WESLEY NOGUEIRA BRANDÃO

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

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

São Paulo

2017

WESLEY NOGUEIRA BRANDÃO

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

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

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. Jean Pierre Schatzmann Peron

Versão Original

São Paulo
2017

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)

Brandão, Wesley Nogueira
Glutamato através da sinalização do NMDAr modula a resposta Inata de Células Imunitárias In Vitro durante hipóxia. / Wesley Nogueira Brandão; orientador Jean Pierre Schatzmann Peron. -- São Paulo, 2017.
98 p.

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

1. Acidente vascular Cerebral. 2. Glutamato. 3. Células da Micróglia. 4. Hipóxia. 5. NMDAr. I. Peron, Jean Pierre Schatzmann, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Wesley Nogueira Brandão

Título da Tese: Glutamato através da sinalização do NMDAr modula a resposta Inata de Células Imunitárias In Vitro durante hipóxia.

Orientador(a): 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 **75** 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 "*O papel do receptor de glutamato tipo NMDA na regulação da resposta imune na encefalomielite experimental auto-imune e na lesão por isquemia e reperfusão cerebral*" do qual participam o(s) aluno(s) **Cristiano Rossato, Wesley Nogueira Randão, Andira Michele da Cruz Fickinger, Verônica Mendes de Moura os pesquisadores Meire Hiyane, Niels Olsen Saraiva Câmara,** 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 **30.07.2013, com validade de 4 anos.**

São Paulo, 31 de julho de 2013.

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

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

À minha esposa amada, Ana Carolina Cardoso dos Santos Durão Brandão, pois sem você com certeza teria perdido a lucidez, e em certos pontos, a coragem de atravessar mais esta etapa.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais José Sampaio e Nilsi, que sempre me incentivaram a perseguir o sonho desejado sem reclamar das tribulações.

Ao Prof. Dr. Jean Pierre Schatzman Peron, que além de acreditar, incentivar, criticar, transformou-me no pesquisador que sou hoje. A este o meu imenso obrigado.

Aos Diversos colaboradores que tanto apoiaram esse trabalho: Prof. Dr. Niels Olsen Saraiva Câmara, Tarcio Teodoro Braga, Cristiane Naffah, Stephen Rodrigues e Nilton Barreto.

À minha irmã, por sempre estar presente, e que em sua inocência, mantinha os meus sonhos de vida para o futuro.

À minha segunda família, Eliana Cardoso dos Santos, Luiz Durão, Luiz Cardoso, Julia Perez e Lucia Cardoso, pelo companheirismo.

Aos grandes padrinhos e amigos para toda vida: Bruno Sini, Larissa Dourado, Luiz Adriano Corrêa, Priscila Paruci, Leonardo Vieira e Thaís Capelato.

Aos meus amigos que nesses anos trabalharam ao meu lado: Cristiano Rossato, Juliana Zavatta, Verônica Moura, Carolina Manganelli, Carla Longo, Lilian Gomes e Nagela Zanluqui.

Agradeço também as dificuldades encontradas durante o percurso, pois foram estas as que mais contribuíram para o meu amadurecimento.

Agradecimento ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento durante o doutorado de Wesley Nogueira Brandão, nº USP 6925531. Processo Nº: 142292/2013-3

" Nada garante que a verdade seja só aquilo que você consegue ver"
Yuuko Ichihara

"No tear que tece a nossa vida, não há pontas soltas. Todos os fios estão entremeados entre si e revestidos de significado."
Yuuko Ichihara

" Se você estiver agarrado a uma corda num abismo, não tente segurar a moeda que cair do seu bolso."
Arkady Vissarionovich Dezhnev

"Só quando aprende a ficar firme é que uma criança começa a virar gente."
Arkady Vissarionovich Dezhnev

RESUMO

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

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

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

ABSTRACT

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

Cerebral vascular accident (CVA) is an acute neuroinflammatory disease whose prevalence has increased significantly in recent years. Among the symptoms, the most frequent are paralysis due to neuronal death caused by deprivation of glucose and oxygen. It is known that after neuronal death, there are several proinflammatory substances, such as cytokines, DAMPs (damage associated molecular pattern), free radicals and mainly neurotransmitters, among them glutamate. Such molecules, in addition to promoting greater CNS damage, also modulate the response of infiltrating immune cells. Increasingly, new evidence for the action of neurotransmitters on the modulation of the immune response is generated, however how such modulation may affect the development of neurodegenerative diseases is still poorly understood. In this context, the objective of this work is to investigate how glutamate through its NMDA receptor could modulate the inflammatory response in both resident cells like microglia, and infiltrating cells, such as macrophages and neutrophils. In order to perform these studies, we performed in vitro experiments with cultures of microglial cells, neutrophils and macrophages, treated or not with NMDA blocker (MK 801), which underwent hypoxia for 24 hours at 1% O 2. After this time, the cells and their products were evaluated by real-time PCR, flow cytometry, and CBA. Our results demonstrated that NMDAr signaling modulates the expression of molecules involved in the presentation of antigen in microglia and macrophages cells, as well as in the production of nitric oxide by neutrophils. Its blockade decreases cell death of microglia cells and less brain damage in the middle cerebral artery obstruction model (MCAO). Finally, our research shows that NMDAr signaling is involved not only with excitotoxicity but also with the modulation of innate cell response, aiding the expression of costimulatory molecules production of cytokines and reactive oxygen species.

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

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição geográfica da Incidência de AVC para cada 100.000 habitantes em 2010 19
Figura 2 - Mecanismo de polarização dos macrófagos. 23
Figura 3 - Esquema dos mecanismos de morte neuronal desenvolvidos pela diminuição do ATP..... 25
Figura 4 - Efeitos opostos da sinalização do NMDAr dependente de sua posição. 29
Figura 5 - Esquema ilustrativo do procedimento de hipóxia..... 34
Figura 6 - Indução da Oclusão da Artéria Cerebral Média - MCAO. 47
Figura 7 - Viabilidade celular pós hipóxia. 50
Figura 8 - Avaliação da morte celular nas linhagens celulares no decorrer da hipóxia. 51
Figura 9 - Quantificação das células vivas e mortas durante o protocolo de hipóxia. 52
Figura 10 - Avaliação das enzimas antioxidativas em linhagens de micróglia e neurônios. ... 54
Figura 11 - Avaliação da expressão gênica de células C8B4 após hipóxia..... 55
Figura 12 - Avaliação da expressão gênica em cultura mista de células da microglia e astrócitos após hipóxia.. 56
Figura 13 - Expressão das frações Nr1 e Nr2a/b e do transportador vesicular do glutamato (vGlut) nas células C8B4..... 57
Figura 14 - Produção de glutamato nas células residentes do SNC. 58
Figura 15 - Avaliação da expressão gênica das subunidades do receptor NMDA nas células da microglia. 59
Figura 16 - Representação das mudanças morfológicas das células C8B4, após sua ativação com os estímulos de MK801.. 61
Figura 17 - Avaliação de Anexina x PI em células C8B4 estimuladas com MK801..... 62
Figura 18 - Análise das moléculas envolvidas na ativação de células C8B4 pós estímulo com MK801..... 63
Figura 19 - Ação do NMDAr sobre a viabilidade das células C8B4 perante estímulos inflamatórios..... 64
Figura 20 - Atuação do NMDAr sobre a resposta inflamatória das células C8B4..... 65
Figura 21 - Quantificação da viabilidade celular na presença ou não de MK801 durante o protocolo de hipóxia. 67

Figura 22 - Avaliação da expressão gênica de células da microglia tratadas ou não com MK801 após hipóxia. 68
Figura 23 - Análise das moléculas envolvidas na apresentação de antígeno de células C8B4 tratadas ou não com MK801..... 69
Figura 24 - Sinalização pelo NMDAr modula resposta de células CD11b+ que entram em contato com células da microglia. 72
Figura 25 - Modulação das moléculas envolvidas na apresentação de antígeno em células C8B4 e macrófagos, tratados ou não com MK801 durante o período de reoxigenação. 73
Figura 26 - Avaliação das citocinas produzidas por células C8B4 e macrófagos tratados ou não com MK801 durante o período de reoxigenação..... 74
Figura 27 - Tratamento com MK801 modula moléculas envolvidas na apresentação de antígeno de macrófagos de medula óssea..... 75
Figura 28 - Tratamento com MK801 modula a polarização de macrófagos provenientes da medula óssea..... 76
Figura 29 - Concentração de por células imunes periféricas..... 77
Figura 30 - Tratamento com MK801 diminui a síntese de NO em neutrófilos..... 79
Figura 31 - Tratamento com MK801 diminui lesão gerada por MCAO..... 81
Figura 32 - Esquema ilustrativo das ações do glutamato sobre a resposta das células inatas e suas influências sobre a morte neuronal no AVC..... 90

LISTA DE ABREVIATURAS

α–Syn – α-Sinucleína

AMPAr – Receptor de ácido α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropino

AMP cíclico – Monofosfato cíclico de adenosina

APCs – Células apresentadoras de antígeno

Arg1 – Gene para Arginase 1

ATP – Adenosina trifosfato

AVC – Acidente Vascular Cerebral

BDNF – Fator neurotrófico derivado do encéfalo

CaMK-IV – Do inglês " *Calmodulin – dependente protein kinase IV*"

CBP – Do inglês "*CREB binding protein*"

CFSE – *Carboxyfluorescein succinimidyl ester*

CREB – Do inglês "*Cyclic AMP response elemento binding protein*"

DA – Doença de Alzheimer

DAMP's – Padrões moleculares associados ao dano

DAPK1 – Proteína kinase associada à morte 1

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DP – Doença de Parkinsong

EM – Esclerose Múltipla

ERK – Quinase regulada por sinalização extracelular

GDNF – Fator neurotrófico derivado de glia

GM-CSF – Fatpor estimulador de colônia de granulócitos e monócitos

GnRH – Hormônio liberador de gonadotrofina

GPx – Glutationa peroxidase

GR – Glutationa Redutase

GSH – Glutationa reduzida

GSSG – Glutationa oxidada

GST – Glutationa – S – Transferase

HIF-1α – Fator induzido por hipóxia 1α

HLA – DR – Antígeno leucocitário humano tipo DR

HPA – Eixo hipotálamo, pituitária, adrenal

HSPs – Proteínas de fase aguda. Do inglês "*Heat-shock proteins*"

iNOS – Oxido nítrico sintase induzida

IRF – Fator responsível à interferon

KAr – Receptor kainatos

LIC – lesão isquêmica celular permanente

LPS - Lipopolisacarídeo

MAPK – Mapiquinase

MCA – Artéria cerebral média

MCAO – Oclusão da artéria cerebral média

MHC – Complexo principal de histocompatibilidade

MK801 - Dizocilpine

NFAT – Fator nuclear de células T ativadas

NF- κB – Fator de transcrição nuclear κB

NLR – Receptores do tipo NOD

NMDA – N-metil-D-aspartato

NMDAr – Receptor de N-metil-D-aspartato

NOs – Espécie reativa do nitrogênio

PD1 – *Programmed death*

PD-L1 – *Programmed death ligant 1*

PHD – *Prolyl hydroxylase*

PRPs – Receptor de reconhecimento padrão

PGE2 – Prostaglandina E2

ROs – Espécie reativa do oxigênio

SNC – Sistema Nervoso Central

SOCS – *Negative regulator of cytokine signaling*

STAT – *Signal transducer and activator of transcription*

TLRs – Receptor do tipo Toll

Treg – Célula T reguladora

Ym1 – Gene Chintase-like3

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 17
1.1 O acidente vascular cerebral na sociedade 18
1.2 Neuroinflamação no desenvolvimento do AVC 19
1.3 Reações dependentes da diminuição de ATP 24
1.4 Excitotoxicidade 25
2 OBJETIVOS 31
2.1 Objetivo Geral 32
2.2 Objetivo específico 32
3 MATERIAIS E MÉTODOS 33
3.1 Hipóxia em linhagens de microglia e neurônios ou culturas primárias de células do SNC co-cultivadas com células do sistema imune 34
3.2 Quantificação Celular 35
3.2.1 Contagem celular 35
3.2.2 Laranja de acridina e Brometo de etídio 35
3.3 Citometria de fluxo 36
3.4 Isolamento de células CD11b+ pelo Kit CD11b MicroBeads - mouse/human (MACS) 36
3.5 Cultura de macrófagos provenientes da medula óssea 37
3.6 Diferenciação de macrófagos 37
3.7 Cultura de neutrófilos provenientes da medula óssea 38
3.8 Quantificação da produção de óxido nítrico 38
3.9 Quantificação de proteínas por Citometria de Fluxo (BD CBA) 38
3.10 Marcação por Cell Trace - CFSE 39
3.11 Marcação com Anexina V e PI 39
3.12 Imunofluorescência 39
3.13 Determinação da atividade enzimática 40
3.13.1 Determinação da atividade de glutationa peroxidase (GPx) 40
3.13.2 Determinação da atividade de glutationa redutase (GR) 41
3.13.3 Determinação da glutationa S-transferase (GST) 42
3.14 Real Time PCR 44
3.14.1 Extração do RNA 44
3.14.2 Preparação do cDNA 44
3.14.3 PCR em tempo Real 45
3.15 Dosagem do Glutamato 45
3.16 Animais experimentais 45

3.17 Indução da Oclusão da Artéria Cerebral Média - MCAO 46
3.18 Análise Estatística 47
4 RESULTADOS 48
4.1 Resultados in vitro 49
4.1.1 Avaliação dos processos de hipóxia e reoxigenação sobre a viabilidade das células do sistema nervoso central 49
4.1.2 Efeito da hipóxia sobre os mecanismos efetores de células da microglia e neurônios ... 53
4.1.3 Modulação da resposta das células da microglia pela sinalização do NMDAr 56
4.1.4 Atuação do NMDAr sobre a resposta das células microglia no processo de hipóxia e reoxigenação. 66
4.1.5 NMDAr modula a resposta de macrófagos. 70
4.1.6 Glutamato é produzido por células imunes 77
4.1.7 NMDAr modula a resposta de neutrófilos 78
4.2 Resultados In vivo: 80
4.2.1 Obstrução da artéria cerebral média - MCAO 80
5 DISCUSSÃO 82
6 CONCLUSÕES 92
REFERÊNCIAS 94

1 INTRODUÇÃO

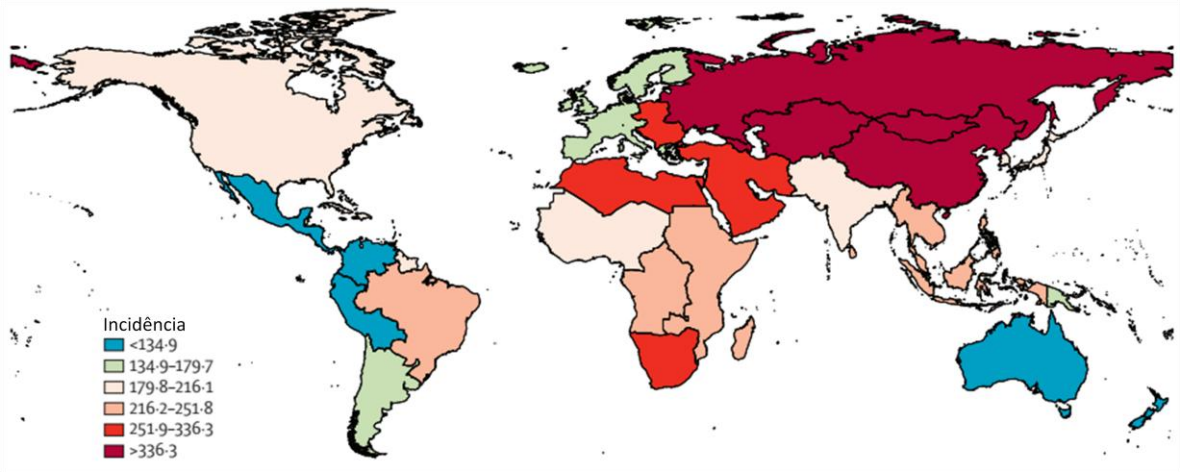
1.1 O acidente vascular cerebral na sociedade

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

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

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

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



Fonte: (Feiging et al., 2014).

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

1.2 Neuroinflamação no desenvolvimento do AVC

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

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

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

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

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

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

Por sua vez, o fenótipo M2 está associada com a atividade de *clearance* de células apoptóticas, aumento da expressão de receptores *scavenger*, além do aumento de moléculas envolvidas na remodelação tecidual. Alguns autores dividem esse perfil de resposta de acordo com as ações que estas células desempenham no organismo. Entre as classificações mais aceitas está a separação da população de macrófagos M2 em macrófagos reparadores e macrófagos reguladores (Sica, Mantovani, 2012).

