minutos. Em **A**, R2 representa o percentual de células T CD4⁺ que proliferaram; em **B**, ilustração em gráfico de barras dos dados em R2; em **C**, dosagem de IL-10, e em **D**, de TNFα, dos sobrenadantes coletados após 72 horas do ensaio de proliferação. Dados representativos de 3 experimentos independentes. One-way Anova * p < 0,05. Média ± DP.

4.7 MK801 reduz a produção de citocinas *in vivo*

Para avaliar o perfil de citocinas *in vivo*, nós cultivamos células do linfonodo ou esplenócitos por 3 dias na presença de MOG₃₅₋₅₅ e coletamos o sobrenadante. Foi possível detectar redução significativa na produção de IL-2, IL-6, IL-17A, TNF- α e IFN- γ no sobrenadante de células do linfonodo dos animais tratados com MK801 quando comparado aos animais controles (**Figura 12A**). No sobrenadante de esplenócitos houve redução apenas das citocinas IL-17A e IL-6 (**Figura 12B**).

Figura 12 - MK801 *in vivo* reduz a produção de citocinas em animais imunizados com MOG₃₅₋₅₅. Dosagem de citocinas pelo método CBA (*Cytometric Bead Array*). Ao dia 7, animais imunizados com MOG₃₅₋₅₅ (150 μ g) em adjuvante completo de Freund (CFA) foram sacrificados e os linfonodos (**A**) e o baço (**B**) extraídos. Após processamento dos tecidos, as células foram plaqueadas e reestimuladas com MOG₃₅₋₅₅ por 72h. O grupo MK801 (barra branca) recebeu 5 doses do antagonista do NMDAR via i.p. na concentração de 0,3 mg/kg por animal. Dados representam 2 experimentos independentes. One-way Anova * $p < 0,05$. Média $\pm$ DP.

4.8 MK801 não afeta a frequência das células apresentadoras de antígenos

Para avaliar se o NMDAR modula o perfil de células apresentadoras de antígenos *in vivo*, nós imunizamos os animais C57BL/6 com MOG₃₅₋₅₅ na presença ou não do MK801 e avaliamos a presença de células dendríticas (CD11c⁺) e macrófagos (CD11b⁺) secretoras de TNF- α . A figura 13 mostra que o tratamento com MK801 não alterou a frequência destas populações, tampouco alterou a secreção de TNF- α , tanto no baço quanto nos linfonodos drenantes quando comparado aos controles.

Figura 13 - MK801 *in vivo* não altera a frequência das células apresentadoras de antígenos produtoras de TNF- α . Em **A**, citometria de fluxo mostrando frequência de células dendríticas (CD11c) e macrófagos (CD11b) produtores de TNF- α . Em **B**, representação em gráfico de barras. Ao dia 7, animais imunizados com MOG₃₅₋₅₅ (150 μ g) em adjuvante completo de freund (CFA) foram sacrificados e os linfonodos e o baço extraídos. Após processamento dos tecidos, as células foram plaqueadas e reestimuladas com LPS (1 μ g/mL) por 24h. O grupo MK801 recebeu 4 doses do antagonista do NMDAR via i.p. na concentração de 0,3 mg/kg de animal. Dados representam 2 experimentos independentes. One-way Anova * $p < 0,05$. Média $\pm$ DP.

4.9 NMDAR modula a expressão de MHC nas células apresentadoras de antígenos

Apesar de não obtermos diferença na síntese de TNF- α por APCs, resolvemos avaliar se, por outro lado, moléculas de apresentação antigênica estavam alteradas. Sendo assim, por meio de experimentos de diferenciação de células CD11c⁺ derivadas da medula óssea (BMDC) de animais C57BL/6, observamos que o tratamento com MK801 diminuiu a frequência de células positivas para MHC II (I-A^b) na presença de LPS (**Figura 14 C**), bem como intensidade média de fluorescência (**Figura 14 A**). Além disso, houve redução na frequência de células CD80⁺ na presença do antagonista nas células dendríticas maduras (mDC), ao passo que o uso do agonista reduziu o percentual de células CD80⁺ nas células dendríticas imaturas (iDC). Embora houvesse redução no percentual de células CD80⁺ na presença no MK801 nas iDC, a intensidade média de fluorescência aumentou. Em constraste, nas mDC, tanto o uso do agonista quando do antagonista do NMDAR diminuiu a expressão do CD80. A expressão de CD86 e PD-L1 (não mostrado) também não apresentou mudança quando comparado ao seu respectivo controle.

Figura 14 - O receptor de glutamato do tipo NMDA modula expressão de moléculas envolvidas na apresentação de antígenos nas células dendríticas. O gráfico ilustra a frequência, a contagem de células totais e a intensidade média de fluorescência (MFI). Em **A**, % CD11c⁺; em **B**, número absoluto de DCs; em **C**, % CD80; em **D**, MFI de CD80; em **E**, % CD86; em **F**, MFI de CD86; em **G**, % de IAb; em **H**, MFI de IAb. As células dendríticas foram cultivadas na presença (mDC) ou não (iDC) de LPS (20 ng/mL); NMDA (500 μ M); MK801 (100 μ M). One-way Anova * $p < 0,05$. Média $\pm$ DP.

4.10 MK801 não afeta a frequência das células T reguladoras *in vivo*

Para avaliar a influência do NMDAR sobre as células T reguladoras, nós imunizamos animais C57BL/6 FoxP3-GFP com MOG₃₅₋₅₅ e avaliamos a frequência das células T reguladoras em animais tratados ou não com MK801. De acordo com a figura 15, não houve alteração na frequência de células FoxP3⁺ no baço e linfonodos drenantes quando comparadas aos controles.

Figura 15 - MK801 *in vivo* não altera a frequência das células T reguladoras. Citometria de fluxo mostrando frequência de células T reguladoras CD4⁺FoxP3-GFP⁺. Ao dia 7, animais imunizados com MOG₃₅₋₅₅ (150 µg) em adjuvante completo de freund (CFA) foram eutanasiados e os linfonodos e baço extraídos. Após processamento dos tecidos, as células foram marcadas com anti-CD4 PercP. O grupo MK801 recebeu 5 doses de MK801 via i.p. na concentração de 0,3 mg/kg por animal. Em **A**, representação da análise em Software do Accuri C6; em **B**, dados plotados em gráfico de barras. Dados representam 2 experimentos independentes. One-way Anova * $p < 0,05$. Média $\pm$ DP.

4.11 MK801 reduz infiltração de células Th1 e Th17 no Sistema Nervoso Central durante a EAE

Para verificar se a redução no escore da EAE nos animais tratados com MK801 se relacionava com uma redução na infiltração de células T encefalitogênicas no SNC dos animais, realizamos análise por citometria de fluxo das populações Th1 e Th17 infiltrantes. Para tanto, animais C57BL/6 imunizados com MOG₃₅₋₅₅ e tratados ou não com MK801 tiveram o SNC retirado e as células mononucleares infiltrantes extraídas de acordo com o protocolo descrito na seção material e métodos. As amostras foram então plaqueadas, estimuladas e submetidas ao protocolo para análise por citometria de fluxo das células produtoras de IFN- γ ou IL-17A. Como podemos observar na figura 16, o bloqueio do NMDAR reduz não apenas a frequência de células Th1 e Th17 infiltrantes, como também o número absoluto destas populações quando comparado aos controles.

Figura 16 - MK801 *in vivo* reduz a infiltração de células Th1 e Th17 no SNC na EAE. Citometria de fluxo mostrando frequência de células T produtoras de IFN- γ (**A**, frequência de células à esquerda, número absoluto à direita) e IL-17 (**B**) em células mononucleares extraídas do SNC. Ao dia 14, os animais imunizados com MOG₃₅₋₅₅ (150 μ g) em adjuvante completo de Freund (CFA) foram sacrificados e o SNC extraído. Após o processamento, as células foram plaqueadas e reestimuladas com MOG₃₅₋₅₅ por 24h. O grupo MK801 recebeu 5 doses do antagonista do NMDAR via i.p. na concentração de 0,3 mg/kg de animal. Dados representam 3 experimentos independentes. One-way Anova * $p < 0,05$. Média $\pm$ DP.

4.12 MK801 reduz a expressão de MHC II em microglias e macrófagos

Consequente, nós realizamos a análise de citometria de fluxo de células da microglia e mononucleares infiltrantes em animais C57BL/6 imunizados com MOG₃₅₋₅₅ tratados ou não com MK801. Observamos que o MK801 não altera a frequência de macrófagos infiltrantes (CD11b⁺ CD45^{High}) tampouco a frequência de células da microglia (CD11b⁺CD45^{Low}) no SNC quando comparado aos controles (**Figura 17A e B**). Por outro lado, a população de microglia (Mi) diminuiu significativamente a expressão de I-A^b e PD-L1, enquanto que a população de macrófagos/mononucleares (MO) não apresentou mudança na expressão dessas moléculas (**Figura 18A e B**).

Figura 17 - MK801 *in vivo* não altera a frequência de células mononucleares no SNC na EAE. Em **A**, citometria de fluxo mostrando frequência de macrófagos (MO) ou microglias (Mi) de mononucleares extraídas do SNC. Ao dia 14, os animais imunizados com MOG₃₅₋₅₅ (150 µg) em adjuvante completo de freund (CFA) foram sacrificados e o SNC extraído. Após o processamento, as células foram marcadas com anti-CD45-PerCP; anti-CD11b-APC. O grupo MK801 recebeu 5 doses do antagonista do NMDAR via i.p. na concentração de 0,3 mg/kg de animal. Em **B**, gráfico de barras representando a análise por citometria. Dados representativos de 3 experimentos independentes. One-way Anova * $p < 0,05$. Média $\pm$ DP.

Figura 18 - MK801 *in vivo* diminui a expressão de PD-L1 e I-A^b em células mononucleares no SNC na EAE. Citometria de fluxo mostrando frequência de macrófago (MO) ou microglia (Mi) de mononucleares e a expressão de I-A^b e PD-L1 (**A**) extraídas do SNC. Ao dia 14, os animais imunizados com MOG₃₅₋₅₅ (150 µg) em adjuvante completo de freund (CFA) foram sacrificados e o SNC extraído. Após o processamento, as células foram marcadas com anti-CD45-PerCP e anti-CD11b-APC. O grupo MK801 recebeu 5 doses do antagonista do NMDAR via i.p. na concentração de 0,3 mg/kg animal. Em **B**, gráfico de barras representando a intensidade média de fluorescência de IAb e PDL1 de células CD45^{high} (superior), e células CD45^{low} (inferior). Dados representam 3 experimentos independentes. One-way Anova * $p < 0,05$. Média $\pm$ DP.

4.13 Tratamento com MK801 modula genes na medula espinhal dos animais com EAE

Para avaliar de maneira mais ampla o que o bloqueio do NMDAR modulou na EAE, nós realizamos a expressão diferencial de genes da resposta imune inata e adquirida na medula espinhal de animais C57BL/6 imunizados com MOG₃₅₋₅₅ tratados ou não de MK801. Foi possível observar que o bloqueio do NMDAR, de fato, induziu alterações significativas no perfil de expressão gênica. Genes pró-inflamatórios foram negativamente regulados, enquanto que os genes supressores foram regulados positivamente (**Figura 19**). Dentre os genes suprimidos estão: *Mbl2*, *CSF2*, *Ticam1*, *Rorc*, *Tlr9*, *Il1a*, *C5ar1*, *Tlr2*, *Irf7*, *Traf6*, *Tlr7*, *Slc11a1*, *Cd86*, *Tlr3*, *Itgam*, *Cxcl10*, *Ccl12*, *Stat3*, *Nikbia*, *C3* e *Lyz2*. Por outro lado, os genes ativados foram *Ifng2*, *Il17a*, *H2-Q10*, *Ccr4*, *Ccr6*, *Fasl*, *Stat4* e *Mpo*.

Figura 19 - MK801 *in vivo* altera a expressão gênica global no SNC durante a EAE. Ao dia 14 pós-imunização com MOG₃₅₋₅₅ (150 µg) em adjuvante completo de freund (CFA), tratados ou não com MK801, foram eutanasiados e o SNC extraído. O RNAm foi extraído da porção distal da medula espinhal. O grupo MK801 recebeu 5 doses de MK801 via i.p. na concentração de 0,3 mg/kg animal. Em **A**, verde: os genes regulados negativamente; em vermelho, os regulados positivamente. Em **B**, os genes abaixo da linha central estão regulados negativamente, enquanto os situados acima, positivamente. Dados representam *n* de 3 animais por grupo. Limiar de significância: 1,5x de diferença.

5 DISCUSSÃO

No que concerne às doenças autoimunes, as células T CD4⁺ participam de forma essencial no processo de indução e estabelecimento das lesões. Em geral, infiltram o órgão alvo e interagem com células residentes e seus diversos mediadores, influenciando o curso da doença. Nesse trabalho nós demonstramos que o NMDAR exerce um papel importante na indução da encefalomielite autoimune experimental, por um mecanismo dependente de células T CD4⁺, pois observamos tanto *in vitro* quanto *in vivo*, que o bloqueio ou estímulo do NMDAR modula a produção de citocinas e a linfoproliferação. Neste sentido, o principal achado deste trabalho foi demonstrar que o glutamato, agindo através de seu receptor ionotrópico NMDAR, participa nas funções fundamentais de sobrevivência, proliferação e diferenciação dos linfócitos T CD4⁺, os quais entram em contato com esse neurotransmissor em vários momentos, porém essencialmente durante a apresentação de antígenos e na inflamação do SNC.

Inicialmente, embora não mostrado, buscamos avaliar se a expressão dos receptores de NMDA estaria presente nas células T. Para tanto, separamos em células T naive (CD4⁺ CD62L⁺), células T efetoras (CD4⁺ CD62L⁻) e células T reguladoras (CD4⁺ FoxP3⁺) e realizamos ensaios de qPCR para as subunidades NR1 (*Grin1*) e NR2 (*Grin2a-d*). Entretanto, não foi possível identificar a expressão do RNAm para o NMDAR nessas populações celulares. Esses dados contrariam parcialmente alguns dados da literatura em relação à expressão ausente no NR1, pois foi observada sua expressão em linfócitos de ratos (51) e timócitos de camundongos (66). Por outro lado, nossos dados estão em linha com o primeiro trabalho no que diz respeito à expressão ausente do NR2, porém contrariam o

segundo, no qual foram detectadas todas as subunidades do NR2 (*Grin2a-d*) em timócitos CD4⁺ CD8⁻, sugerindo que a expressão gênica do NMDAR pode ser transitória ou mesmo ausente em linfócitos maduros de animais C57BL/6.

Em seguida, nós realizamos ensaio de proliferação de esplenócitos com anti-CD3 na presença do antagonista (MK801) ou do agonista (NMDA) do NMDAR, a fim de elucidar o papel funcional do NMDAR durante a resposta imune, e observamos que a presença do MK801 diminuiu a proliferação de células CD4⁺ e CD8⁺, dado a menor frequência de células com baixa marcação de CFSE, sugerindo que o antagonista do NMDAR bloqueia os eventos intracelulares envolvidos na proliferação e/ou sobrevivência desta população celular. Por outro lado, o uso do agonista NMDA em concentrações superiores a 0,4 mM reduziu a proliferação de esplenócitos.