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

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

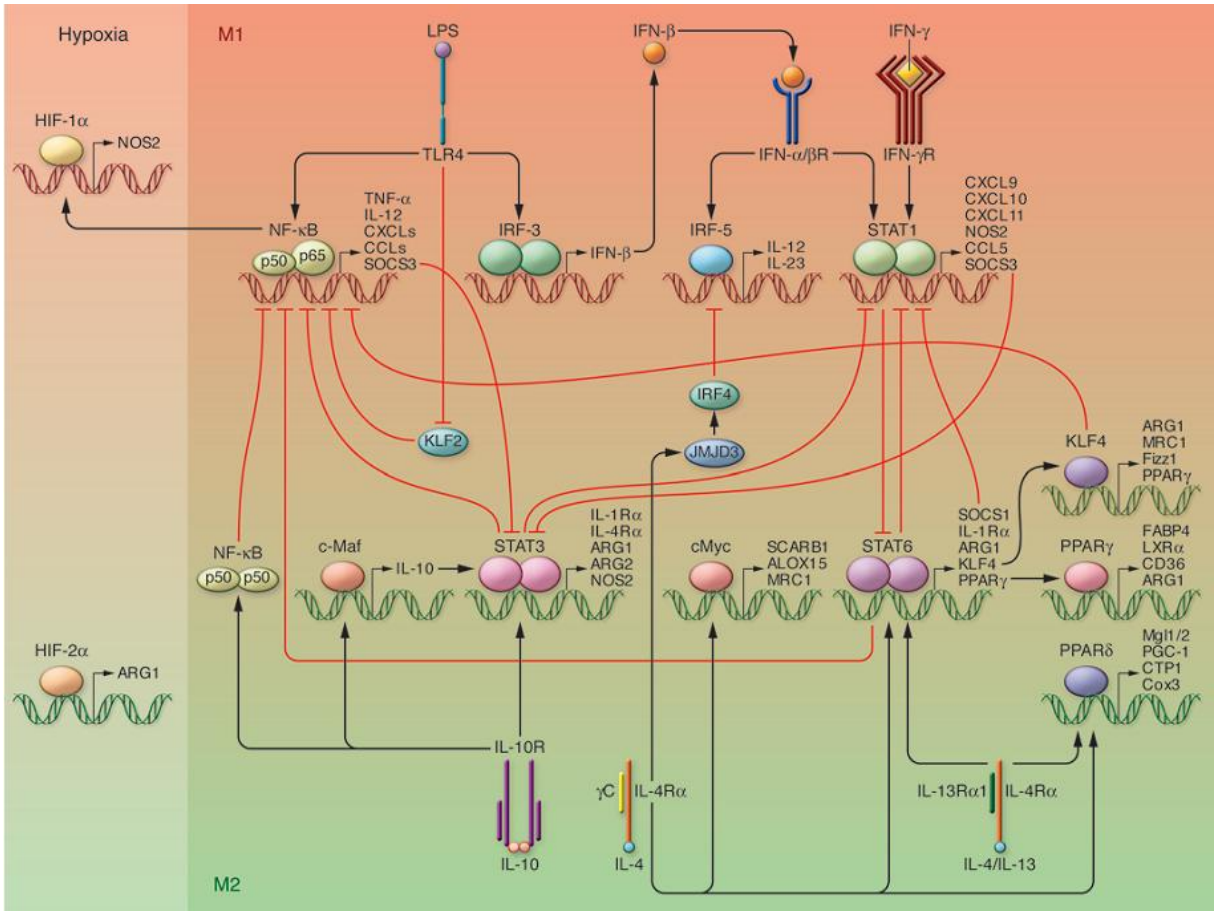
Vale observar que a diferenciação dos macrófagos a esses diferentes perfis não é irreversível. De um modo semelhante aos linfócitos T, estas células têm uma plasticidade que permite mudar de um perfil pró-inflamatório para um regulador e vice versa após alterações no microambiente. Exemplos ocorrem com o aumento da presença de células apoptóticas favorecendo a mudança para M2 e o aumento de citocinas pró-inflamatórias

auxiliando a diferenciação para M1. Estas mudanças são comumente encontrados em várias patologias, podendo distinguir um bom de um mau prognóstico (MURRAY; WYNN, 2011).

O controle da diferenciação entre esses perfis são determinados em grande parte pela via intrínseca que é ativada pelo estímulo recebido. Estímulos para M1, como LPS que ativa TLR-4 por exemplo, têm a capacidade de ativar a via do NF-κB, com produção de citocinas como TNFα e IL-12, além de ativar o IRF3 (*Interferon regulatory factor* 3) que aumentará a produção de IFN-β (*Interferon beta*) . Estímulos de interferons, sejam eles do tipo I (IFN-α e IFN-β) ou tipo II (IFN-γ), promovem ativação de STAT1 (*signal transducer and activator of transcription* 1) e IRF5 (*Interferon regulatory factor* 5) os quais promoverão a indução da enzima iNOS (*Inducible nitric oxide synthase*) que além de produzir NO, induz a expressão de SOCS3 (*supressor of cytokine signaling 3*), cuja ação é a de bloquear STAT6 (*signal transducer and activator of transcription* 6) determinando a polarização de um macrófago M1 (Figura 2).

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

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



Fonte: (Sica, Mantovani, 2012).

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

1.3 Reações dependentes da diminuição de ATP

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

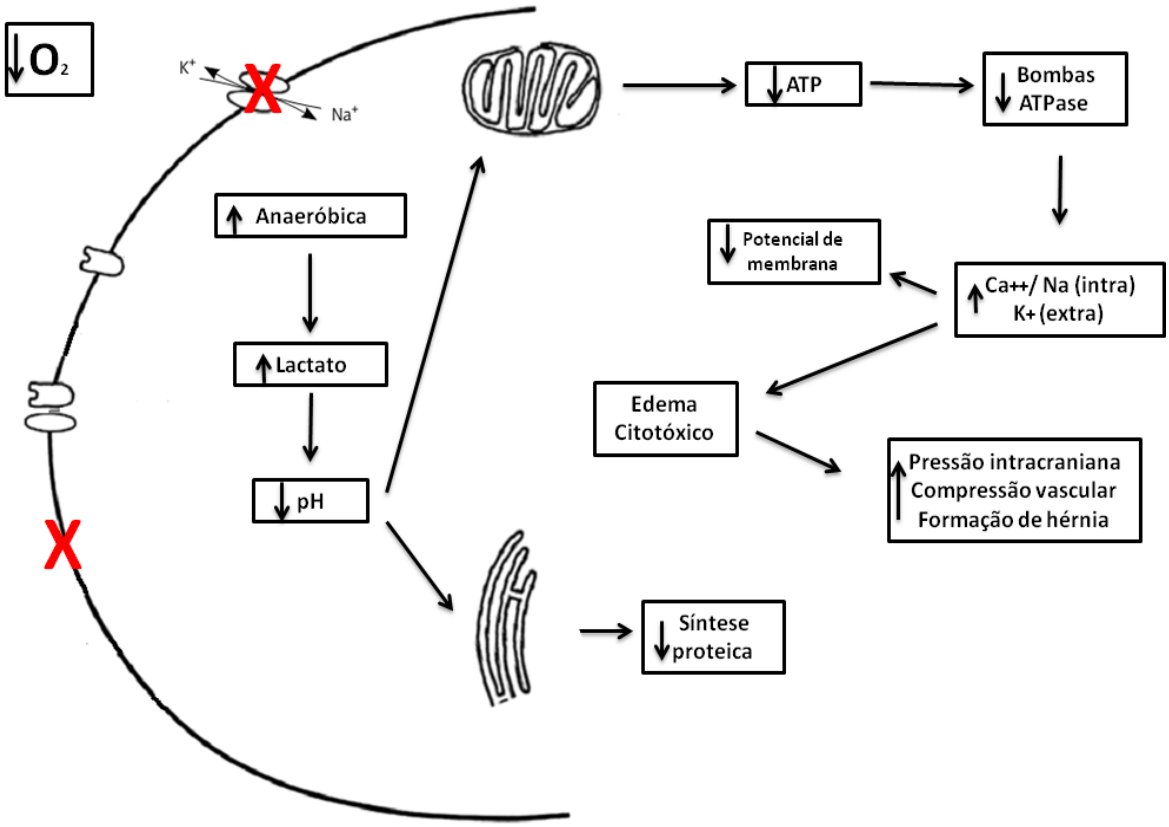
Após minutos de oclusão durante um AVC isquêmico o fluxo sanguíneo é interrompido e há o acúmulo de substratos intracelulares como os produtos de degradação do ATP (adenosina e purinas), além de metabólicos ácidos que levam a uma alteração do pH celular, a diminuição dos substratos e do pH cessa o transporte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

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

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

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

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



Fonte: Figura adaptada de Hossmann (2009).

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

1.4 Excitotoxicidade

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

cells) ativado após a fosforilação de ERK ½ (*extracellular signal–regulated kinase -1/2*) pelo influxo de Ca^{2+} (Hardingham, Bading, 2010).

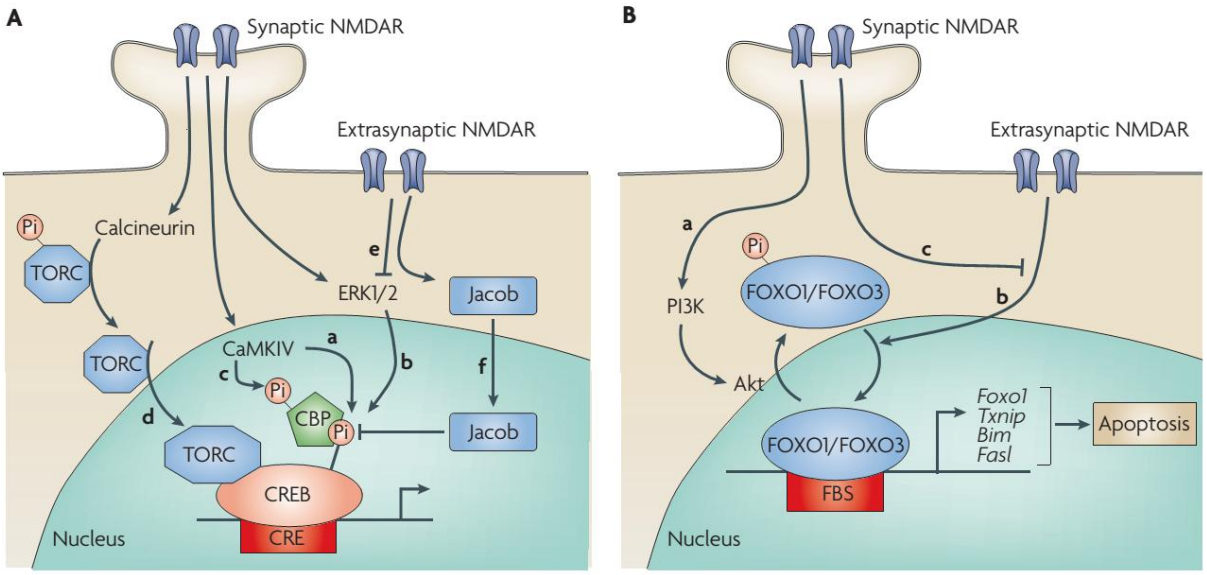
Além de aumentar a expressão de genes anti-apoptóticos, a sinalização pelo NMDAr suprime a ação de fatores de transcrição pró-apoptóticos como o FOXO (*forkhead box O*), que está envolvido principalmente nos processos de injúria e carência de fatores tróficos. Dentre os genes ativados por este fator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

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

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

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

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



Fonte: (Hardingham, Bading, 2010).

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

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

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

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

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a ação do glutamato sobre o receptor NMDA durante os processos de hipóxia na modulação da resposta imune tanto de células da glia quanto em células imunes infiltrantes do sistema nervoso central.

2.2 Objetivo específico

- Avaliar a gravidade da lesão desenvolvida no modelo de AVC em animais tratados ou não com "*Dizocilpine*" (MK801);
- Avaliação da expressão do NMDAr no SNC pós AVC em animais tratados ou não com MK801;
- Verificar do perfil de ativação das células da glia pós hipóxia *in vitro* e em contato com células imunes na presença do antagonista do NMDAr;
- Medir a atuação do NMDAr sobre a produção de enzimas antioxidantes e das espécies reativas do oxigênio;
- Avaliar a expressão dos diferentes tipos de NMDAr sobre as células imunes e a atuação dos mesmos na ativação dessas células;
- Verificação do perfil de ativação e secreção de citocinas nas células imunes cultivadas com células da microglia submetidas ou não à hipóxia *in vitro.*
- Avaliar quais são os mecanismos envolvidos nas mudanças do perfil de ativação destas células, bem como quais são as vias responsáveis por tal modulação.

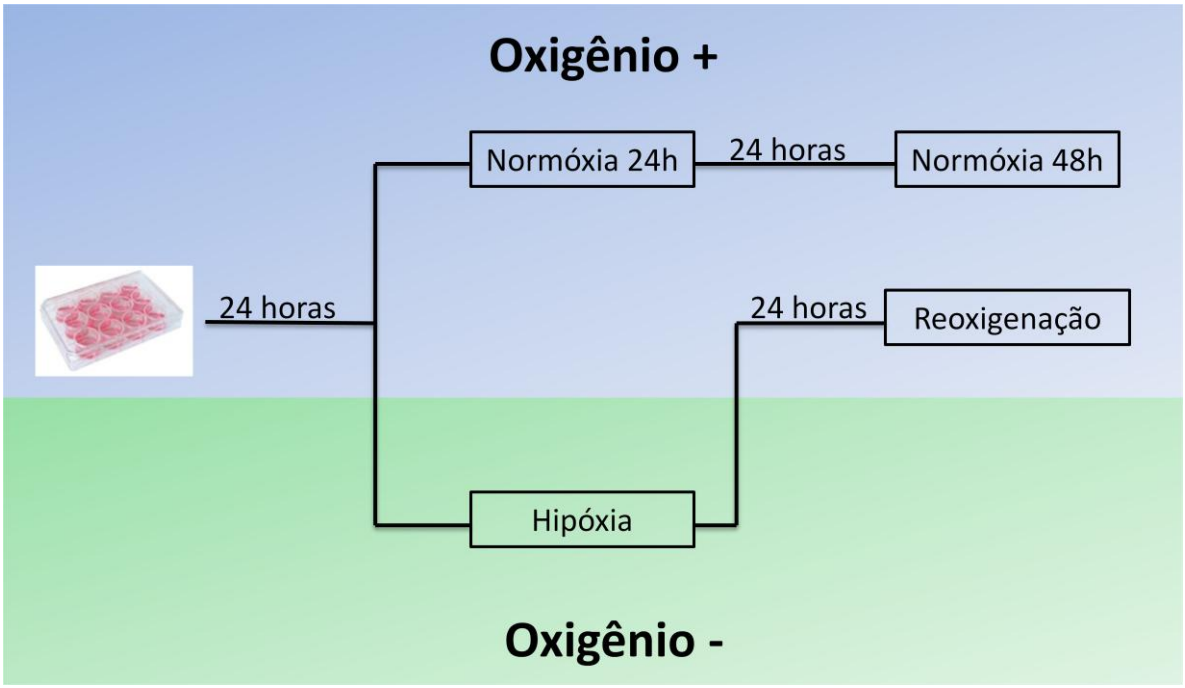
3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Hipóxia em linhagens de microglia e neurônios ou culturas primárias de células do SNC co-cultivadas com células do sistema imune.

Para melhor visualização das interações neuroimunes, foi padronizado o modelo de hipóxia *in vitro*. Para tanto, iniciamos com linhagens de células da microglia (C8B4) e de neurônios dopaminérgicos (SH-SY5Y) onde as culturas foram mantidas em hipóxia por 24 horas a 1% de O_2 seguidas de reoxigenação em estufa comum a 22% O_2, possuindo grupos controle para cada período (Normóxia 24 horas / Normóxia 48 horas). Após esse período as células foram descoladas com tripsina 1% e submetida as análises experimentais (Figura 5)

Para os experimentos que utilizaram MK801, iniciamos o tratamento 20 minutos antes de colocar as células na estufa. Já os experimentos cujas células da glia foram co-cultivadas com macrófagos tratados ou não com o MK801, as mesmas foram primeiramente expostas por 24 horas na câmara de hipóxia e o contato com as células periféricas apenas no período de reoxigenação. Após esse período, as células e seus subprodutos avaliadas por diferentes técnicas.

Figura 5 - Esquema ilustrativo do procedimento de hipóxia.



Fonte: Autoria própria.

3.2 Quantificação Celular

A quantificação de células vivas e mortas foi realizada por duas técnicas diferentes. Através do aparelho *Countess*™ *cell counter* (Invitrogen ™) e pela técnica de laranja de acridina e brometo de etídio.

3.2.1 Contagem celular

Após a realização do experimento de hipóxia o sobrenadante destas células foi coletado e adicionada 300 µl por poço de tripsina 1% seguido de incubadação por 6 minutos a 37 ºC e descoladas com auxílio de uma pipeta. Tais células foram lavadas com meio DMEM contendo 10% de soro fetal bolvino (Gibco) e adicionadas a tubos cônicos (falcons) de 15 ml contendo seu respectivo sobrenadante. Em seguida as células foram centrifugadas a 450 g por 5 minutos a 4 ºC, seu sobrenade descartado e ressuspendida em 1 ml de meio DMEM com soro 10%. Por fim as células foram diluídas na proporção 1:1 em azul de trypan e 10 µl foram colocados nas laminas de contagem e levadas ao *Countess* ™ *cell counter* (Invitrogen ™). O aparelho indica o número de células vivas, mortas e o percentual da viabilidade celular.

3.2.2Laranja de acridina e Brometo de etídio

A contagem de células vivas e mortas por esta técnica ocorre de maneira similar à do *cell counter*, contudo após a realização do experimento de hipóxia foram adicionados 10µl de uma solução 1:1 de laranja de acredina (50 µM) e brometo de etídio (50 µM). Logo após a aplicação da solução as células foram levadas para microscópio de fluorescência (Nikon®) para que as imagens pudessem ser reveladas. A laranja de acridina por ser lipossolúvel consegue atravessar a membrana plasmática da célula e se ligar no DNA corando-o de verde durante a visualização pelo microscópio de imunofluorescência. Já o brometo de etídio necessita de poros na membrana celular para adentrar a célula e se ligar no DNA, orando-o de vermelho. Assim é considerado que células que brilhem unicamente em verde durante o processo da

imunofluorescência são denominadas de células vivas, enquanto que as que brilham em vermelho caracterizam células mortas. A análise é realizada através da sobreposição das fotos tiradas no aumento de 20 x nos filtros FITC e PE do microscópio de imunofluorescência Nikon e sua quantificação é feita pelo uso da ferramenta *cell counter* do programa *Image J*.