Os dados da literatura corroboram esses achados, pois à medida que se aumenta a concentração do NMDA, diminui-se a proliferação de PBMC de sangue humano (67). Além disso, estudo prévio realizado no laboratório demonstrou que a via das MAP quinases é uma das vias intracelulares moduladas pelo NMDAR (68). Esses dados suportam a hipótese de que os receptores de NMDAR estão presentes nos linfócitos e são funcionais, assim como sugerido por estudos anteriores, nos quais foram demonstrados (69-70) que o N-Metil-D-Aspartato (250 μ M) aumenta a produção de espécies reativas do oxigênio em linfócitos (51) e induz a fosforilação de ERK 1/2 em células T CD4 de animais DO11.10 (68).

Sabidamente, as espécies reativas do oxigênio são capazes de ativar a fosforilação de ERK 1/2 (71). A produção direta de ROS (72) seria dependente do influxo de cálcio (Ca²⁺), possivelmente via NMDAR. Pelo menos duas vias de ativação de ERK poderiam ainda estar envolvidas neste contexto. Ambas seriam

exercidas devido ao aumento do glutamato extracelular induzido pelo próprio NMDAR e seu ligante (69-70). O glutamato ligaria aos receptores do tipo AMPA que induz diretamente a ativação das MAPK via Lyn (73); e indiretamente via a síntese e secreção do BDNF (do inglês: *Brain Derived Neurotropic Factor*), que por sua vez ligaria ao seu ligante TrkB que ativaria a via de sinalização de ERK 1/2 (74). Aparentemente, ambas as vias estão sendo simultaneamente ativadas, pois observamos que o estímulo com o NMDA aumentou a expressão do *Bdnf* na concentração de 500 μ M. No entanto, se faz necessário uma maior investigação para desvendar o quanto cada via contribui para tal ativação.

Dado que o NMDA aumenta a fosforilação de ERK 1/2 (68), nós realizamos ensaios de curva dose resposta em esplenócitos estimulados com anti-CD3 na presença do NMDA em diferentes concentrações, a fim de avaliar se o NMDAR seria capaz de modular a produção de citocinas. Primeiramente, observamos que o MK801 bloqueia a produção de IL-17 e IFN- γ . Por outro lado, o estímulo do NMDAR com o seu agonista NMDA aumentou a IL-17A e o IFN- γ nas doses 200 μ M, com pico em 400 μ M, ao passo que a IL-10 diminui em doses a partir de 100 μ M, quando comparado ao controle. Esses dados são contrários aos da literatura no que diz respeito à produção de IFN- γ , pois foi observado diminuição desta citocina na presença do NMDA (500 μ M) quando as células foram estimuladas com fitoemaglutinina (PHA) (75). A possível explicação para essa discrepância seria o tempo no qual foi avaliada a presença da citocina. Naquele trabalho os autores avaliaram 18 horas após o estímulo com PHA, enquanto que os dados demonstrados aqui foram obtidos de experimentos com 72 horas de estímulo com o anti-CD3. Em contraste, o bloqueio do NMDAR aboliu a secreção de IL-17, TNF α , IFN- γ , o que nos sugere que NMDAR participaria da diferenciação das células T. De

fato, observamos que a conversão de células T *naïve* para células Th17 estava reduzida. Mais interessante, a conversão para células T reguladoras (FoxP3⁺) também diminuiu. Pensamos, porém, que tal redução possa ser dar mais às custas da redução na viabilidade celular do que a um efeito direto na diferenciação destas populações, haja vista que o MK801 reduziu significativamente a fosforilação de ERK1/2, tanto *in vivo* quanto *in vitro* (68).

Considerando que a manutenção e a sobrevivência celular podem ser influenciadas com as oscilações no nível de cálcio intracelular por meio do bloqueio ou do estímulo dos canais iônicos, nós realizamos cultivo de esplenócitos estimulados com anti-CD3, na presença de doses crescentes do MK801 ± NMDA. O uso do antagonista MK801 reduziu significativamente o número total de células CD4⁺ ou CD8⁺. De fato, o MK801 nas concentrações de 500/1000 µM diminuiu significativamente o número de células totais, ao passo que o uso do NMDA também reduziu o número total de células quando utilizado nas concentrações 2 mM, sugerindo que as células do sistema imune podem sofrer o fenômeno de excitotoxicidade, observada em neurônios. Esses dados corroboram nossos achados anteriores. Foi demonstrado que o uso do antagonista do NMDAR aumentava a morte celular de forma dose dependente (aproximadamente 80% das células eram anexina V⁺). Vale mencionar que 1 mM de MK801 induziu morte celular em 90% das células, visto pela marcação positiva de 7-AAD (68). Além disso, foi demonstrado que o bloqueio do NMDAR, por vários antagonistas, reduz a linfoproliferação com estímulo de anti-CD3, incluindo o MK801 nas doses de 100 e 300 µM (35).

Por outro lado, o NMDA na concentração de 400 µM reduziu o número total de células, corroborando os dados da literatura que afirmam que 500 µM do NMDA

aumenta a frequência de células necróticas (de 1,4% do controle para 44,7% dos linfócitos tratados com NMDA) (51). Em 2013, Fickinger demonstrou que 500 μ M de NMDA não alterava a viabilidade celular em células T ativadas (68), o que sugere que o NMDAR exerce funções distintas nas células T *naïve* e ativadas.

Para testar essa hipótese, nós cultivamos esplenócitos totais na presença ou não de anti-CD3+anti-CD28 e observamos que o NMDA não altera a frequência de células T reguladoras *in vitro*, ao passo que o bloqueio do NMDAR reduz a frequência de células Treg somente nas células não ativadas, o que sugere que o NMDAR é diferencialmente expresso durante a ativação celular, entretanto, não foi possível testar essa hipótese.

Com base nos dados anteriores, nós buscamos avaliar se o bloqueio do receptor de NMDA seria capaz de modular a resposta imune na EAE. Para tanto, nós injetamos o antagonista do NMDAR, o MK801, durante a imunização dos animais C57BL/6j com MOG₃₅₋₅₅ e nos dias 1, 2, 3, 4 e 5 pós-imunização e seguimos por 15 dias o quadro clínico da EAE. O pico da doença reduziu em aproximadamente 50% comparado ao controle, indicando que o receptor de NMDA participa, pelo menos parcialmente, da monta da resposta imune na EAE. Esses dados corroboram os da literatura afirmando que o bloqueio do NMDAR com memantina reduz déficit motor na EAE em ratos Lewis (76), entretanto, o tratamento com memantina começou no dia 7 pós-imunização, período no qual a resposta imune já está estabelecida.

O menor escore clínico da EAE observado nos animais tratados com o antagonista MK801 poderia ser devido a menor proliferação de células T mielina-específicas. Para testar essa hipótese, nós realizamos ensaio de proliferação *recall* e observamos que o bloqueio do NMDAR *in vitro* diminuiu a proliferação de células T

mielina-específicas, corroborando os dados *in vivo* de gravidade de EAE. Vale ressaltar que, quanto menor o número de células T mielina-específica geradas, menor seria a infiltração de células T mielina-específicas no SNC, o que explicaria, pelo menos em partes, a menor infiltração de células no grupo tratado com MK801. Acompanhado a menor proliferação, o MK801 aumentou significativamente a produção de IL-10, o que nos levou a pensar na hipótese de que a IL-10 teria sido produzida por células T reguladoras.