3.3 Citometria de fluxo

Após o experimento as células foram tripsinizadas e posteriormente ressuspendidas em 80 µl de Fc block para impedir a ligação inespecífica dos anticorpos, sendo a incubação realizada por 20 minutos a 4 °C. Logo após este processo as células sofreram centrifugação a 450 g 4 °C por 5 minutos e ressuspendidas com os anticorpos específicos conjugados com os devidos fluorocromos (Alexa Fluor 488, FITC, PE, PERCP ou APC) pelo tempo de 20 minutos a 4 °C protegidos da luz. Posteriormente as células foram lavadas duas vezes com 200 µl de PBS e centrifugadas a 450 g a 4 °C por 5 minutos. Por fim essas células foram ressuspendidas em 200 µl de PBS e lidas através do citômetro de fluxo FACS Accuri C6 (BD Bioseciences).

3.4 Isolamento de células CD11b+ pelo Kit CD11b MicroBeads - mouse/human (MACS)

Para isolamento das células CD11b+ utilizamos 3 baços de animais C57BL/6, maceramos com auxílio de *cell strainer* de 70 µM seguido de centrifugação. Posteriormente descartamos o sobrenadante e adicionamos 1 ml de tampão de lise de hemácias pelo período de 1 minuto seguido da adição de 10 mls de meio DMEM acrescido de 10% de soro fetal bovino. Por fim as células foram novamente centrifugadas e resuspendidas em meio HBSS (sem cálcio, magnésio e soro fetal bovino) seguido da utilização do Kit CD11b *MicroBeads Magnetic cell sorting (MACS)*, seguindo instruções do fabricante.

3.5 Cultura de macrófagos provenientes da medula óssea

Utilizamos macrófagos diferenciados da medula óssea. Para tal, anestesiamos os camundongos, fizemos a eutanásia por deslocamento cervical e retiramos suas tíbias e fêmures para fazermos a lavagem da medula com PBS. As células foram filtradas em peneiras estéreis de poliestireno (70–100 µm) e foram divididas em 10 placas de Petri (100 x 20 mm Style, BD, Franklin Lakes, EUA) com 10 ml de meio contendo 60% de DMEM-High (Invitrogen, EUA), 25% de sobrenadante de cultura de células L929 e 15% de soro fetal bovino. No quarto dia de cultura adicionamos mais 10 ml do meio para diferenciação, descrito anteriormente. Coletamos as células no sétimo dia utilizando acutase (MP Biomedicals, CA, EUA) após lavá-las com PBS.

3.6 Diferenciação de macrófagos

Consideramos macrófagos M0 aqueles nos quais colocamos apenas DMEM-High (Invitrogen, EUA) e 5% de soro bovino fetal após termos diferenciados as células com sobrenadante de cultura de L929. Para polarização para um fenótipo M1, os macrófagos diferenciados a partir da medula óssea de diferentes camundongos (M0) foram cultivados na presença de 10 ηg/mL de LPS (Sigma-Aldrich, MO, EUA) e 50 ηg/mL IFNγ (R&D Systems, MN, EUA) diluídos em DMEM-High (Invitrogen, EUA) suplementado com 5% de soro bovino fetal por 24 horas. Para polarização para um fenótipo M2, adicionamos aos macrófagos 10 ηg/mL de IL4 (Peprotech, CA, EUA) e 10 ηg/mL de IL13 (R&D Systems, MN, EUA) por 24 horas, nas mesmas condições de cultura acima descrita. Outro protocolo alternativo para a polarização de macrófagos em um perfil M2 consistiu em lavar as células retiradas da medula óssea com PBS, filtrá-las em peneiras de poliestireno (70–100 µm) e cultivá-las na presença de 10 ηg/mL de M-CSF diluído em DMEM-High (Invitrogen, EUA) suplementados com 5% de soro bovino fetal por sete dias.

3.7 Cultura de neutrófilos provenientes da medula óssea

Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e as tíbias e fêmures foram lavados com RPMI incompleto a fim de obter as células totais da medula óssea. Posteriormente, transferimos para tubos de 15 mL e realizada a lise de eritrócitos. Após a lise, as células foram centrifugadas a 450 g por 5 minutos a 4 ºC. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em 2 ml de percoll 55%. Essa suspensão foi adicionada lentamente sobre o Percoll 62% (2 ml) e 81% (3 ml) em tubos de 15 ml e centrifugada por 30 minutos a 1200 g, 24 °C. Formaram-se três anéis contendo células mononucleares (55%), neutrófilos imaturos (62%) e neutrófilos maduros (81%). Descartamos os dois primeiros anéis e o terceiro anel de células foi diluído em 13 ml de meio RPMI completo e centrifugado a 450 g por 5 minutos a 4 ºC. O sobrenadante foi descartado e as células foram diluídas em 2 ml de meio RPMI completo e contadas. 5 x 10^5 células foram alocadas em placas de 96 poços fundo "U" e submetidas a diferentes estímulos.

3.8 Quantificação da produção de óxido nítrico

As células foram incubadas, em placa de 96 wells, com o reagente DAF-FM (diacetato de 4,5-diaminofluoresceína, Life Technologies), à 5 µM, por 20 minutos à 37 °C. Esta molécula é permeável à membrana da célula e em contato com o óxido nítrico forma um composto fluorescente impermeável à membrana celular, sendo possível sua quantificação por citometria de fluxo.

3.9 Quantificação de proteínas por Citometria de Fluxo (BD CBA)

Para a quantificação das citocinas (IL-1β, IL-6, IL-10 e TNF-α) provenientes do plasma e cérebro dos animais MCAO ou das células expostas à câmara de hipóxia, utilizamos os ensaios de CBA com kit, seguindo instruções do fabricante - BD®. As análises serão realizadas em FACS Accuri C6 (BD Bioseciences).

3.10 Marcação por Cell Trace - CFSE

Para o reconhecimento dos monócitos CD11b+ na leitura da citometria de fluxo, foi feita a marcação pelo traçador celular CFSE (Thermo Fisher). A marcação consiste em incubar as células obtidas em 1ml de meio HBSS (sem cálcio, magnésio e soro fetal bovino) acrescido de 1 µL da solução de CFSE por 15 minutos em banho maria à 37 ºC. Após esse período são adicionados mais 9 mls de meio HBSS, agora contendo em sua formulação 10% de soro fetal bovino, e levados novamente para o banho maria por mais 5 minutos. Após esta incubação as células foram centrifugadas e ressuspendidas em meio DMEM com 10% de soro fetal bovino e acrescentadas as culturas.

3.11 Marcação com Anexina V e PI

As células foram lavadas e ressuspendidas em tampão de ligação (10 mM Hepes (pH 7,4), 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$ e 1,8mM $CaCl_2$) contendo anexina V-FITC e PI na diluição 1 : 20 (em volume final de 20 µL anexina, PI) e incubadas por 20 minutos à temperatura ambiente, no escuro. Após esse período, foi acrescentado o volume de 80 µL do tampão de ligação e as amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo FACS Accuri C6® (BD Pharmingen®).

3.12 Imunofluorescência

As lâminas foram fixadas com metanol por 5 minutos e posteriormente permeabilizados com Triton X100 a 0,5% por 10 minutos. Os sítios inespecíficos foram bloqueados com soro de coelho durante 1 hora a temperatura ambiente. Após esse período foram realizadas duas lavagens com PBS seguidas de incubação com anticorpo primário epecífico *overnight* na geladeira em câmara úmida. Os anticorpos específicos foram então marcados com anticórpos secundários conjugados a fluoróforos Alexa Fluor 488 (verde) ou Alexa Fluor 594 (vermelho) por duas horas. As lâminas foram então lavadas e incubadas com DAPI para a visualização nuclear. As análises e aquisições de imagem foram realizadas em microscópio de fluorescência (Nikon®).

3.13 Determinação da atividade enzimática

3.13.1 Determinação da atividade de glutationa peroxidase (GPx)

Este método baseia-se na medida indireta da atividade da GPx, por meio de uma reação casada com a glutationa redutase (GR) (Beutler, 1985). A glutationa oxidada (GSSG), produzida pela redução por hidroperóxidos pela GPx, é reciclada para gerar seu estado reduzido pela GR e NADPH.

$$2GSH + R\text{-}O\text{-}O\text{-}H \xrightarrow{GPx} GSSG + H_2O + R\text{-}OH$$

$$GSSG + NADPH + H^+ \xrightarrow{GR} 2GSH + NADP^+$$

O substrato utilizado neste ensaio é o terc-butil hidroperóxido. A oxidação de NADPH a $NADP^+$ é acompanhada pelo decaimento da absorbância a 340 ŋm e à 37 °C.

Para otimização do método avaliou-se a quantidade ideal de proteínas totais (25 a 100 µg) e as soluções reagentes (preparadas em tampão fosfato 0,1 M pH=7,0 e EDTA 1,0 mM): NADPH 1,2 mM (15 e 30 µL) e t-butil hidroperóxico 0,46% V/V (5 e 10 µL), mantendo-se constantes as soluções de glutationa reduzida 80 mM (5 µL) e glutationa redutase 0,0096 U/ µL (5 µL).

A combinação escolhida foi a de 80 µg de proteína, 30 µL de NADPH e 5 µL de t-butil hidroperóxido, já que apresentou maior reprodutibilidade, maior atividade e alta linearidade.

Com base na análise dos estudos realizados, obteve-se as condições ótimas para realização do método, descritas a seguir.

Adiciona-se em cada cavidade de uma microplaca, 125 µL de tampão fosfato 0,1 M pH=7,0 e EDTA 1,0 mM; 30 µL de amostra (correspondente à 80 µg de proteína totais); 5 µL de solução de glutationa reduzida (GSH) 80mM; 0,048 U de glutationa redutase (5 µL da solução 0,0096 U/µL). Essa mistura é incubada por 5 minutos a 37 ºC, logo após são adicionados 5 µL de solução de terc-butil hidroperóxido 0,46% e 30 µL de solução de NADPH

1,20 mM. O decréscimo na absorbância é monitorado a 340 ŋm por 3 minutos. As amostras são analisadas em triplicata.

A atividade é então determinada a partir da fórmula:

$$Atividade = \left[\frac{k}{\xi_{NADPH}.b} \times \frac{200\mu L}{30\mu L} \right] / 80\mu g$$

Sendo:

Atividade: atividade específica da GPx (U/µg de proteína);

k: inclinação da curva de decaimento (min^{-1});

b: caminho óptico (0,524 cm);

ξ_{NADPH} : 6,22 x 10^{-3} ($\mu M^{-1} cm^{-1}$);

80 µg : quantidade de proteínas totais utilizada no ensaio (80 µg);

$\frac{200\mu L}{30\mu L}$: diluição da amostra na cubeta;

30 µL : volume de amostra correspondente à 80 µg de proteína;

3.13.2 Determinação da atividade de glutationa redutase (GR)

O método baseia-se na medida direta da atividade da GR, que utiliza o NADPH como co-fator na redução da GSSG em GSH. A oxidação de NADPH a $NADP^+$ é acompanhada pelo decaimento da absorbância a 340 ŋm e à 37 °C.

$$GSSG + NADPH + H^+ \xrightarrow{GR} 2GSH + NADP^+$$

Para otimização do método avaliou-se a quantidade ideal de proteína totais (20 a 120 µg), mantendo-se os reagentes: NADPH (0,4 mg/mL de meio reacional); glutationa oxidada (2 mg/mL de meio reacional) e EDTA 0,005 mM (30% V/V em meio reacional).

Os resultados escolhidos foram aqueles que apresentaram maior linearidade e atividade enzimática.

As condições ótimas para determinação da atividade enzimática da glutationa reduzida são apresentadas a seguir:

Preparar 10 mL de meio reagente no momento do uso com 4 ml de tampão fosfato 0,10 M pH 7,0 e EDTA 1,0 mM; 3 ml de EDTA 0,005 M; 3 ml de água deionizada, 0,02 g de glutationa oxidada (GSSG) e 4 mg de NADPH. Adiciona-se em cada poço de uma microplaca 20 µL (volume de amostra correspondente à 80 µg de proteínas totais) e 180 µL de meio reacional.

O decréscimo dos valores de absorbância é monitorado a 340 ŋm por 5 minutos à 37 ºC. As amostras são analisadas em triplicata.

A atividade é então determinada a partir da fórmula:

$$Atividade = \left[\frac{k}{\xi_{NADPH}.b} \times \frac{200\mu L}{20\mu L} \right] / 80\mu g$$

Sendo:

Atividade = atividade específica da GR (U/µg de proteína)

k = inclinação da curva de decaimento (min^{-1})

b = caminho óptico (0,524 cm)

ξ_{NADPH} = 6,22 x 10^{-3} ($\mu M^{-1} cm^{-1}$)

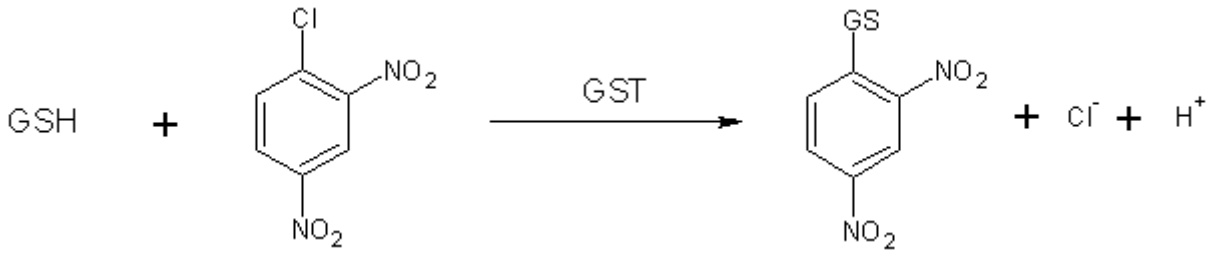
80 µg = quantidade de proteínas totais utilizada no ensaio

$\frac{200\mu L}{20\mu L}$ = diluição da amostra na cubeta

20 µL = volume de amostra correspondente à 80µg de proteína

3.13.3 Determinação da glutationa S-transferase (GST)

O método baseia-se na formação de um complexo entre a GSH e o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), catalisada pela GST. O aumento de absorbância é diretamente proporcional à atividade da GST na amostra.



Para otimização do método avaliou-se a quantidade ideal de proteína totais (10 a 100 µg) e as soluções reagentes de CDNB 0,1 M, preparada em etanol absoluto (5 e 10 µL) e de glutationa reduzida, preparada em tampão fosfato 0,1 M pH=6,5 (10, 15 e 20 µL), além do tempo de incubação na qual se variou entre 2, 5 e 10 minutos.

Foram escolhidos os padrões que apresentaram melhor linearidade e maior atividade.

Assim, as condições ótimas para determinação da atividade enzimática da GST são:

Adiciona-se em cada cavidade de uma microplaca, 20 µL (volume de amostra correspondente à 80 µg de proteínas totais), tampão fosfato 0,1 M pH=6,5 (160 µL); 5 µL de solução de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) 0,1 M; essa mistura é pré-incubada por 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, adiciona-se 15 µL de glutationa reduzida (GSH) 0,1 M. O aumento na absorbância é monitorado a 340 ŋm por 5 minutos à 25 ºC. As amostras são analisadas em triplicata.

A atividade é então determinada a partir da fórmula:

$$Atividade = \left[\frac{k}{\xi_{CDNB}.b} \times \frac{200\mu L}{20\mu L} \right] / 80\mu g$$

Sendo:

Atividade = atividade específica da GST (U/µg de proteína)

k= inclinação da curva (min^{-1})

b= caminho óptico (0,524 cm)

ξ_{CDNB} = 9,60 x 10^{-3} ($\mu M^{-1} cm^{-1}$)

80µg = quantidade de proteínas totais utilizada no ensaio

$\frac{200\mu L}{20\mu L}$ = diluição da amostra na cubeta

20 µL = volume de amostra correspondente à 80 µg de proteína

3.14 Real Time PCR

3.14.1 Extração do RNA

A homogeneização das células foi feita em Trizol® (Invitrogen). Adiciona-se 1 ml do reagente para a homogenização e aguarda 5 minutos em temperatura ambiente. A seguir foram adicionados 200 µL, de clorofórmio para separação das fases, agita-se manualmente e aguarda de 2 a 3 minutos. Os eppendorfs são então centrifugados a 12.000 rcf por 15 minutos à temperatura de 4 ºC. Após este procedimento se obtém a separação do RNA, DNA e das proteínas. O RNA é então separado em novo eppendorf e acrescido de 500 µL de isopropanol, o conteúdo é vortexado e deixado em repouso a temperatura ambiente por 10 minutos. Procede-se nova centrifugação por 15 minutos em 12.000 rcf à 4 ºC e o sobrenadante é descartado evitando contato com o precipitado de RNA. Adiciona-se 1ml de etanol 75% e centrifuga-se a 7.500 rcf por 5 minutos à 4 ºC, removendo o sobrenadante e o precipitando sendo seco em bancada, por aproximadamente 5 minutos. Após a secagem o RNA é ressuspendido em 25 µL de água ultra pura (RNAse/DNAse free). A quantificação do RNA é feita no aparelho NanoDrop 1000 (Thermo Scientific).

3.14.2 Preparação do cDNA

Utiliza-se uma concentração de 1 µg/µL de RNA, diluído em 13 µL de solução aquosa RNAse/DNAse free. Adiciona-se 1 µL de Oligo dT e 1 µL de dNTPmix (10mM de dATP, dTTP, dCTP, dGTP), misturando através de pipeta. Esta mistura deve ser levada ao termociclador por 5 minutos à 65 ºC, sendo a reação seguida por incubação em gelo por 1 minuto. O próximo passo consistiu da adição de 4 µL de 5x first-strand Buffer, 1 µL de DTT 0,1 M e 1 µL de Super Script III RT 200 U/µL. A solução é novamente homogeneizada com a pipeta, e levada ao termociclador por 60 minutos à 50 ºC no primeiro ciclo, 15 minutos à 70 ºC no segundo ciclo e posteriormente 5 minutos à 4 ºC. O cDNA obtido é armazenado à -20 ºC até realização das análises.