A fim de verificar se a frequência de células T reguladoras poderia ser afetada na presença do MK801 *in vivo*, nós imunizamos animais C57BL/6 FoxP3-GFP na presença do MK801 (administrado i.p. diariamente durante 5 dias) e no dia 7 nós retiramos baço e linfonodos (inguinais superficiais, axilares e para-aórticos) e avaliamos por citometria de fluxo a presença de células CD4⁺ FoxP3GFP⁺. Apesar de a frequência de células CD4⁺ ter aumentado significativamente, não observamos diferença na frequência de células T reguladoras, sugerindo que a melhora no escore da EAE seja, pelo menos em parte, independente das células T reguladoras naturais. Foi reportado que a IL-10 poderia ser provida pelas Tregs CD4⁺ Foxp3⁺, reduzindo assim, a frequência de células T IL17A⁺ e T IFN γ ⁺IL17A⁺ (77). Além disso, a sinalização da IL-10 nas células Tregs e Th17 limita a inflamação mediada por células Th17 (77-78). Em conjunto, esses dados suportam um papel específico para o NMDAR na indução de IL-10 em células do sistema imune, porém, não foi possível comprovar qual a fonte exata de IL-10.

Como citado anteriormente, nos ensaios *in vitro* com esplenócitos totais, o MK801 reduziu significativamente a frequência de células FoxP3⁺ somente em células não ativadas, ao passo que o agonista NMDA não exerceu efeito sob a frequência de células FoxP3⁺ nas mesmas condições. Provavelmente as células

dendríticas produzem altas concentrações de glutamato quando ativadas durante a apresentação de antígenos (18), o que seria plausível pensarmos que as células T reguladoras já estariam habituadas ao contexto de “excesso” de glutamato, logo, seriam resistentes à excitotoxicidade glutamatérgica.

Ademais, outro mecanismo de proteção de morte celular seria devido à presença da dopamina, a qual também pode ser produzida por células T reguladoras (79). A dopamina é capaz de modular os níveis de Ca^{++} protegendo as células da morte por excitotoxicidade, como descrito em neurônios (80).

Sabidamente, as células T reguladoras necessitam do constante estímulo do TCR para a manutenção de suas funções supressoras (81). O bloqueio do NMDAR, neste caso, prejudicaria o influxo de Ca^{++} , ausentando as células do estado de anergia induzida por ativação. Em conjunto, podemos sugerir que o NMDAR exerce papel crucial na manutenção da capacidade supressora das células T reguladoras.

Em nossos experimentos *in vitro* demonstramos que o MK801 bloqueou a produção de citocinas características da EAE em esplenócitos totais. A fim de entender se há alguma relação entre a síntese de citocinas e o receptor de NMDA *in vivo*, nós induzimos a EAE na presença do MK801 e observamos que o antagonista do NMDAR também foi capaz de diminuir a produção de citocinas clássicas da EAE, sugerindo que a melhora no quadro da EAE é devido à mudanças no perfil de resposta nos órgãos linfóides secundários, em especial, nas células apresentadoras de antígenos, uma vez que participam da diferenciação e da expansão de clones de células T mielina-específicos.

Nossos resultados demonstraram que embora a frequência de macrófagos e células dendríticas TNF- α positivas nos linfonodos e baço permaneceu inalterada ao dia 7 após imunização. Nos ensaios *in vitro* com BMDC o MK801 diminuiu a

expressão de MHC-II e CD80 nas células dendríticas maduras (ativadas com LPS) indicando que o efeito do MK801 ocorre também nas células apresentadoras de antígenos. Todavia, o estímulo do NMDAR também reduziu a expressão de I-A^b CD80. Em conjunto, esses dados sugerem que o NMDAR exerce de fato um papel na ativação e fenótipo das BMDCs.

Em seguida, realizamos experimentos no órgão alvo no intuito de verificar se as diferenças também estavam ali presentes. Avaliando as células características da EAE, Th1 e Th17, foi possível verificar diminuição no SNC não apenas em frequência, mas também em número absoluto, o que explicaria os dados de menor gravidade da doença em animais tratados com o antagonista do NMDAR, o MK801.

O mesmo não foi observado para as populações de células residentes do SNC. Não foi possível detectar diferença significativa no *pool* de microglia/ monócito ao pico da doença, porém, a expressão de I-A^b e PD-L1 diminuiu de maneira significativa nas microglias (CD45^{low}), sugerindo que o efeito supressor do MK801 ocorre também nas células residentes no SNC. Essa ideia é apoiada por um trabalho no qual se observa que bloqueio do NMDAR reverte a ativação de células da micróglia (82).

No modelo de EAE induzido com MOG₃₅₋₅₅, a medula espinhal é alvo da infiltração de linfócitos T CD4⁺ mielina-específicos (1). A fim de verificar de uma forma mais ampla se o tratamento com o antagonista do NMDAR alteraria o perfil de resposta imune diretamente no SNC, nós conduzimos experimentos de *PCR array* avaliando genes da resposta imune inata e adquirida. Nós observamos que o tratamento com MK801 regulou negativamente a expressão de genes pró-inflamatórios, dentre eles, as quimiocinas *Ccl5*, *Ccl12*, *Ccr5* e *Cxcl10*; as citocinas *Il1α*, *Il6*, *Il23* e *Gmcsf*; os fatores de transcrição *Irf7*, *Jak2*, *Myd88*, *Nfkb*, *Stat1*, *Stat3*,

Tbx21 e *Rorc*; além de outros genes como *Mapk1*, *Nlrp3* e *Tlr*. Por outro lado, o tratamento dos animais imunizados com MK801 aumentou a expressão de genes supressores da resposta imune, dentre eles, as quimiocinas *Ccr4*, *Ccr6*, *Ccr8* e *Cxcl10*; as citocinas *Il2*, *Il5*, *Il10*, *Tnfa*, *Ifna* e *Ifnb* e os fatores de transcrição *Irf3*, *Stat4* e *Stat6*, indicando que o tratamento com o MK801 suprime a resposta imune no SNC.

Esses dados são corroborados parcialmente com os resultados obtidos da análise da concentração de citocinas presente no homogenato da porção distal da medula espinhal, os quais mostram um aumento significativo de IL-10 nos animais tratados com MK801 quando comparado aos animais EAE controle. Apesar de não detectarmos diferença estatística nas citocinas IL-2, IL-6, IL-17A, IFN- γ e TNF- α , esses dados reforçam a ideia que o bloqueio do NMDAR pode favorecer uma resposta supressora *in vivo*.

O uso do antagonista de NMDAR poderia *per se* reduzir o número de células totais, desta forma, alteraria o resultado da imunização, uma vez que vários clones de linfócitos, incluindo o clone mielina-específico, não estariam mais presentes. Pensando nisso, nós conduzimos experimentos tratando animais não imunizados e observamos que o tratamento com MK801 alterou significativamente a celularidade nos linfonodos, ao passo que no timo, baço e medula óssea, houve uma redução sem diferença significativa, a não ser unicamente na população de blastos presente na medula óssea. A diminuição nos blastos da medula óssea poderia diminuir também o desenvolvimento e maturação de novas células, incluindo as que migrariam para o SNC durante o decurso da doença. Consequentemente, uma menor média no escore clínico seria observada.