3.14.3 PCR em tempo Real

O cDNA preparado foi diluído em uma proporção de 1:5, sendo então utilizados 5 µL da solução para cada análise. O meio reacional é feito através da junção de 1 µL de *20x Taqman Gene Expression Assay*, 10 µL de *2x Taqman Gene Expression Assay Master Mix* e 4 µL de água ultra pura (*RNAse/DNAse free*), este meio é então pipetado em tubos Strip®, e em seguida adicionado da solução de cDNA. A partir deste momento a reação é levada ao termociclador Applied Biosystems 7900HT Real-Time PCR System®.

3.15 Dosagem do Glutamato

Para a quantificação do glutamato proveniente do sobrenadante de nossas culturas, utilizamos o kit, *Glutamate Colorimetric Assay Kit* da BioVision, seguindo instruções do fabricante. Para as células C8B4 fora utilizado o sobrenadante de 4 dias de cultura sendo as últimas 24 horas o período de estímulo ou não por LPS 100 ŋg/ml. Da mesma forma fora feita para as culturas de baço e SHY. Para as culturas de timócitos e macrófagos provenientes da medula óssea, as células ficaram em culturas por 7 dias sendo as últimas 24 horas o período de estímulo ou não por anti-CD3 1 µg/ml (Timócitos) e LPS 100 ŋg/ml (macrófagos). A leitura fora realizada no espectrofotômetro a 450 ŋm.

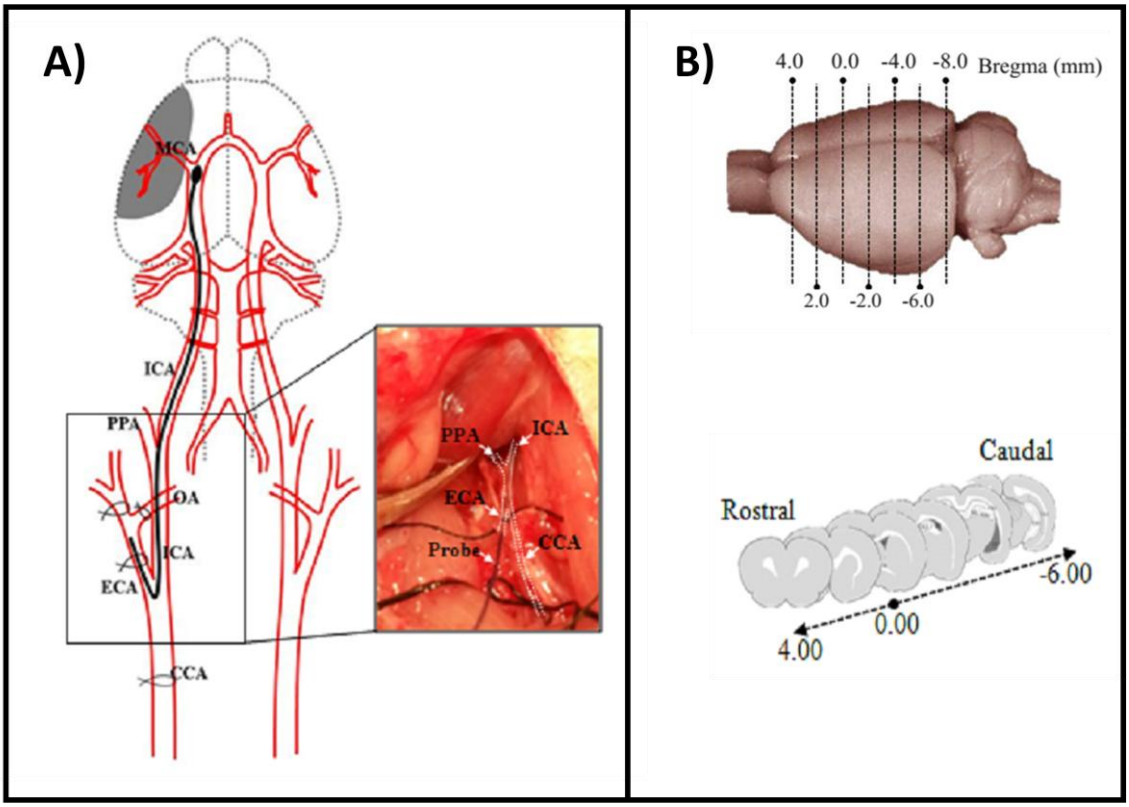
3.16 Animais experimentais

Foram utilizados camundongos fêmeas C57BL/6 de 6-8 semanas provenientes do biotério do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB – USP). Os animais foram mantidos em microisoladores contendo 5 animais e receberam água e ração *ad libitum*. Os experimentos foram realizados de acordo com as normas e regras do comitê de ética em experimentação animal do Instituto de Ciências Biomédicas.

3.17 Indução da Oclusão da Artéria Cerebral Média - MCAO

Animais C57Bl/6 foram devidamente anestesiados com xilazina (10 mg/kg) e ketamina (90 mg/kg) administrada por via intraperitoneal para o procedimento cirúrgico. A temperatura foi mantida entre 36,5 e 37 ºC com o auxílio de uma cama térmica. A região cirúrgica foi desinfetada com álcool a 70%. Uma incisão na linha média do pescoço foi feita e os tecidos moles sobre a traquéia foram delicadamente retraído com um afastador. A artéria carótida comum (CCA), artéria carótida externa (ECA) e artéria carótida interna (ICA) foram cuidadosamente isoladas a partir do nervo vago. Normalmente, o CCA se bifurca em ECA e ICA, que fluem em direção às regiões faciais e cranianas, respectivamente, e em seguida, o ICA bifurca em artéria cerebral média (MCA) e pterigopalatina (PPA). Através de um nó com fio de sutura puxamos a artéria occipital (OA) que se origina a partir da bifurcação onde se separa a ECA da ICA (Figura 6A), abrindo caminho pra se trabalhar com as artérias carótidas externas e internas. Logo em seguida dois nós permanentes foram então colocados na parte distal do ECA para impedir o refluxo do sangue. Um nó não permanente (para facilitar manuseio) é colocado na ICA e CCA. Em seguida fora feita uma secção não completa da ECA por onde um monofilamento é introduzido. Após a introdução deste a ECA é completamente dissecada e direcionada na mesma posição da ICA, assim é possível ir com o filamento em direção a MCA. Ao chegar na MCA o filamento de 0,15 mm obstrui completamente a passagem do sangue para esta região. O mesmo fora deixado nessa posição por 1 hora. Após esse período o filamento foi cuidadosamente retirado, quando reperfusão foi confirmada, o pescoço foi costurado com fio cirúrgico e o animal deixado em repouso por 24 horas. Posteriormente os animais foram sacrificados e analisados para infarto cerebral. Para a realização dos cortes no cérebro desses animais, fora utilizado um molde com espaçamento de 2 mm (Figura 6B) e a coloração da área infartada fora realizada por TTC.

Figura 6 - Indução da Oclusão da Artéria Cerebral Média - MCAO. A) representação do caminho seguido pelo monofilamento até chegar na região da MCA. B) Representação dos cortes feitos no cérebro dos animais 24 horas após cirurgia.



Fonte imagem adaptada de Lee et al., (2014).

3.18 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do *software* computacional *Graphpad Prism* (*Graphpad Software Incorporation*®) versão 5.0. Os testes t-Student são não pareados enquanto que os ANOVA utilizados, foram seguidos pelo pós-teste de Tukey. Valores de $p<0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4 RESULTADOS

4.1 Resultados in vitro

4.1.1 Avaliação dos processos de hipóxia e reoxigenação sobre a viabilidade das células do sistema nervoso central

Iniciamos os nossos experimentos pela exposição de linhagens de células residentes do SNC (microglia, neurônio) ao ambiente de hipóxia (1% O_2) e avaliamos se esta condição era capaz de alterar a viabilidade celular. Este protocolo foi dividido em quatro grupos experimentais:

- **Normóxia 24 horas.** As células são mantidas por 24 horas em estufa à 37 ºC sendo o grupo controle para as células em hipóxia.
- **Hipóxia.** As células são condicionadas na câmara de hipóxia pelo período de 24 horas.
- **Normóxia 48 horas.** As células são mantidas por 48 horas em estufa à 37 ºC sendo o grupo controle para as células que sofreram reoxigenação.
- **Reoxigenação.** As células são condicionadas na câmara de hipóxia pelo período de 24 horas. Posteriormente as mesmas são colocadas em estufas de CO_2 por mais 24 horas.

Resultados preliminares com azul de trypan demonstraram uma queda na viabilidade das células da microglia (C8B4) durante o período de reoxigenação. Contudo a linhagem de neurônio SH-SY5Y (SHY), apresentou-se mais resistente, não apresentando queda em sua viabilidade, durante nenhuma das alterações nos níveis de oxigenação (Figura 7).

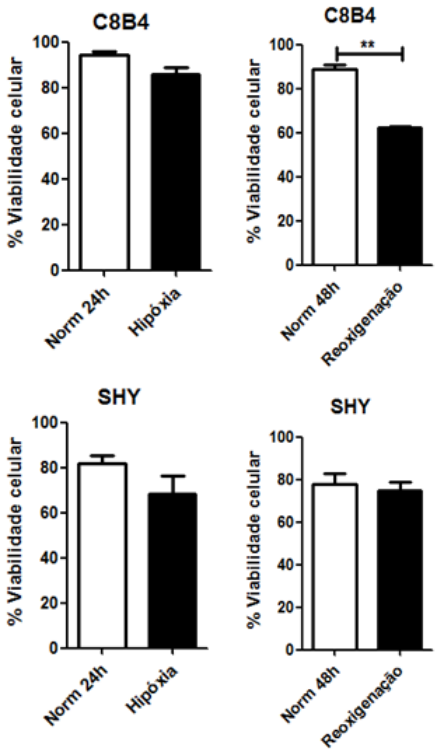
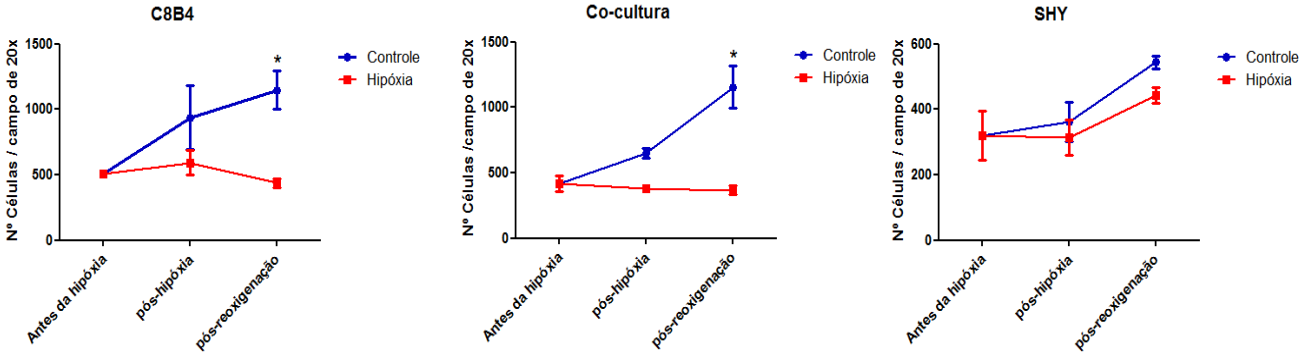


Figura 7 - Viabilidade celular pós hipóxia. 250 mil células das linhagens de microglia (C8B4) e de Neurônio, SH-SY5Y (SHY), foram plaqueadas em placas de 6 poços. As mesmas passaram pelo protocolo de hipóxia e analisadas nos seus devidos *time points* através da técnica de azul de trypan pelo aparelho *cell counter*. Teste t-student. * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001.

Para a confirmação desse fenômeno, realizamos novamente o ensaio de hipóxia com as linhagens celulares acrescentando um novo grupo (Co-cultura) que consiste na cultura de ambas as linhagens (C8B4 e SHY) no mesmo poço. Neste experimento avaliamos a viabilidade celular através da técnica de Laranja de acridina e brometo de etídio.

A laranja de acridina por ser lipossolúvel consegue atravessar a membrana plasmática da célula e se ligar ao DNA dupla fita, corando o núcleo de verde durante a visualização pelo microscópio de imunofluorescência. Já o Brometo de etídio não permeia a membrana intacta da célula, assim o mesmo só consegue se ligar ao DNA, corando os núcleos de vermelho, quando a membrana celular não está íntegra. Por tanto, é considerado que células que brilhem unicamente em verde durante o processo de fluorescência são células vivas, enquanto que as que brilham em vermelho demonstram uma menor integridade de membrana, caracterizando-as como mortas. Nossos dados confirmaram os resultados iniciais, mostrando novamente uma maior susceptibilidade a morte das células da microglia perante o processo de hipóxia, bem como resistência dos neurônios à esse stress (Figuras 8 e 9).

A)



B)

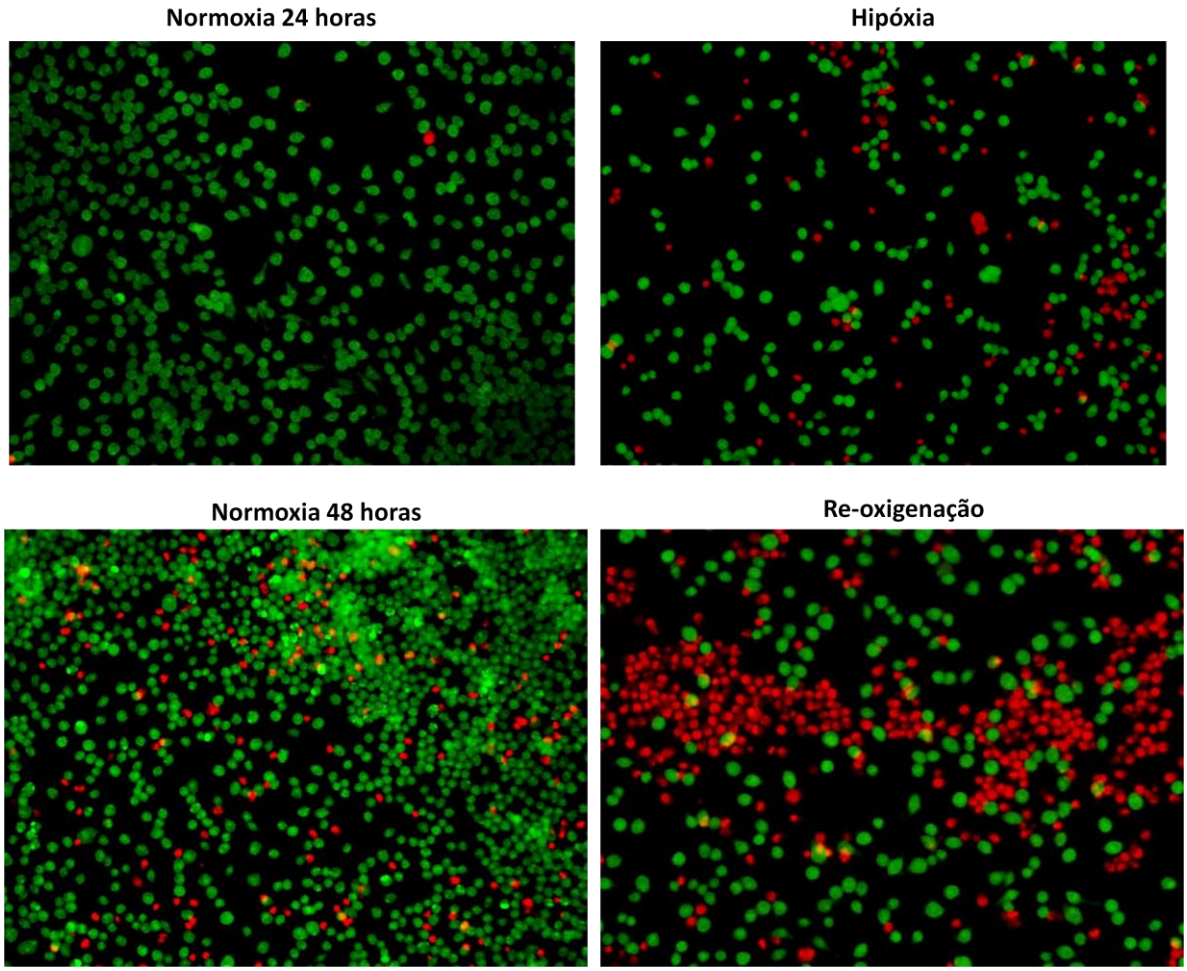


Figura 8 - Avaliação da morte celular nas linhagens celulares no decorrer da hipóxia. A) curva do número total de células nos períodos antes-hipóxia, pós-hipóxia e pós-reoxigenação. B) Representação das imagens adquiridas ao microscópio de imnofluorescência (co-cultura de C8-B4 com SH-SY5Y). Dados obtidos através do ensaio de laranja de acridina e brometo de etídio. One way- ANOVA.

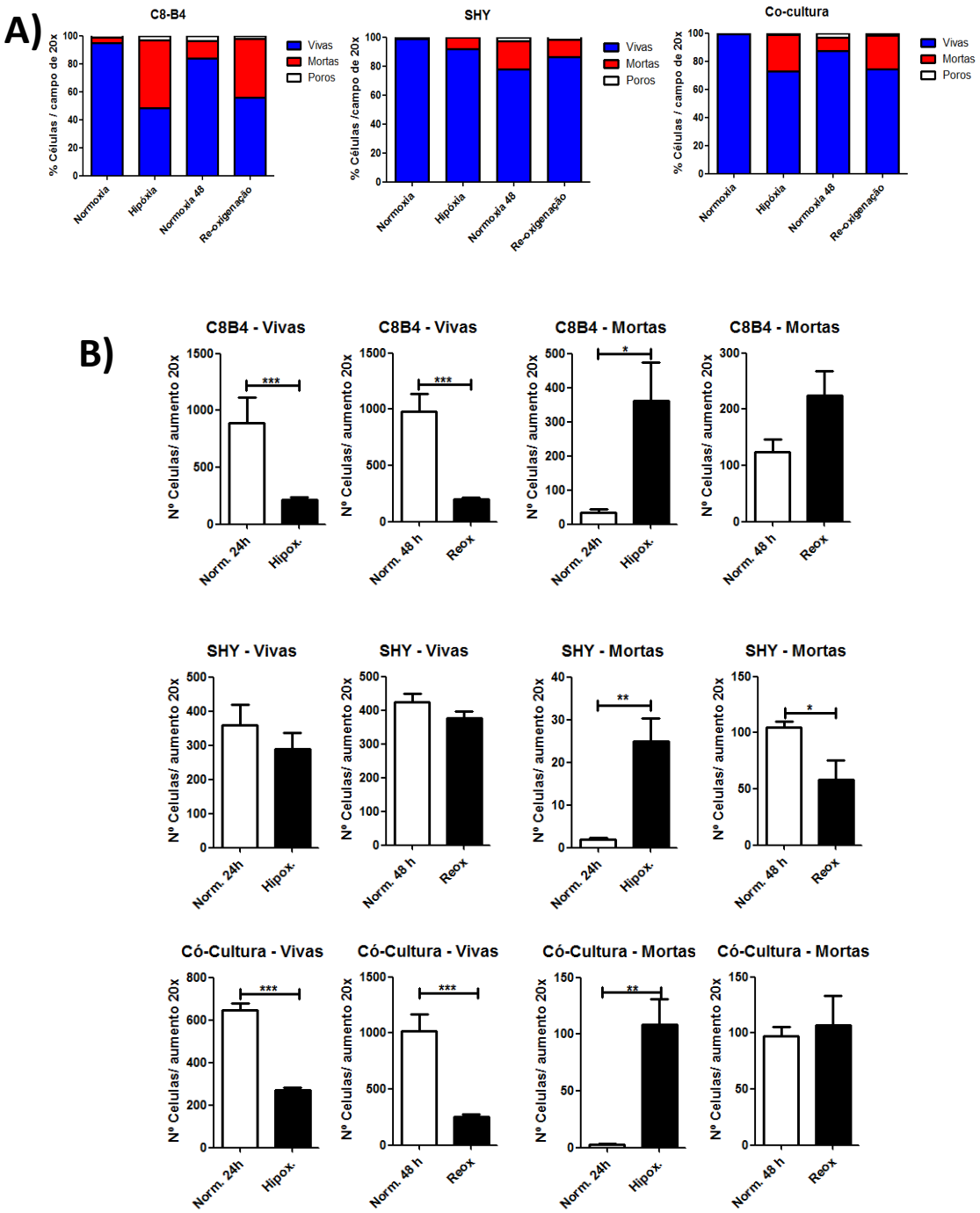


Figura 9 - Quantificação das células vivas e mortas durante o protocolo de hipóxia. A) Representação da frequência de células vivas e mortas em todos os grupos estudados. B) Quantifcação do número de células vivas e mortas nos diversos grupos. Avaliação feita através de contagem pelo pluging "Cell Counter" do programa *Image J*. Analise estatística feita por teste t- student. * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001.

4.1.2 Efeito da hipóxia sobre os mecanismos efetores de células da microglia e neurônios.

Posteriormente aos ensaios de morte, iniciamos as avaliações sobre as funções efetoras moduladas durante o processo de hipóxia e como esses mecanismos podem influenciar no desencadeamento da morte dessas células. De início avaliamos se o estresse oxidativo era um dos responsáveis pela queda de viabilidade. Para tanto avaliamos a resposta anti-oxidativa dessas células após o estresse de hipóxia e reoxigenação. Foram analisadas três enzimas antioxidantes: GPx (glutationa peroxidase), GR (glutationa redutase) e GST (glutationa-S-transferase). Tanto a GPx quanto a GST atuam na sobrevida celular promovendo a conversão do peróxido de hidrogênio em água. Por sua vez, a GR irá converter a glutationa oxidada (GSSG) pela reação anterior para a glutationa reduzida (GSH), deixando-a livre para ser utilizada novamente para a defesa antioxidante do ambiente. Portanto, as três enzimas dosadas compõem um sistema altamente regulado e dependente de energia que auxiliam o sistema através de sua ação antioxidante.

Na figura 10, observamos que tanto as células da microglia isoladas, quanto o grupo Co-cultura apresentam níveis reduzidos das enzimas GST e GR durante o período da reoxigenação. Já a linhagem SHY apresentou uma diminuição apenas em GR durante o período de hipóxia, mas sem alterações na razão GPx/GR sugerindo que, sozinha, essa linhagem recebe pouca influência do estresse oxidativo, enquanto que as células da microglia são as principais responsáveis por esse fenômeno. A partir desses dados decidimos focar na resposta das células da microglia, bem como quais modulações na sua resposta poderiam influenciar nos danos observados na resposta ao AVC.

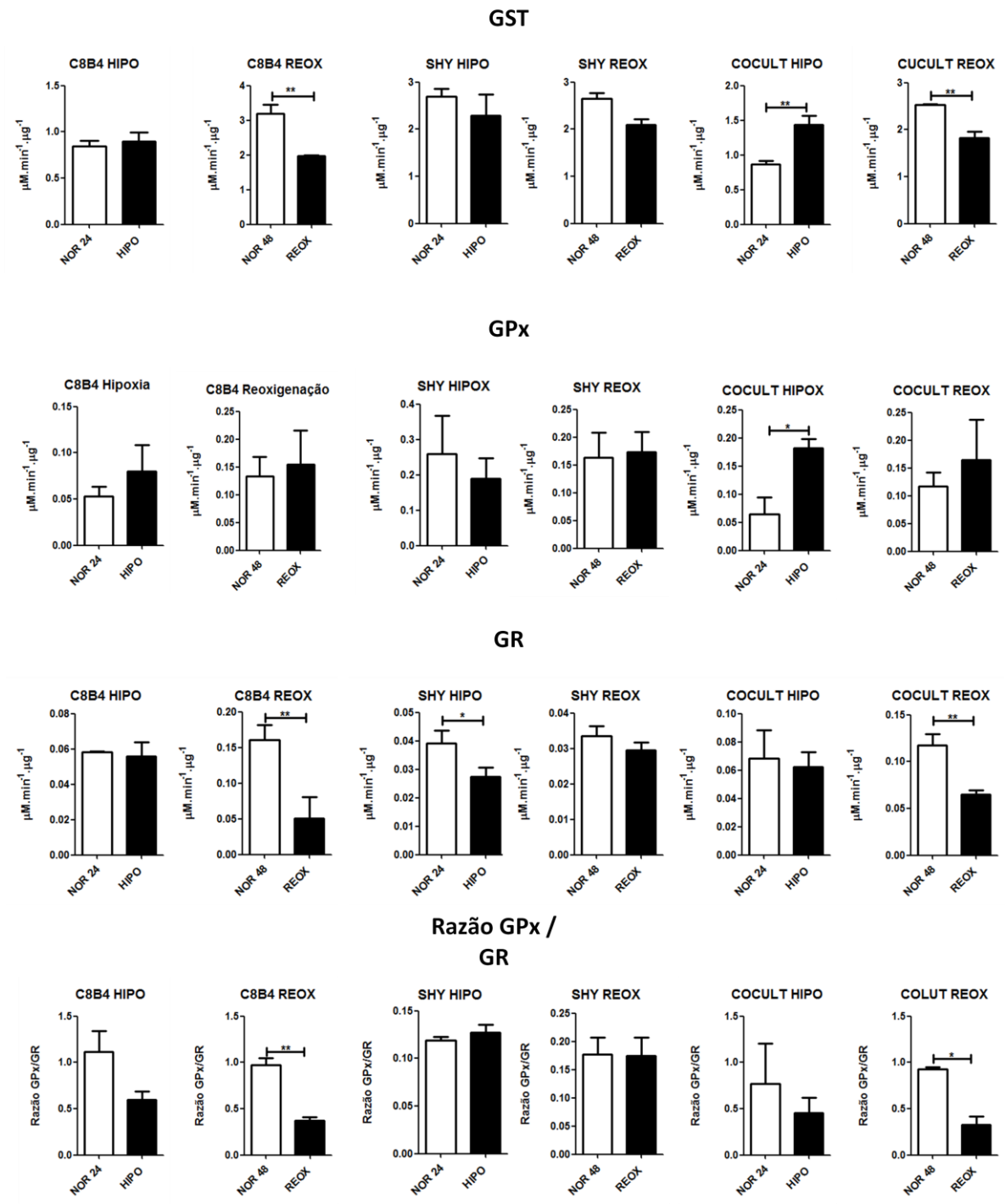


Figura 10 - Avaliação das enzimas antioxidativas em linhagens de micróglia e neurônios. Quantificação da ação das enzimas antioxidantes das linhagens C8B4 , SHY e na Co-cultura após hipóxia. Análise estatística feita por teste t- student. * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001.

A Análise por Real Time PCR demonstrou um ligeiro aumento na expressão de HIF-1α, molécula sinalizadora do estado de hipóxia, durante o período de baixa oxigenação. Junto a esse dado, observamos que no mesmo período as células C8B4 diminuem sua expressão de Ikkα, gene relacionado com a ativação da via do NFκB, e de Glul (Glutamina Sintetase), enzima responsável pela conversão de glutamato (tóxico em excesso) para glutamina (produto não tóxico) (Figura 11). Resultados semelhantes são observados na cultura primária de células da glia (Figura 12).

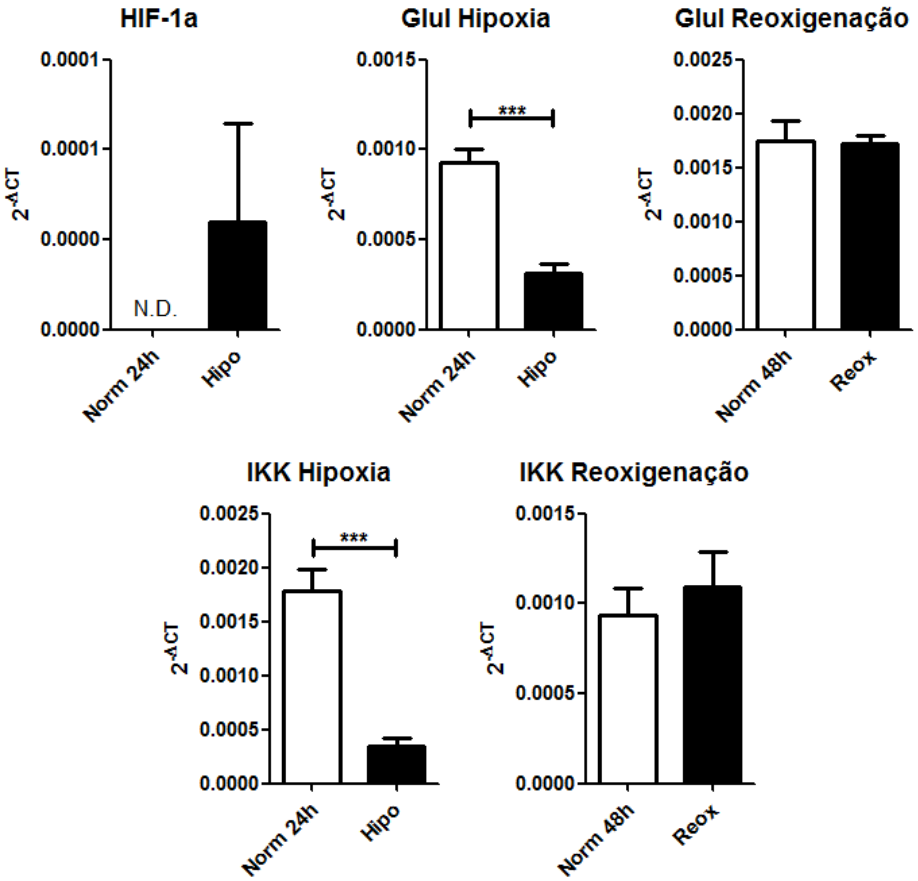


Figura 11 - Avaliação da expressão gênica de células C8B4 após hipóxia. Células C8B4 que passaram ou não pelo protocolo de hipóxia, tiveram seu RNA extraído e analisado através da técnica de RT-PCR para os genes Chuk (IKKα) e Glul (Glutamina Sintetáse). Analise estatística feita por teste t- student. * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001.

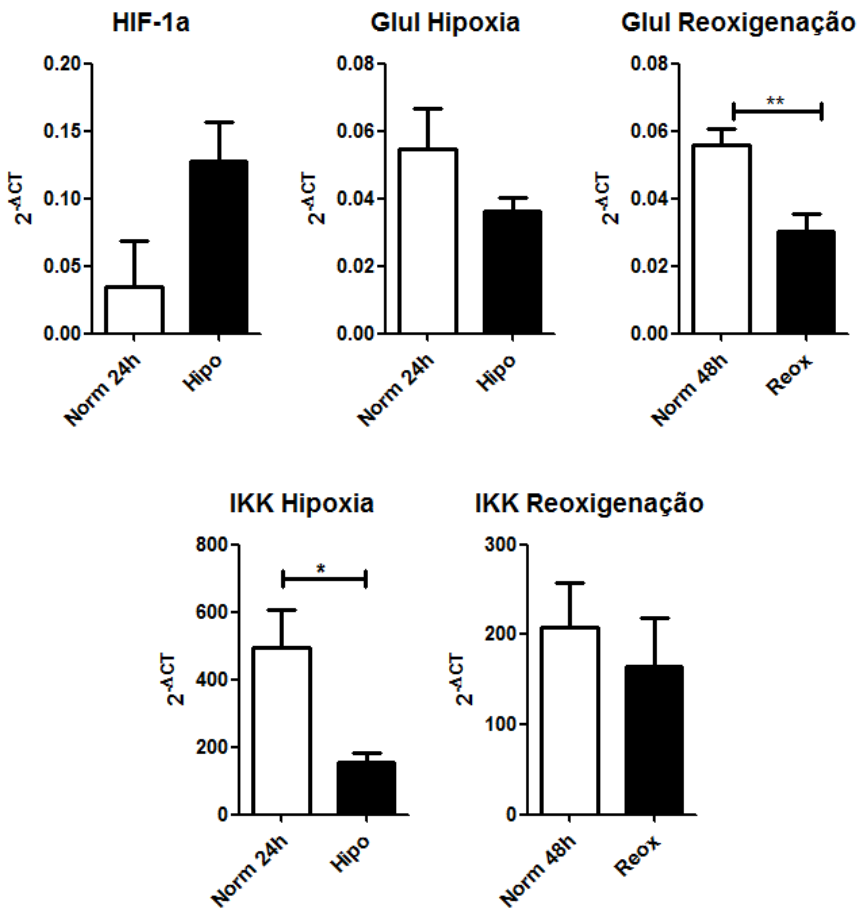


Figura 12 - Avaliação da expressão gênica em cultura mista de células da microglia e astrócitos após hipóxia. Células da glia (astrócitos e microglia) passaram ou não pelo protocolo de hipóxia, tiveram seu RNA extraído e analisado através da técnica de RT-PCR para os genes Chuk (IKKα) e Glul (Glutamina Sintetáse). Analise estatística feita por teste t- student. * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001.

4.1.3 Modulação da resposta das células da microglia pela sinalização do NMDAr

A fim de avaliar a influência do glutamato sobre a resposta das células da microglia, iniciamos nossos experimentos com a modulação da resposta do seu receptor ionotrópico, NMDA. Tal receptor já foi descrito como o principal responsável pelo processo de excitotoxicidade em neurônios, contudo, sua ação nas células da microglia ainda é pouco conhecida. Na figura 13, demonstramos que a linhagem C8B4 expressa não só o NMDAr, como também a vesícula transportadora de glutamato (Vglut), responsável por transportar o glutamato do citoplasma para as vesículas sinápticas. Tal resultado indica que estas células não só respondem ao glutamato, como também são capazes de secretá-lo.