Em conjunto, essas são evidências que suportam a hipótese de que o MK801 possui um efeito supressor na resposta imune. Agindo diretamente e indiretamente nos linfócitos T e nas células apresentadoras de antígenos, uma vez que participam da diferenciação e da expansão de clones de células T específicos na periferia. Em contraste, demonstramos um efeito no sistema nervoso central, principalmente no fenótipo das células residentes. O efeito supressor do MK801 nas células da microglia ainda é alvo de muitas questões, pois dados da literatura apontam para um papel mais importante dos linfócitos T CD4⁺ na iniciação da neuroinflamação (83), ao passo que a infiltração de mononucleares seria um evento posterior à ativação das células residentes do SNC (27). Isso leva a pensar que o efeito do MK801 nas células residentes do SNC é indireto, ou seja, devido a menor infiltração de linfócitos. De maneira interessante, tal afirmação está parcialmente correta, pois quando diferenciamos células dendríticas da medula óssea e as maturamos com LPS na presença do MK801 o efeito se sustenta, o que indica também um efeito supressor direto nas células derivadas da medula óssea. Os dados da literatura suportam a hipótese que o MK801 também bloqueia a ativação de células da microglia (82).

Em resumo, este estudo constitui a base para a dissecção do papel NMDAR em células do sistema imune, particularmente as células T e células dendríticas. Mostramos que o NMDAR regula as funções de sobrevivência, diferenciação e proliferação celular. Este conhecimento poderá ultimamente contribuir para a abertura de novas estratégias de tratamento de neoplasias, autoimunidades e doenças infecciosas.

6 CONCLUSÕES

- ✓ O NMDAR participa da sobrevivência, proliferação e diferenciação dos linfócitos T CD4 e T CD8;
- ✓ Os linfócitos T CD4⁺ FoxP3⁺ ativados respondem de forma distinta aos não ativados;
- ✓ Ao contrário do bloqueio do NMDAR *in vitro*, o uso do MK801 *in vivo* não altera a frequência de células T reguladoras;
- ✓ A imunização dos animais C57BL/6 na presença do MK801 reduz a gravidade da EAE;
- ✓ O infiltrado inflamatório no SNC induzido pela imunização com MOG₃₅₋₅₅ é muito menor no grupo tratado com o MK801 do que no grupo não tratado;
- ✓ A melhora do quadro da EAE nos animais C57BL/6 parece ser devido à mudança do perfil inflamatório e da menor infiltração de células no SNC.

REFERÊNCIAS*

1. Goverman J. Autoimmune T cell responses in the central nervous system. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(6):393–407.
2. Rodriguez M. Effectors of demyelination and remyelination in the CNS: implications for multiple sclerosis. *Brain Pathol*. 2007 Apr;17(2):219–29.
3. Lassmann H, van Horssen J. The molecular basis of neurodegeneration in multiple sclerosis. *FEBS Lett*. 2011 Dec;585(23):3715–23.
4. Steinman L. A molecular trio in relapse and remission in multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol*. 2009 Jun;9(6):440–7.
5. Bhat R, Steinman L. Innate and adaptive autoimmunity directed to the central nervous system. *Neuron*. 2009 Oct 15;64(1):123–32.
6. Gold R. Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain*. 2006 Jul 1;129(8):1953–71.
7. Scolding NJ, Morgan BP, Houston WA, Linington C, Campbell AK, Compston DA. Vesicular removal by oligodendrocytes of membrane attack complexes formed by activated complement. *Nature*. 1989 Jun 22;339(6226):620–2.
8. Rivers TM, Sprunt DH, Berry GP. Observations on attempts to produce acute disseminated encephalomyelitis in monkeys. *J Exp Med*. 1933 Jun 30;58(1):39–53.
9. Wekerle H. Lessons from multiple sclerosis: models, concepts, observations. *Ann Rheum Dis*. 2008 Dec;67 Suppl 3:iii56–60.
10. Hohlfeld R, Wekerle H. Immunological update on multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol*. 2001 Jun;14(3):299–304.
11. del Rey A, Klusman I, Besedovsky HO. Cytokines mediate protective stimulation of glucocorticoid output during autoimmunity: involvement of IL-1. *Am J Physiol*. 1998 Oct;275(4 Pt 2):R1146–51.
12. Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med*. 2005 Jan 17;201(2):233–40.
13. Oksenberg JR, Baranzini SE, Sawcer S, Hauser SL. The genetics of multiple sclerosis: SNPs to pathways to pathogenesis. *Nat Rev Genet*. 2008 Jul;9(7):516–26.
14. Mo C, Chearwae W, O'Malley JT, Adams SM, Kanakasabai S, Walline CC, et al. Stat4 isoforms differentially regulate inflammation and demyelination in experimental allergic encephalomyelitis. *J Immunol*. 2008 Oct 15;181(8):5681–90.

*De acordo com:
International Committee of Medical Journal Editors.
[Internet]. Uniform requirements for manuscripts
submitted to Biomedical Journal: sample
references. [updated 2011 Jul 15]. Available from:
<http://www.icmje.org>

15. Pahan K, Schmid M. Activation of nuclear factor- κ B in the spinal cord of experimental allergic encephalomyelitis. *Neurosci Lett*. 2000 Jun 16;287(1):17–20.
16. Engelhardt B, Carare RO, Bechmann I, Flügel A, Laman JD, Weller RO. Vascular , glial , and lymphatic immune gateways of the central nervous system. *Acta Neuropathol*. Springer Berlin Heidelberg; 2016;132(3):317–38.
17. Louveau A, Smirnov I, Keyes TJ, Eccles JD, Rouhani SJ, Peske JD, Derecki NC, Castle D, Mandell JW, Lee KS, Harris TH, Kipnis J. Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. *Nature*. 2015 Jul 16;523(7560):337–41.
18. Pacheco R, Oliva H, Martinez-Navío JM, Climent N, Ciruela F, Gatell JM, et al. Glutamate released by dendritic cells as a novel modulator of T cell activation. *J Immunol*. 2006;177(10):6695–704.
19. Reboldi A, Coisne C, Baumjohann D, Benvenuto F, Bottinelli D, Lira S, et al. C-C chemokine receptor 6-regulated entry of TH-17 cells into the CNS through the choroid plexus is required for the initiation of EAE. *Nat Immunol*. 2009 May;10(5):514–23.
20. Rothhammer V, Heink S, Petermann F, Srivastava R, Claussen MC, Hemmer B, et al. Th17 lymphocytes traffic to the central nervous system independently of α 4 integrin expression during EAE. *J Exp Med*. 2011 Nov;208(12):2465–76.
21. Kebir H, Kreyenborg K, Ifergan I, Dodelet-Devillers A, Cayrol R, Bernard M, et al. Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat Med*. 2007 Oct;13(10):1173–5.
22. Das Sarma J, Ciric B, Marek R, Sadhukhan S, Caruso ML, Shafagh J, Fitzgerald DC, Shindler KS, Rostami A. Functional interleukin-17 receptor A is expressed in central nervous system glia and upregulated in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroinflammation*. 2009 Jan;6:14.
23. Yogev N, Frommer F, Lukas D, Kautz-neu K, Karram K, Ielo D, et al. Article Dendritic Cells Ameliorate Autoimmunity in the CNS by Controlling the Homeostasis of PD-1 Receptor + Regulatory T Cells. 2009;
24. Sattler R, Tymianski M. Molecular Mechanisms of Glutamate Receptor-Mediated Excitotoxic Neuronal Cell Death. 2001;24(1):107–29.
25. Kivisäkk P, Imitola J, Rasmussen S, Elyaman W, Zhu B, Ransohoff RM, et al. Localizing central nervous system immune surveillance: meningeal antigen-presenting cells activate T cells during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Ann Neurol*. 2009 Apr;65(4):457–69.
26. Juedes AE, Ruddle NH. Resident and infiltrating central nervous system APCs regulate the emergence and resolution of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*. 2001 Apr 15;166(8):5168–75.
27. Ajami B, Bennett JL, Krieger C, McNagny KM, Rossi FM V. Infiltrating monocytes trigger EAE progression , but do not contribute to the resident microglia pool. *Nat Publ Gr*. Nature Publishing Group; 2011;14(9):1142–9.