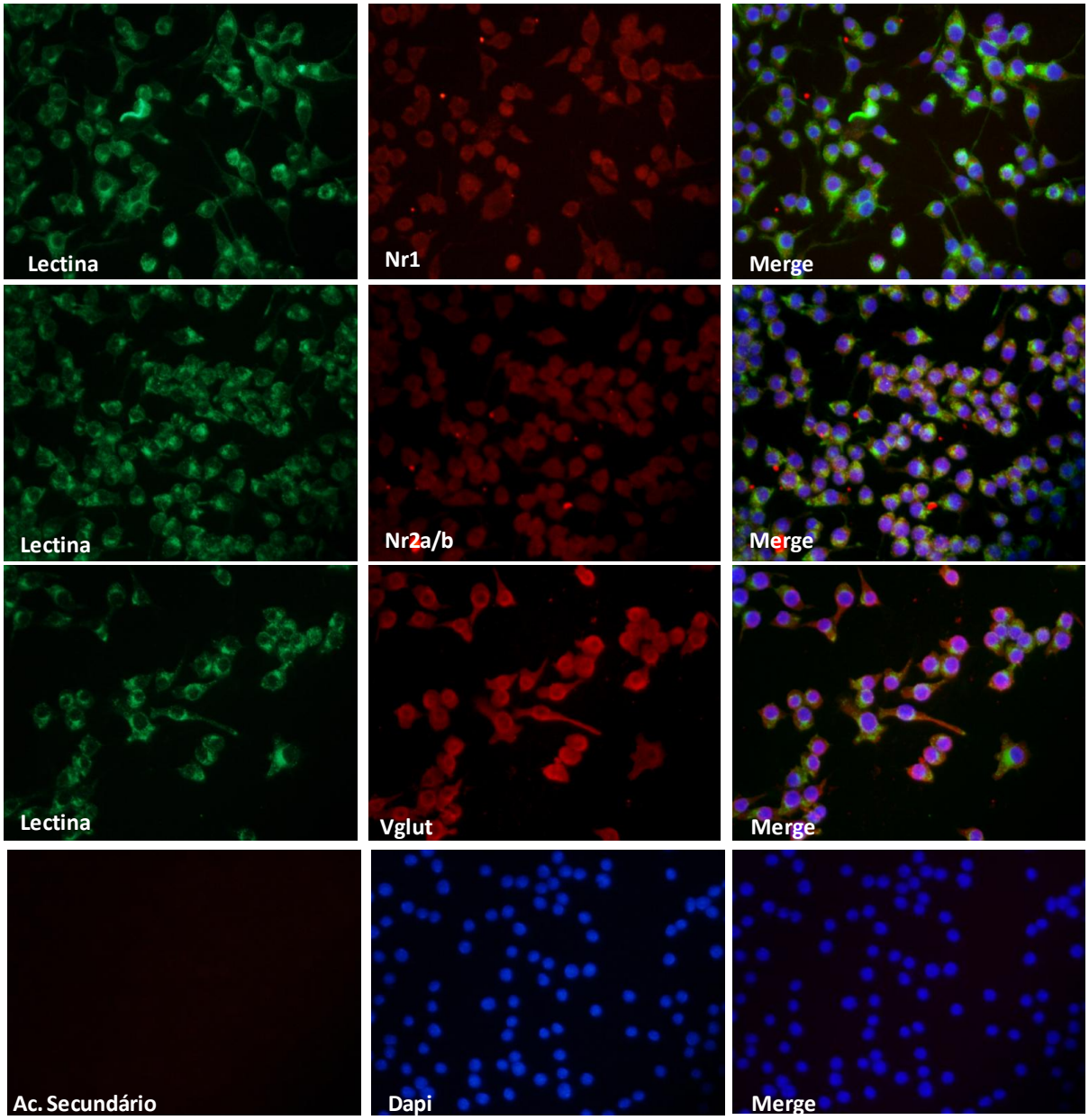


Figura 13 - Expressão das frações Nr1 e Nr2a/b e do transportador vesicular do glutamato (vGlut) nas células C8B4. As células foram cultivadas até o estágio de confluência e então submetidas ao protocolo de Imunofluorescência para as moléculas Nr1, Nr2a/b e vGlut de acordo com materiais e métodos. Imagens tiradas através da objetiva de 20x e controle feito com anticorpo secundário alexa fluor 594.

Ao quantificarmos a concentração de glutamato produzido por diferentes culturas de células da microglia, percebemos que no sobrenadante das linhagens celulares (C8B4 e BV2) há uma quantidade muito maior de glutamato do que a mensurada na cultura primária (Figura 14). Através da técnica de RT-PCR, confirmamos a expressão do NMDAr e suas subunidades tanto na linhagem C8B4 quanto em cultura primária (Figura 15). Contudo,

da mesma maneira que encontramos diferenças na concentração do neurotransmissor entre as culturas, também há diferenças na transcrição desse receptor perante estímulos inflamatórios. Enquanto que o estímulo de LPS em conjunto com IFN-γ induzem maior expressão das subunidades Nr1, Nr2a, Nr2b e Nr2d nas células C8B4, o mesmo estímulo diminui a expressão dessas subunidades na cultura primária (Figura 15). Em parte, estas diferenças podem estar relacionadas com a maior capacidade proliferativa das linhagens celulares e da menor pureza encontrada na cultura primária.

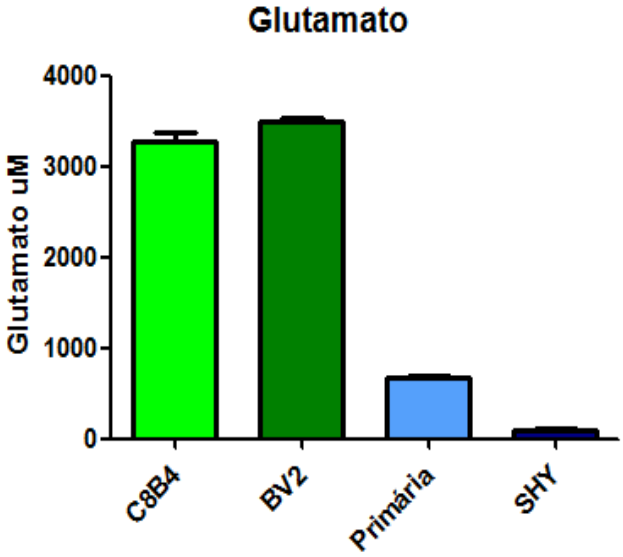


Figura 14 - Produção de glutamato nas células residentes do SNC. As Linhagens C8B4, BV2 e SH-SY-5Y (SHY), bem como a cultura primária de células da microglia de adulto passaram três dias em cultura. Após esse período as células tiveram seus sobrenadantes coletados e o glutamato dosado pelo " *Glutamate Colorimetric Assay Kit*" da BioVision e sua concentração dada em µM.

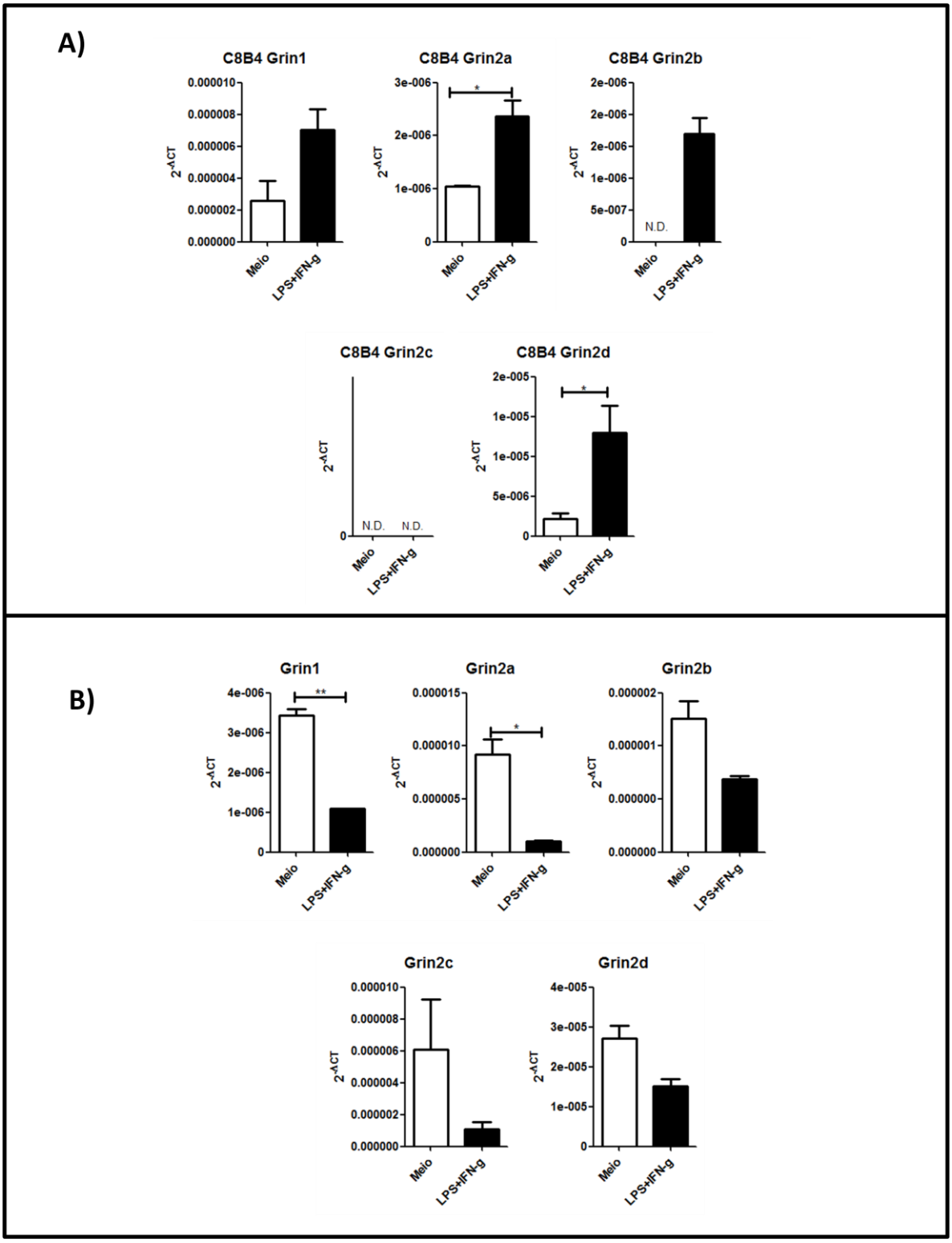
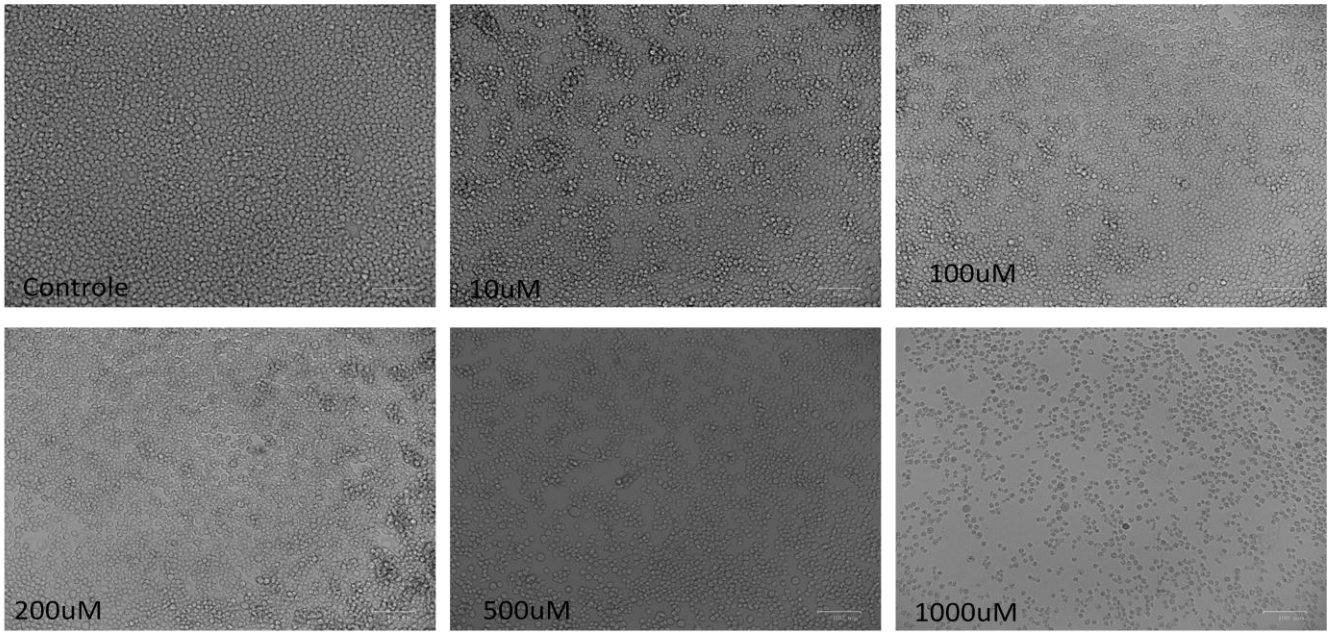


Figura 15 - Avaliação da expressão gênica das subunidades do receptor NMDA nas células da microglia. Células da microglia -C8B4 (A) e de cultura primária de animais adultos (B), foram estimulas com LPS (100ng/m)l e IFN-γ (50ng/ml) por 24 horas. Após esse período, seu RNA foi extraído e analisado através da técnica de RT-PCR para os genes Grin1 (Nr1), Grin2a (Nr2a), Grin2b (Nr2b), Grin2c (Nr2c) e Grin2d (Nr2d). Analise estatística feita por teste t- student. * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001.

Posteriormente à confirmação da expressão do NMDAr, decidimos avaliar quais fenômenos poderiam ser modulados por essa via. Para tanto iniciamos uma curva dose resposta para o seu antagonista não competitivo, conhecido por MK801. Os estímulos foram adicionados em diversas concentrações e sua influência sobre a morte (Figura 17) ou ativação celular (Figura 18) foram avaliadas por citometria de fluxo. Na figura 16, notamos que a partir da concentração de 500µM do MK801 mudanças significativas ocorriam na morfologia e no número das células, indicando aumento na morte das mesmas. Para confirmar essa teoria, foi realizado um ensaio de Anexia x PI, o qual confirmou o aumento da morte celular sob essas condições (Figura 17).

Ao examinar a resposta de apresentação de antígeno dessas células, averiguamos que ocorre a diminuição tanto da expressão quanto do número de células positivas para CD80 a partir da concentração de 100uM de MK801, indicando uma supressão da resposta efetora das células da microglia. Contudo a resposta de CD45 e de MHC-II, marcadores de ativação celular, teve sua expressão aumentada apenas a partir das doses de 500uM, podendo este ser um artefato decorrente da diminuição da viabilidade dessas células (Figuras 18).

Baseado nas respostas de morte e ativação, escolhemos a dose de 100µM de MK801 para dar prosseguimento aos demais experimentos. Com o intuito de avaliar a influência do NMDAr sobre a resposta inflamatória das células C8B4, ativamos as mesmas com LPS a 1 µg/ml. Nossos resultados apontam que a utilização prévia do MK801 vinte minutos antes da ativação por LPS preservava o número de células vivas (Figura 19). Além disso, vemos que o bloqueio do NMDAr diminui a expressão das moléculas, PD-L1 e CD86 durante a ativação (Figura 20).



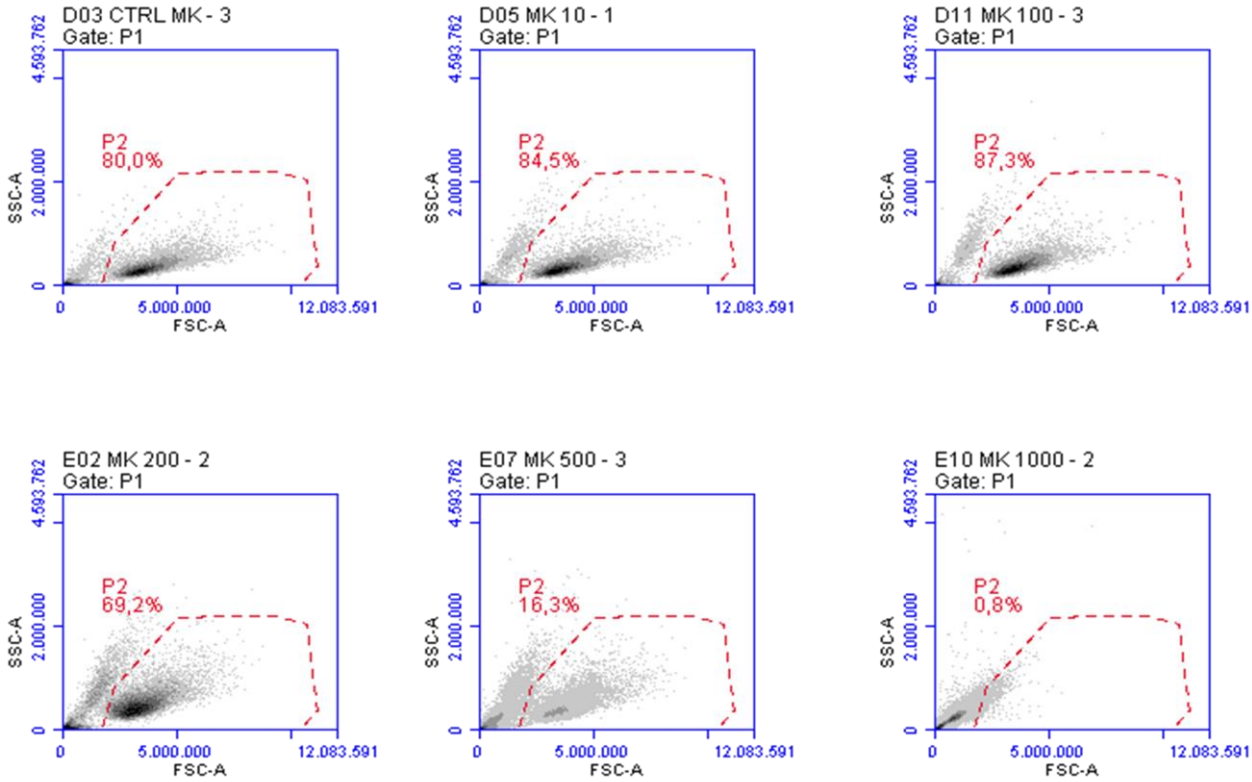


Figura 16 - Representação das mudanças morfológicas das células C8B4, após sua ativação com os estímulos de MK801. Células da linhagem C8B4 foram plaqueadas em placas de 12 poços e estimuladas por diversas concentrações de MK801 (10µM, 100µM, 200µM,500µM,1000µM) por 28 horas. Após esse período, fotos foram retiradas no aumento base do microscópio Zoey e seu tamanho e granulosidade foram avaliados através da técnica de citometria de fluxo pelo aparelho C6 Accuri.