28. Gaupp S, Pitt D, Kuziel WA, Cannella B, Raine CS. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in CCR2(-/-) mice: susceptibility in multiple strains. *Am J Pathol*. 2003 Jan;162(1):139–50.
29. Kim J V, Kang SS, Dustin ML, McGavern DB. Myelomonocytic cell recruitment causes fatal CNS vascular injury during acute viral meningitis. *Nature*. 2009 Jan 8;457(7226):191–5.
30. Battistini L, Piccio L, Rossi B, Bach S, Galgani S, Gasperini C, et al. CD8+ T cells from patients with acute multiple sclerosis display selective increase of adhesiveness in brain venules: a critical role for P-selectin glycoprotein ligand-1. *Blood*. 2003 Jun 15;101(12):4775–82.
31. Eikelenboom M., Killestein J, Izeboud T, Kalkers N., van Lier RA., Barkhof F, et al. Chemokine receptor expression on T cells is related to new lesion development in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 2002 Dec 1;133(1-2):225–32.
32. Kilinc MO, Rowsell-Turner RB, Gu T, Virtuoso LP, Egilmez NK. Activated CD8+ T-effector/memory cells eliminate CD4+ CD25+ Foxp3+ T-suppressor cells from tumors via FasL mediated apoptosis. *J Immunol*. 2009 Dec 15;183(12):7656-60.
33. Jiang H, Zhang SI, Pernis B. Role of CD8+ T cells in murine experimental allergic encephalomyelitis. *Science*. 1992 May 22;256(5060):1213–5.
34. Schousboe A. Role of astrocytes in the maintenance and modulation of glutamatergic and GABAergic neurotransmission. *Neurochem Res*. 2003 Feb;28(2):347–52.
35. Kahlfuß S, Simma N, Mankiewicz J, Bose T, Lowinus T, Klein-Hessling S, et al. Immunosuppression by N-methyl-D-aspartate receptor antagonists is mediated through inhibition of Kv1.3 and KCa3.1 channels in T cells. *Mol Cell Biol*. 2014 Mar 1;34(5):820–31.
36. Bender A. Characterization of cystine uptake in cultured astrocytes. *Neurochem Int*. 2000 Aug 1;37(2-3):269–76.
37. Schwartz M, Shaked I, Fisher J, Mizrahi T, Schori H. Protective autoimmunity against the enemy within: fighting glutamate toxicity. *Trends Neurosci*. 2003 Jun;26(6):297–302.
38. Piani D, Fontana A. Involvement of the cystine transport system xc- in the macrophage-induced glutamate-dependent cytotoxicity to neurons. *J Immunol*. 1994 Apr 1;152(7):3578–85.
39. Ciruela F, Escriche M, Burgueno J, Angulo E, Casado V, Soloviev MM, et al. Metabotropic glutamate 1alpha and adenosine A1 receptors assemble into functionally interacting complexes. *J Biol Chem*. 2001 May 25;276(21):18345–51.
40. Boldyrev A a., Carpenter DO, Johnson P. Emerging evidence for a similar role of glutamate receptors in the nervous and immune systems. *J Neurochem*. 2005;95(4):913–8.

41. Pacheco R, Ciruela F, Casadó V, Mallol J, Gallart T, Lluís C, et al. Group I metabotropic glutamate receptors mediate a dual role of glutamate in T cell activation. *J Biol Chem*. 2004 Aug 6;279(32):33352–8.
42. Fallarino F, Volpi C, Fazio F, Notartomaso S, Vacca C, Busceti C, et al. Metabotropic glutamate receptor-4 modulates adaptive immunity and restrains neuroinflammation. *Nat Med*. 2010 Aug;16(8):897–902.
43. Pouloupoulou C, Markakis I, Davaki P, Nikolaou C, Pouloupoulos A, Raptis E, et al. Modulation of Voltage-Gated Potassium Channels in Human T Lymphocytes by Extracellular Glutamate. *Mol Pharmacol*. 2005 Mar 1;67(3):856–67.
44. Pouloupoulou C, Davaki P, Koliarakis V, Kolovou D, Markakis I, Vassilopoulos D. Reduced expression of metabotropic glutamate receptor 2mRNA in T cells of ALS patients. *Ann Neurol*. 2005 Dec;58(6):946–9.
45. Miglio G, Varsaldi F, Lombardi G. Human T lymphocytes express N-methyl-D-aspartate receptors functionally active in controlling T cell activation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005 Dec 30;338(4):1875–83.
46. Kostanyan IA, Merkulova MI, Navolotskaya E V, Nurieva RI. Study of interaction between L-glutamate and human blood lymphocytes. *Immunol Lett*. 1997;58(3):177–80.
47. Storto M, De Grazia U, Battaglia G, Felli MP, Maroder M, Gulino A, et al. Expression of metabotropic glutamate receptors in murine thymocytes and thymic stromal cells. *J Neuroimmunol*. 2000;109(2):112–20.
48. Rezzani R, Corsetti G, Rodella L, Angoscini P, Lonati C, Bianchi R. Cyclosporine-A treatment inhibits the expression of metabotropic glutamate receptors in rat thymus. *Acta Histochem*. 2003 Jan;105(1):81–7.
49. Lombardi G, Dianzani C, Miglio G, Canonico PL, Fantozzi R. Characterization of ionotropic glutamate receptors in human lymphocytes. *Br J Pharmacol*. 2001;133(6):936–44.
50. Ganor Y, Besser M, Ben-Zakay N, Unger T, Levite M. Human T cells express a functional ionotropic glutamate receptor GluR3, and glutamate by itself triggers integrin-mediated adhesion to laminin and fibronectin and chemotactic migration. *J Immunol*. 2003;170(8):4362–72.
51. Boldyrev A a., Kazey VI, Leinsoo T a., Mashkina AP, Tyulina O V., Johnson P, et al. Rodent lymphocytes express functionally active glutamate receptors. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;324(1):133–9.
52. Shi Q, Savage JE, Hufeisen SJ, Rauser L, Grajkowska E, Ernsberger P, et al. L-homocysteine sulfinic acid and other acidic homocysteine derivatives are potent and selective metabotropic glutamate receptor agonists. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003 Apr;305(1):131–42.

53. Lazarewicz JW, Ziembowicz A, Matyja E, Stafiej A, Zieminska E. Homocysteine-evoked ^{45}Ca release in the rabbit hippocampus is mediated by both NMDA and group I metabotropic glutamate receptors: In vivo microdialysis study. *Neurochem Res.* 2003;28(2):259–69.
54. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* 1998;392(3):245–52.
55. Lanzavecchia a, Sallusto F. Regulation of T cell immunity by dendritic cells. *Cell.* 2001;106:263–6.
56. Sa U. Danger signals : SOS to the immune system Stefania G allucci * and Polly Matzinger. *J Exp Med.* :114–9.
57. Pacheco R, Ciruela F, Casadó V, Mallol J, Gallart T, Lluís C, et al. Group I metabotropic glutamate receptors mediate a dual role of glutamate in T cell activation. *J Biol Chem.* 2004;279(32):33352–8.
58. Bonacho MG, Cardinali DP, Castrillón P, Cutrera RA, Esquifino AI. Aging-induced changes in 24-h rhythms of mitogenic responses, lymphocyte subset populations and neurotransmitter and amino acid content in rat submaxillary lymph nodes during Freund's adjuvant arthritis. *Exp Gerontol.* 2001;36(2):267–82.
59. Pacheco R, Gallart T, Lluís C, Franco R. Role of glutamate on T-cell mediated immunity. *J Neuroimmunol.* 2007;185(1-2):9–19.
60. Gu Z, Liu W, Wei J, Yan Z. Regulation of N -Methyl- D -aspartic Acid (NMDA) Receptors by Metabotropic Glutamate Receptor 7 *. 2012;287(13):10265–75.
61. Gwack Y, Feske S, Srikanth S, Hogan PG, Rao A. Signalling to transcription: Store-operated Ca^{2+} entry and NFAT activation in lymphocytes. *Cell Calcium.* 2007;42(2):145–56.
62. Soderling TR. The Ca-calmodulin-dependent protein kinase cascade. *Trends Biochem Sci.* 1999;24(6):232–6.
63. Oh-hora M, Rao A. Calcium signaling in lymphocytes. *Curr Opin Immunol.* 2008;20(3):250–8.
64. Wen AY, Sakamoto KM, Miller LS. The role of the transcription factor CREB in immune function. *J Immunol.* 2010;185(11):6413–9.
65. Powell JD, Lerner CG, Ewoldt GR, Schwartz RH. The -180 site of the IL-2 promoter is the target of CREB/CREM binding in T cell anergy. *J Immunol.* 1999;163(12):6631–9.
66. Affaticati P, Mignen O, Jambou F, Potier M-C, Klingel-Schmitt I, Degrouard J, et al. Sustained calcium signalling and caspase-3 activation involve NMDA receptors in thymocytes in contact with dendritic cells. *Cell Death Differ.* 2011;18(1):99–108.

67. Lombardi G, Miglio G, Dianzani C, Mesturini R, Varsaldi F, Chiocchetti A, et al. Glutamate modulation of human lymphocyte growth: In vitro studies. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;318(2):496–502.
68. Fickinger AM da C. Papel dos receptores de glutamato tipo NMDA em macrófagos, células dendríticas e células T CD4 ativados in vitro. [Dissertação (Mestrado em Imunologia)] São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.
69. Hamada T, Sonoda R, Watanabe A, Ono M, Shibata S, Watanabe S. NMDA induced glutamate release from the suprachiasmatic nucleus: An in vitro study in the rat. *Neurosci Lett*. 1998;256(2):93–6.
70. Nei K, Matsuyama S, Shuntoh H, Tanaka C. NMDA receptor activation induces glutamate release through nitric oxide synthesis in guinea pig dentate gyrus. *Brain Res*. 1996;728(1):105–10.
71. Son Y, Cheong Y, Kim N, Chung H, Kang DG, Pae H. Mitogen-Activated Protein Kinases and Reactive Oxygen Species: How Can ROS Activate MAPK Pathways? *J Signal Transduct*. 2011;2011:792639.
72. Cathcart MK. Regulation of superoxide anion production by NADPH oxidase in monocytes/macrophages: contributions to atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004 Jan 1;24(1):23–8.
73. Hayashi T, Umemori H, Mishina M, Yamamoto T. The AMPA receptor interacts with and signals through the protein tyrosine kinase Lyn. *Nature*. 1999 Jan 7;397(6714):72–6.
74. Alonso M, Medina JH, Pozzo-Miller L. ERK1/2 activation is necessary for BDNF to increase dendritic spine density in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Learn Mem*. 2004 Jan 1;11(2):172–8.
75. Mashkina AP, Cizkova D, Vanicky I, Boldyrev AA. NMDA receptors are expressed in lymphocytes activated both in vitro and in vivo. *Cell Mol Neurobiol*. 2010;30(6):901–7.
76. Wallström E, Diener P, Ljungdahl Å, Khademi M, Nilsson CG, Olsson T. Memantine abrogates neurological deficits, but not CNS inflammation, in Lewis rat experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurol Sci*. 1996;137(2):89–96.
77. Schmitt EG, Haribhai D, Williams JB, Aggarwal P, Jia S, Charbonnier L-M, et al. IL-10 produced by induced regulatory T cells (iTregs) controls colitis and pathogenic ex-iTregs during immunotherapy. *J Immunol*. 2012 Dec 15;189(12):5638–48.
78. Huber S, Gagliani N, Esplugues E, O'Connor W, Huber FJ, Chaudhry A, et al. Th17 cells express interleukin-10 receptor and are controlled by Foxp3⁺ and Foxp3⁺ regulatory CD4⁺ T cells in an interleukin-10-dependent manner. *Immunity*. 2011 Apr 22;34(4):554–65.

79. Cosentino M, Fietta AM, Ferrari M, Rasini E, Bombelli R, Carcano E, 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):632–42.
80. Vaarmann a, Kovac S, Holmström KM, Gandhi S, Abramov a Y. Dopamine protects neurons against glutamate-induced excitotoxicity. *Cell Death Dis*. 2013;4:e455.
81. Levine AG, Arvey A, Jin W, Rudensky AY, Levine AG, Arvey A, et al. Continuous requirement for the TCR in regulatory T cell function. *Nat Immunol*. 2014 Set; (15):1–10.
82. Thomas DM, Kuhn DM. MK-801 and dextromethorphan block microglial activation and protect against methamphetamine-induced neurotoxicity. *Brain Res*. 2005 Jul 19;1050(1-2):190–8.
83. Hickey WF, Hsu BL, Kimura H. T-lymphocyte entry into the central nervous system. *J Neurosci Res*. 1991 Feb;28(2):254–60.

APÊNDICE A - RESULTADOS

Figura 20 - NMDAR modula a expressão de *Bdnf* em esplenócitos totais. Análise da expressão gênica de *Bdnf* quantificado por qPCR em RNAm extraído de esplenócitos de camundongos BALB/c cultivados por 48 horas na presença ou não de αCD3.

Figura 21 - MK801 *in vivo* aumenta a produção de IL-10 em animais imunizados com MOG₃₅₋₅₅. Dosagem de citocinas pelo método CBA (*Cytometric Bead Array*). Ao dia 14, animais imunizados com MOG₃₅₋₅₅ (150 μg) em adjuvante completo de Freund (CFA) foram sacrificados e a porção distal da medula espinhal foi extraída. Após processamento, o homogenato foi utilizado para dosagem. O grupo MK801 (barra branca) recebeu 5 doses do antagonista do NMDAR via i.p. na concentração de 0,3 mg/kg por animal por 5 dias consecutivos. Dados representam 2 experimentos independentes. One-way Anova * $p < 0,05$. Média ± DP.

Figura 22 - MK801 *in vivo* altera número de células totais em animais C57BL/6. Contagem diferencial de células totais do baço, linfonodos (LN), timo e medula óssea (MO). Ao dia 7, os animais foram sacrificados e os tecidos extraídos, processados e as células marcadas com os devidos anticorpos. O grupo MK801 (barra branca) recebeu 5 doses do antagonista do NMDAR via i.p. na concentração de 0,3 mg/kg por animal por 5 dias consecutivos. Em **A**, estratégia de *gating* para diferenciação das células da MO. Em **B**, número absoluto das subpopulações presentes na MO; E, linhagem eritróide; B, blastos; L, linfócitos; M, monócitos/macrófagos; G, granulócitos. Em **C**, número absoluto de células totais. Em **D** e **G**, número absoluto das subpopulações no baço. Em **E**, número absoluto de células CD4⁺ e CD8⁺ nos LN. Em **F**, número absoluto de CD4⁺, CD8⁺ e CD4⁺CD8⁺ no timo. Dados representam apenas um experimento. One-way Anova * $p < 0,05$. Média $\pm$ DP.