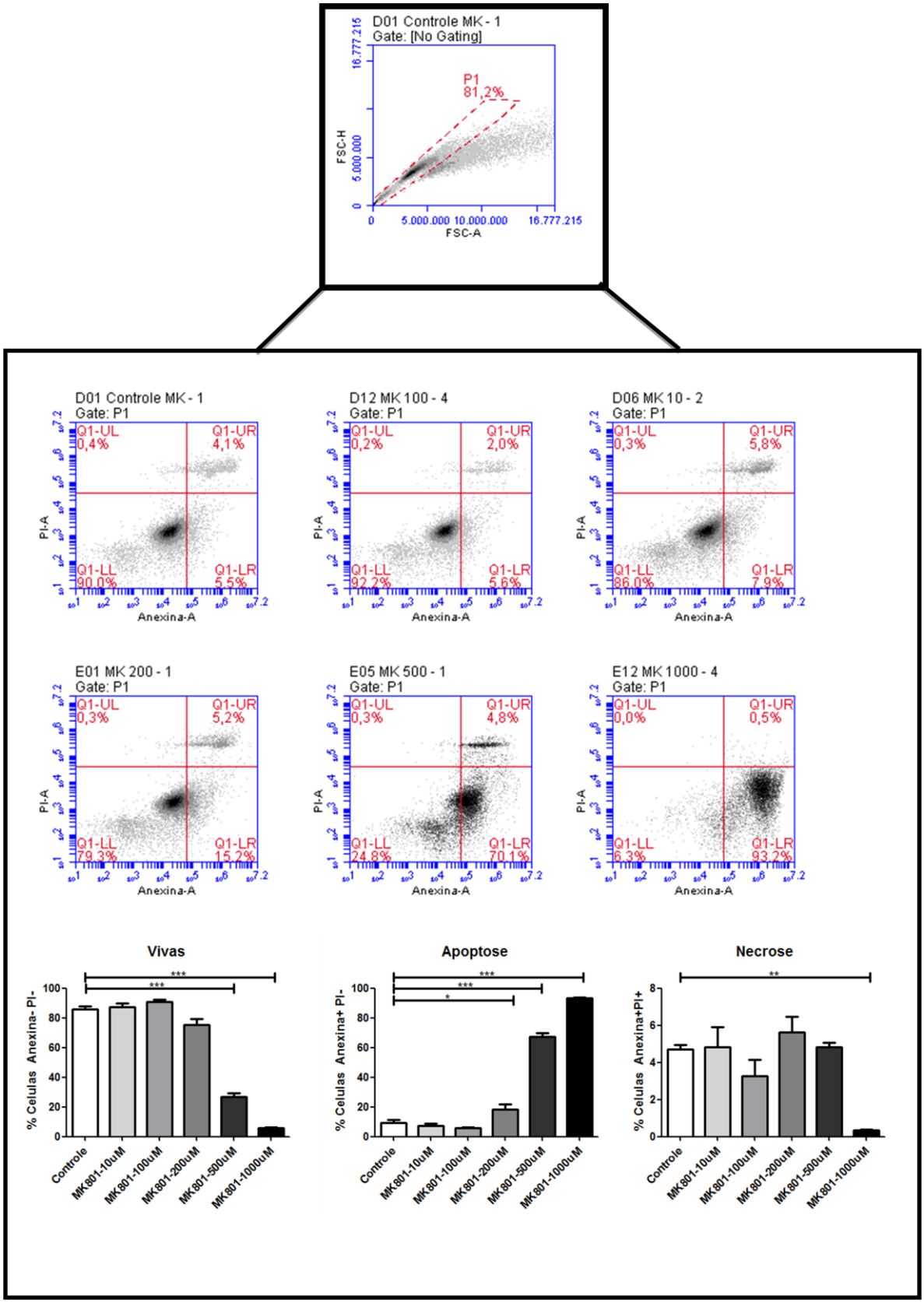


Figura 17 - Avaliação de Anexina x PI em células C8B4 estimuladas com MK801. Células C8B4 foram estimuladas a diferentes concentrações de MK801 (10µM, 100µM, 200µM,500µM,1000µM) por 28 horas, seguidas de marcação para Anexina-V -FITC e PI especificado nos materiais e métodos. Analise estatística feita por One-way Anova e Tukey. * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001.

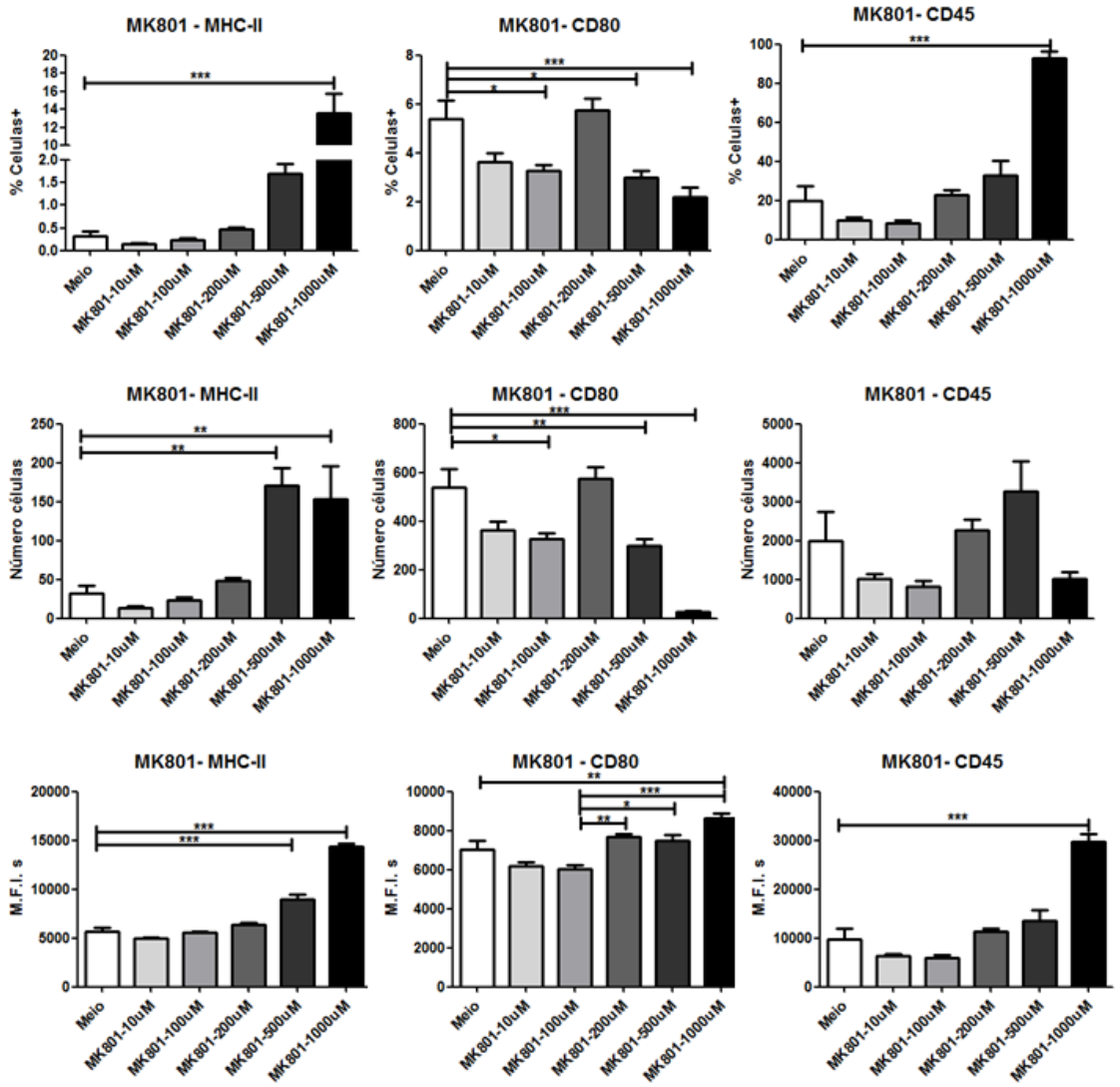


Figura 18 - Análise das moléculas envolvidas na ativação de células C8B4 pós estímulo com MK801. Células C8B4 foram estimuladas a diferentes concentrações de MK801 (10µM, 100µM, 200µM,500µM,1000µM) por 28 horas, seguidas de marcação para Iab-FITC (MHC-II), CD80-PE, CD45-PERCP e lidas no aparelho C6 Accuri . Analise estatística feita por One-way Anova e Tukey. * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001.

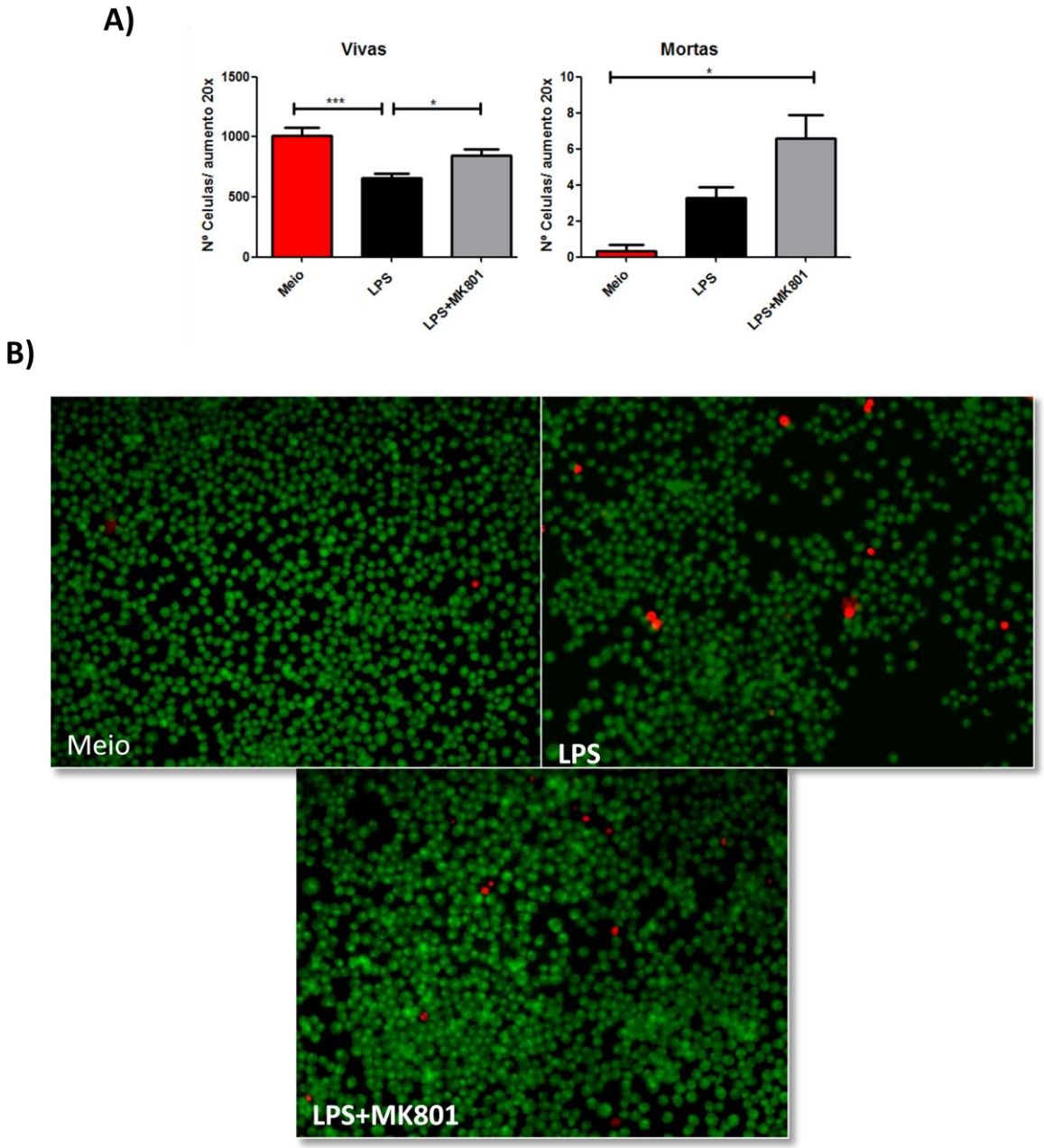


Figura 19 - Ação do NMDAr sobre a viabilidade das células C8B4 perante estímulos inflamatórios. Células C8B4 foram plaqueadas e estimuladas ou não com LPS (1µg/ml) e tratadas vinte minutos antes com MK801 a 100 µM. A) Representação gráfica das imagens tiradas na objetiva de 10x pelo microscópio de imunofluorescência (Nikon®). B) Avaliação de viabilidade celular através da técnica de laranja de acridina e brometo de etídio. One-way Anova e Tukey. * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$.

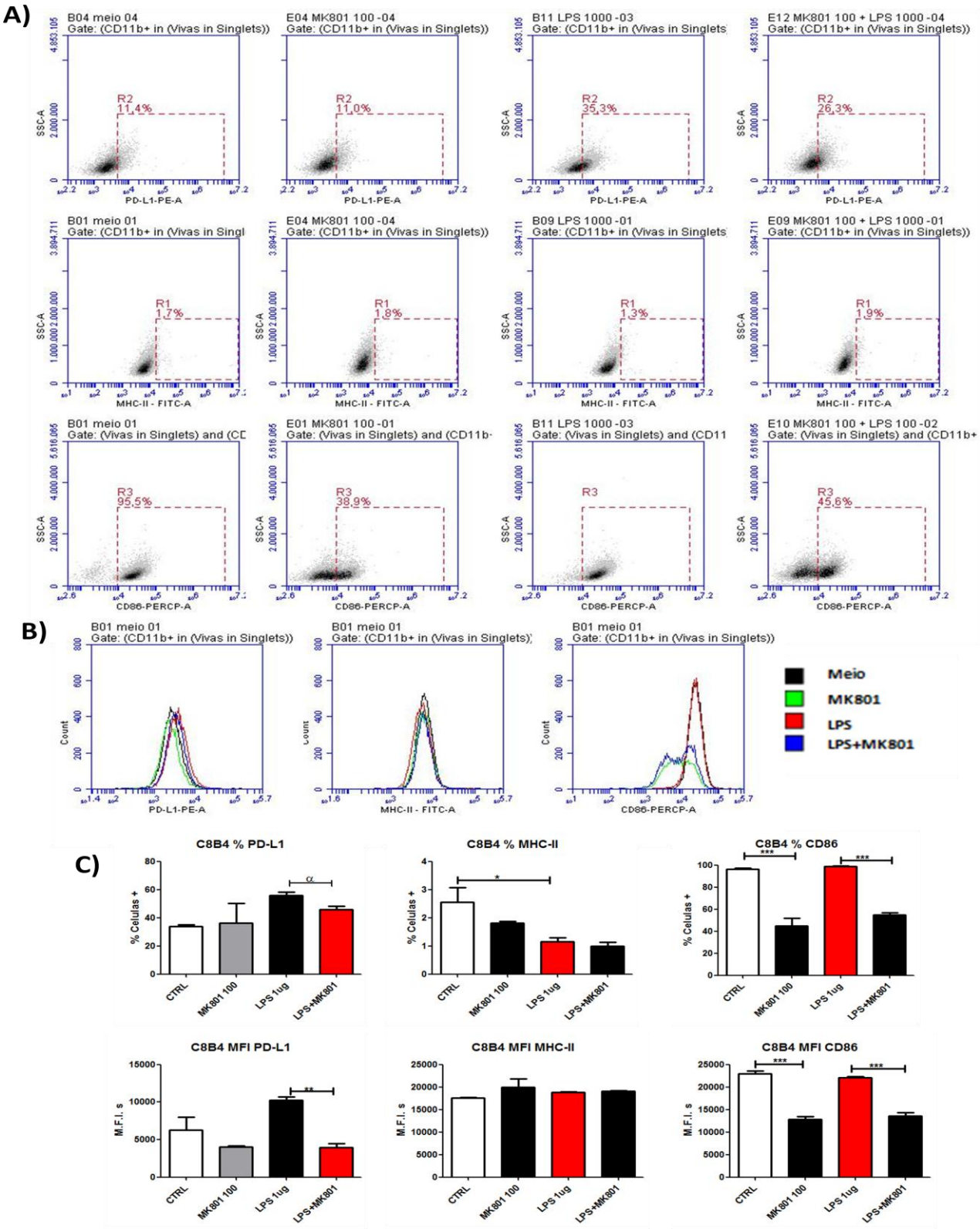


Figura 20 - Atuação do NMDAr sobre a resposta inflamatória das células C8B4. Células C8B4 foram plaqueadas e estimuladas ou não com LPS (1µg/ml) e tratadas vinte minutos antes com MK801 a 100 µM. Após esse período as células foram marcadas através dos anticorpos IaB-FITC (MHC-II), PD-L1-PE (PD-L1) e CD86-PERCP (CD86) e lidos no citometro de fluxo C6 Accuri. A) Dotplots representativos da frequência de células positivas para MHC-II, PD-L1 e CD86. B) Histograma representativo da intensidade de fluorescência das moléculas avaliadas. C) Quantificação da frequência e M.F.I. (média de intensidade de fluorescência) das moléculas avaliadas. Analise estatística feita por One-way Anova e Tukey. * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001.