APÊNDICE B - SÚMULA CURRICULAR

Apresentação oral

- INNATE IMMUNITY 2015. ROSSATO, C. Glutamate Ionotropic Receptor (NMDAR) modulates T cell function in vivo during EAE. 2015. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

Apresentação de poster

- INNATE IMMUNITY 2015
 - IMMORTOMOUSE: A NEW MOUSE MODEL TO INVESTIGATE THYMUS ORGANOGENESIS AND T CELL DEVELOPMENT. Jose E Belizario; Jean Pierre Schatzmann Peron; Wesley Brandão; **Cristiano Rossato**.
 - GLUTAMATE BY NMDAR SIGNALING MODULATES THE INNATE IMMUNE CELLS RESPONSE DURING IN VITRO HYPOXIA. Wesley Brandão ; Ana Carolina Durao ; **Cristiano Rossato** ; Isabella Cunha ; Carolina Manganeli Polonio ; Cristiane Naffah De Souza ; David Garrido Andrade ; Carla Longo ; Niels Olsen Saraiva Câmara ; Jean Pierre Schatzmann Peron.
 - GLUTAMATE IONOTROPIC RECEPTOR (NMDAR) MODULATES T CELL FUNCTION IN VIVO DURING EAE. **Cristiano Rossato**; Wesley Brandão ; Ana Carolina Durao ; Carolina Manganeli; Polonio ; Carla Longo ; Isabella Cunha; David Garrido Andrade ; Veronica Mendes De Moura ; Niels Olsen Saraiva Câmara ; Jean Pierre Schatzmann Peron
- Immunology 2015. GLUTAMATE IONOTROPIC RECEPTOR (NMDAR) MODULATES T CELL SURVIVAL. Jean Pierre Schatzmann Peron; Verônica Mendes de Moura, Cristiano Rossato, Wesley Nogueira Brandão, Juliana Zavatta, Niels Olsen Saraiva Câmara; AAI 2015 New Orleans – USA. (IRM7P.712). 2015. (Congresso).
- XXIX Encontro da Sociedade Brasileira de Imunologia – Búzios – RJ. IMMUNO BÚZIOS 2014
 - GLUTAMATE IONOTROPIC RECEPTOR (NMDAR) ACTIVATION OF BONE MARROW-DERIVED DENDRITIC CELLS. Verônica Mendes de Moura, Cristiano Rossato, Wesley Nogueira Brandão, Juliana Zavatta, Niels Olsen Saraiva Câmara, Jean Pierre Schatzmann Peron
 - GLUTAMATE IONOTROPIC RECEPTOR (NMDAR) MODULATES T CELL ACTIVATION AND SURVIVAL. **Cristiano Rossato**; Wesley Brandão ; Ana Carolina Durao ; Veronica Mendes De Moura ; Niels Olsen Saraiva Câmara ; Jean Pierre Schatzmann Peron

- NMDAR EXPRESSION ON MICROGLIAL CELLS MODULATES NEURONAL DEATH AFTER HYPOXIA IN VITRO. Wesley Brandão; Juliana Zavatta ; Ana Carolina Durao ; **Cristiano Rossato** ; Veronica Mendes De Moura Niels Olsen Saraiva Câmara ; Jean Pierre Schatzmann Peron.

Orientação técnica e científica

- Metodologia Científica I - 1º semestre de 2014 - Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.
 - Tiago Lubiana Alves, “Efeitos da inibição in vivo do receptor NMDA na expressão de ligantes de PD1 durante EAE” Orientador: Jean Pierre Schatzmann Peron; Co-orientador: **Cristiano Rossato**
 - Heloísa Alonso Matielo, “Regulação da expressão de PD-L1 E PD-L2 em macrófagos e células dendríticas através de bloqueio do receptor NMDA em modelo de EAE” Orientador: Jean Pierre Schatzmann Peron; Co-orientador: **Cristiano Rossato**
- Verônica Mendes de Moura. “Papel dos receptores de glutamato NMDA na ativação de células dendríticas derivadas da medula óssea” 2014. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Biomedicina) - Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas. Co-orientador: **Cristiano Rossato**.
- Verônica Lopes Lima. Relação do Ácido Fólico no Processo de Fechamento do Tubo Neural: Da Estrutura a Reposição Nutricional. 2014. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Biomedicina) - Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas. Orientador: **Cristiano Rossato**.
- Lilian Gomes de Oliveira “Expressão e ativação dos receptores TAM durante a infecção de macrófagos e células dendríticas por Zika Vírus” Em andamento. Orientador: Jean Pierre Schatzmann Peron; Co-orientador: **Cristiano Rossato**

Produção Científica

Patente

- Universidade de São Paulo, São Paulo. Christiane B. De Araujo, Leandro M. de Castro, Jean P. S. Peron, Vanessa L. R Ferraz, Elisabete R. M. Silva, **Cristiano Rossato**, Emer S. Ferro "EL 28: Um novo peptídeo com capacidade de ativar o proteassomo in vitro". RPI 2347, PAG 122 - BR 10 2015 005853-5.

Artigos publicados

- Intestinal Microbiota as Modulators of the Immune System and Neuroimmune System: Impact on the Host Health and Homeostasis. Maranduba, Carlos Magno Da Costa; De Castro, Sandra Bertelli Ribeiro; Souza, Gustavo Torres De; **Rossato, Cristiano**; Da Guia, Francisco Carlos; Valente, Maria Anete Santana; Rettore, João Vitor Paes; Maranduba, Claudinéia Pereira; Souza, Camila Maurmann De; Carmo, Antônio Márcio Resende Do; Macedo, Gilson Costa; Silva, Fernando De Sá. Journal of Immunology Research, v. 2015, p. 1-14, 2015.
- The effect of low-level laser irradiation on sperm motility, and integrity of the plasma membrane and acrosome in cryopreserved bovine sperm. Fernandes GH, de Carvalho P de T, Serra AJ, Crespilho AM, Peron JP, **Rossato C**, Leal-Junior EC, Albertini R. PLoS One. 2015 Mar 17;10(3):e0121487. doi: 10.1371/journal.pone.0121487.
- Thymic and Postthymic Regulation of Naive CD4⁺ T-Cell Lineage Fates in Humans and Mice Models. José E. Belizário, Wesley Brandão, **Cristiano Rossato**, and Jean Pierre Peron. Mediators of Inflammation. Vol 2016, 16 pgs. ID 9523628.

- The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. Fernanda R. Cugola, Isabella R. Fernandes, Fabiele B. Russo, Beatriz C. Freitas, João L. M. Dias, Katia P. Guimarães, Cecília Benazzato, Nathalia Almeida, Graciela C. Pignatari, Sarah Romero, Carolina M. Polonio, Isabela Cunha, Carla L. Freitas, Wesley N. Brandão, **Cristiano Rossato**, David G. Andrade, Daniele de P. Faria, Alexandre T. Garcez, Carlos A. Buchpiget, Carla T. Braconi, Erica Mendes, Amadou A. Sall, Paolo M. de A. Zanotto, Jean Pierre S. Peron, Alysson R. Muotri & Patricia C. B. Beltrão-Braga. *Nature*. Vol. 534, pg. 267-273, 2016.
- Interferon-gamma activity is potentiated by an intracellular peptide derived from the human 19S ATPase regulatory subunit 4 of the proteasome. Elisabete R.C. Monte, Cristiano Rossato, Ricardo Pariona Llanos, Lilian C. Russo, Leandro M. de Castro, Fábio C. Gozzo, Christiane B. de Araujo, Jean Pierre S. Peron, Osvaldo Augusto Sant'Anna, Emer S. Ferro, Vanessa Rioli. *Journal of Proteomics*. Available online 11 August 2016. In Press. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2016.08.003>