4.1.4 Atuação do NMDAr sobre a resposta das células microglia no processo de hipóxia e reoxigenação.

Sabendo que o bloqueio na sinalização do NMDAr é capaz de suprimir parte da resposta inflamatória das células da microglia, bem como auxilia na manutenção das células vivas perante estímulos danosos, procuramos observar de que forma esse bloqueio se reflete na resposta à hipóxia. Na figura 21 vemos que o tratamento com o MK801 preserva parte das células vivas no decorrer da reoxigenação. Esse fenômeno parece estar relacionado com retorno da sinalização de IKKa, a qual esta aumentada tanto na C8B4 quanto na cultura mista de células da glia (Figura 22). Contudo a sinalização do NMDAr também se dá necessária para o controle da degradação do glutamato, uma vez que seu bloqueio diminui a expressão da glutamina sintetase no período de normóxia, além de recuperar a expressão da mesma na cultura primaria durante o período de reoxigenação. (Figura 22).

Apesar do tratamento com MK801 manter parte da expressão de IKKα das células C8B4 durante a hipóxia, não houve mudanças nas moléculas envolvidas na apresentação de antígeno durante esse período. Ainda assim o bloqueio do NMDAr durante a normóxia esta associado a diminuição da expressão das moléculas de MHC-II e PD-L1, demonstrando uma dicotomia nessa resposta (Figura 23).

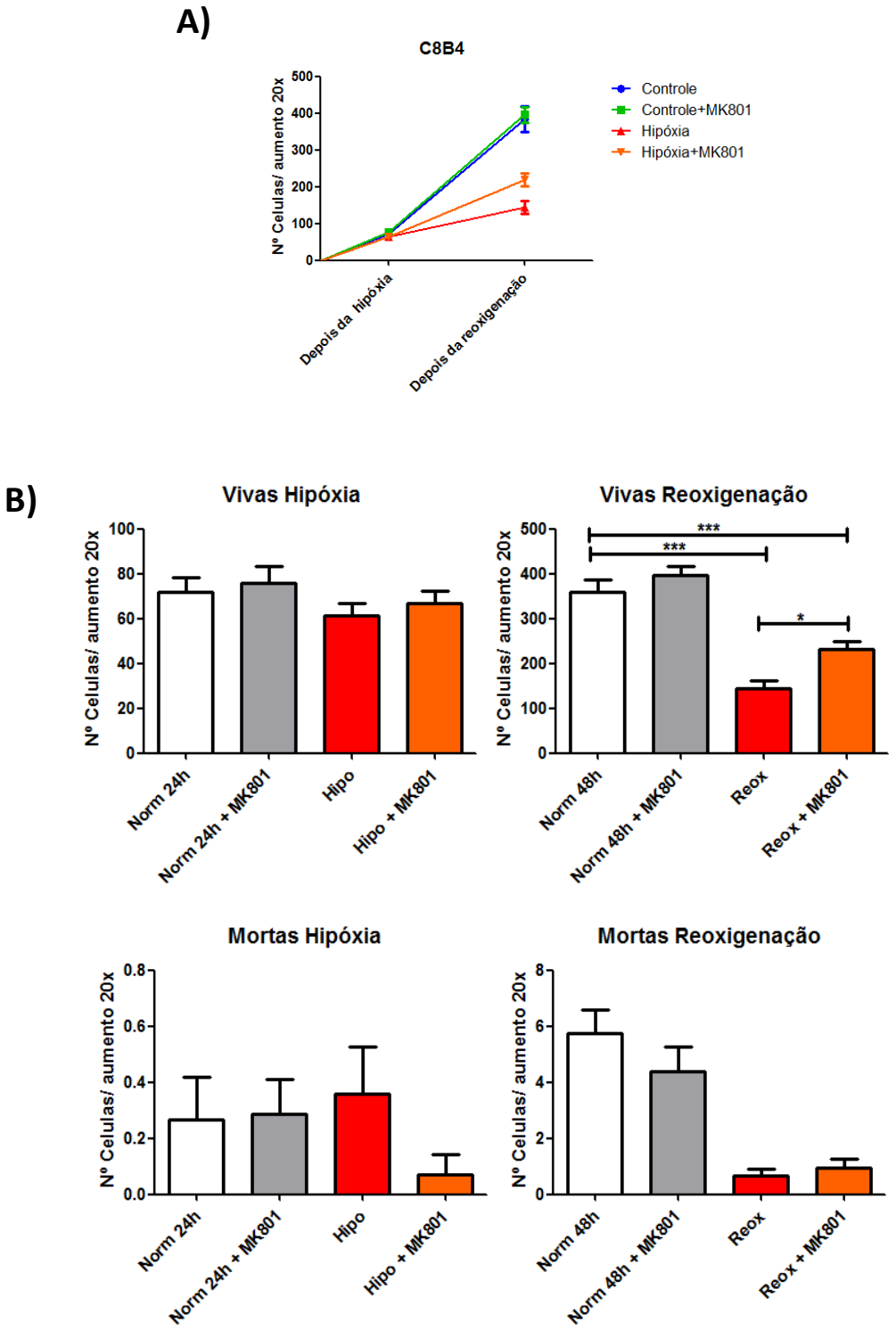


Figura 21 - Quantificação da viabilidade celular na presença ou não de MK801 durante o protocolo de hipóxia. Células C8B4 foram plaqueadas (150.000 celulas/poço) e tratadas ou não com MK801 vinte minutos antes do protocolo de hipóxia. A) curva do número total de células nos períodos pós-hipóxia e pós-reoxigenação. B) Quantificação do número de células vivas e mortas nos diversos grupos. Avaliação feita através de contagem pelo pluging " Cell Counter" do programa *Image J*. Analise estatística feita por One-way Anova e Tukey. * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001.

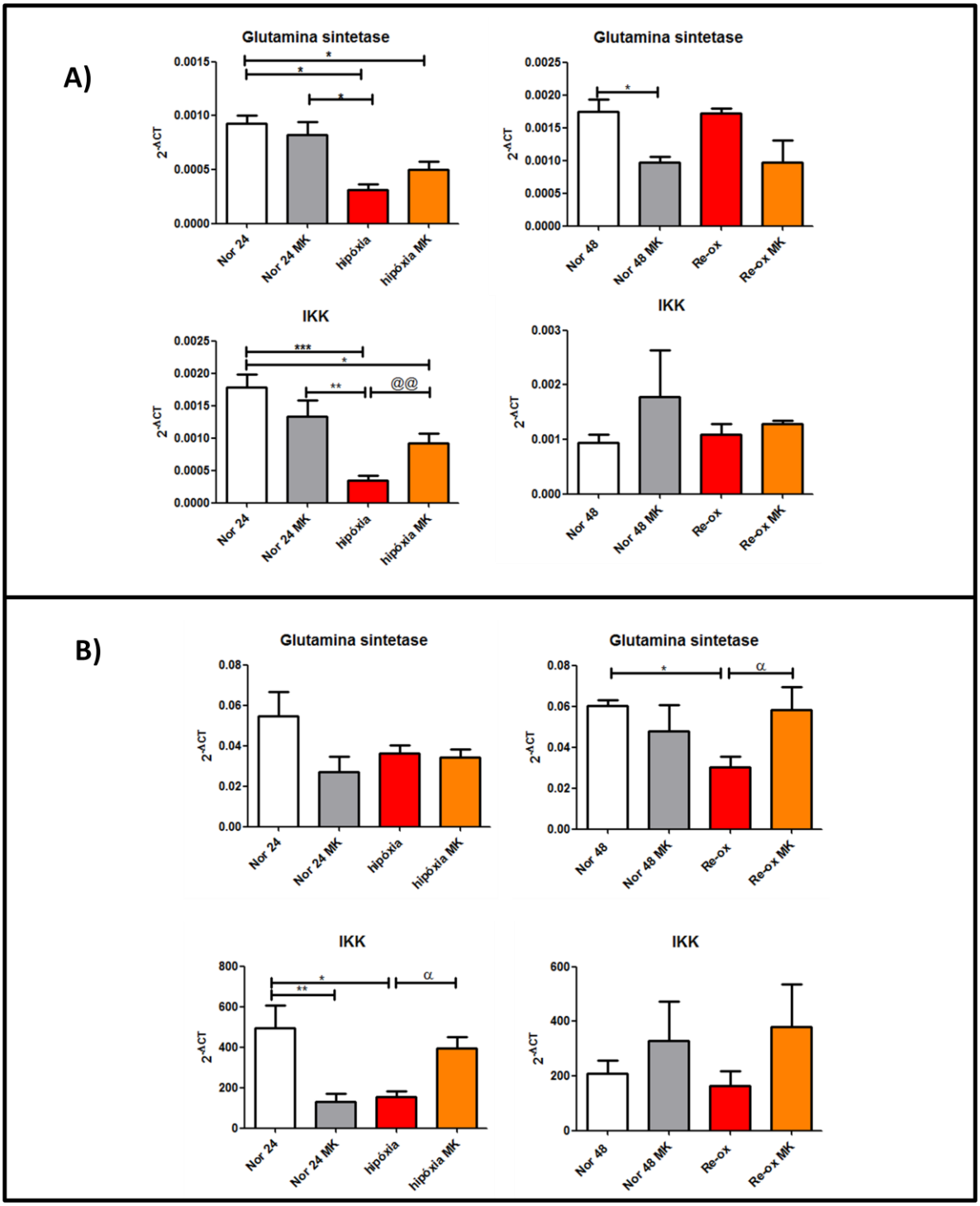


Figura 22 - Avaliação da expressão gênica de células da microglia tratadas ou não com MK801 após hipóxia. Células C8B4 (A) e cultura mista de glia (astrócitos e microglia) (B), passaram pelo protocolo de hipóxia sendo tratadas ou não com MK801 (100µM). Após fim do período de reoxigenação, as mesmas tiveram seus RNAs extraídos e analisados por RT-PCR para os genes Chuk (IKKα) e Glul (Glutamina Sintetase). Os controles sem MK801 representados são os mesmos das figuras 11 e 12. One-way Anova e Tukey. * p<0,05, **p<0,01, *** p<0,001 e T-test @ p<0,05.

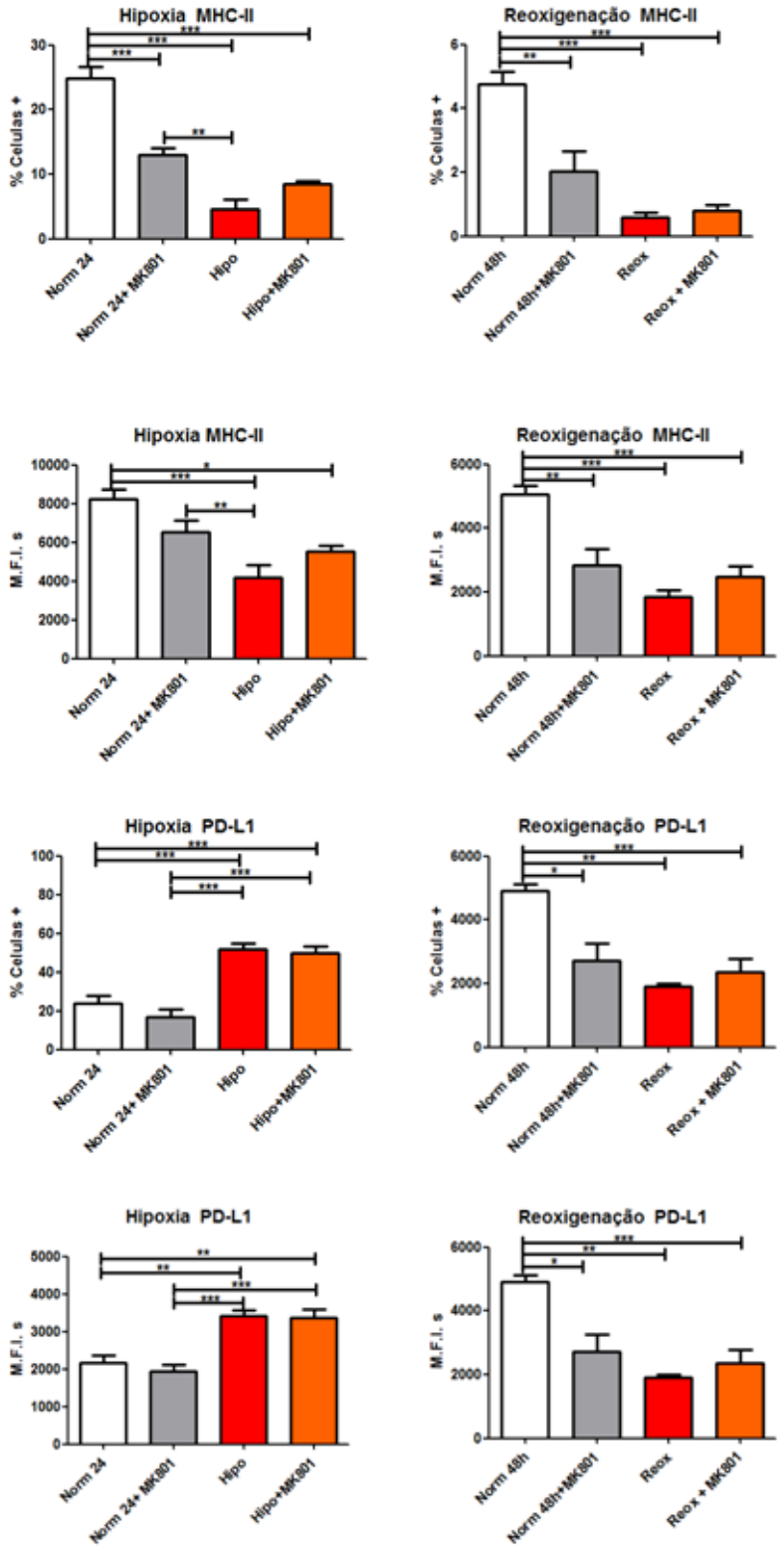


Figura 23 - Análise das moléculas envolvidas na apresentação de antígeno de células C8B4 tratadas ou não com MK801. Células C8B4 foram tratadas ou não com MK801. Após passarem pelo protocolo de hipóxia, as mesmas foram descoladas e marcadas para análise por citometria de fluxo com os anticorpos IaB-FITC (MHC-II) e PD-L1-PE (PD-L1). Os resultados estão representados em frequência de células positivas para tais moléculas e Média de Intensidade de Fluorescência (M.F.I.s). One-way Anova e Tukey. * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001.

4.1.5 NMDAr modula a resposta de macrófagos.

A fim de avaliar se a resposta do glutamato se estende as demais células inatas (monócitos e neutrófilos) que adentram o sistema nervoso durante a fase de reperfusão do AVC, desenvolvemos um novo procedimento de hipóxia *in vitro*. Neste, células C8B4 são colocadas sob a condição de hipóxia por 24 horas, ao fim dessa fase, células CD11b+ isoladas do baço de camundongos C57BL/6 são tratadas ou não com MK801 e adicionadas a este microambiente acompanhando a resposta das células da microglia durante toda a fase de reoxigenação. Para a recuperação e identificação das células adicionadas, marcamos as mesmas com o CellTrace™ CFSE, tornando possível distingui-las das células C8B4 (Figura 24A).

Ao fim do experimento, percebemos que os macrófagos cujos receptores NMDA estavam bloqueados tendem a aumentar sua frequência e número celular, desde que estejam em um ambiente cujas células não sofreram o estresse prévio da hipóxia. Contudo se estas mesmas células são adicionadas à um ambiente cujas células da microglia passaram por uma hipóxia, elas passam a apresentar uma resposta totalmente diferente, diminuindo o sua frequência e número (Figura 24B).

Ao avaliarmos as moléculas envolvida na apresentação de antígenos, vemos que o bloqueio da sinalização do NMDA em macrófagos modulam não só a resposta do próprio macrófago, como também influencia de maneira direta a resposta das células da microglia. Em ambas as populações vemos o efeito do bloqueio da sinalização aumentando a expressão de PD-L1 durante normóxia e a diminuição do mesmo durante os períodos de reoxigenação. Por sua vez a ação sobre a expressão de CD86 está mais relacionado ao período de reoxigenação, apresentando uma resposta mais proeminente nas células C8B4 do que nas células CD11b+ adicionadas a cultura (Figura 25).

Com o intuito de esclarecer parte das mudanças ocorridas no encontro dessas células, avaliamos a expressão de citocinas em cada um dos grupos experimentais através da técnica de CBA (*Cytometric Bead Array*). Notamos que o grupo de macrófagos tratados com MK801 durante o período de normóxia atua aumentando a concentração de IL-10. Além disso, apenas a adição de macrófagos à cultura de C8B4 que passaram por hipóxia já diminui a concentração de IL-1β nas culturas (Figura 26).

Com o intuito de avaliar se as mudanças apresentadas pelos macrófagos eram dependentes de contato celular, estimulamos macrófagos oriundos de medula óssea com o MK801 e adicionamos o sobrenadante de células C8B4 dos grupos normóxia e reoxigenação. Nossos resultados evidenciam que o tratamento com MK801 diminui a expressão das moléculas de PD-L1 e CD86 independente do sobrenadante vir de células que passaram ou não pelo estresse da hipóxia. Além disso percebemos que macrófagos tratados com MK801 tende a apresentar um maior número celular ao ser avaliado por citometria de fluxo (Figura 27).

Após os resultados iniciais, decidimos averiguar como a sinalização do NMDAr modula a polarização dos macrófaos provenientes de medula óssea para os perfis M1 ou M2. Sendo assim após o cultivo da cultura de macrófagos estimulamos os mesmos durante 24 horas com 10ng/ml de LPS + 50 ηg/mL IFN-γ para o fenótipo M1, e 10 ηg/mL de IL-4 e IL-13 para o perfil M2.

A figura 28 demonstra que a utilização de MK801 durante a polarização de macrófagos promoveu uma diminuição do perfil M1, evidenciado pela diminuição da frequência de macrófagos F4/80^{+} e do MFI de CD86, bem como da diminuição da concentração de óxido nítrico.

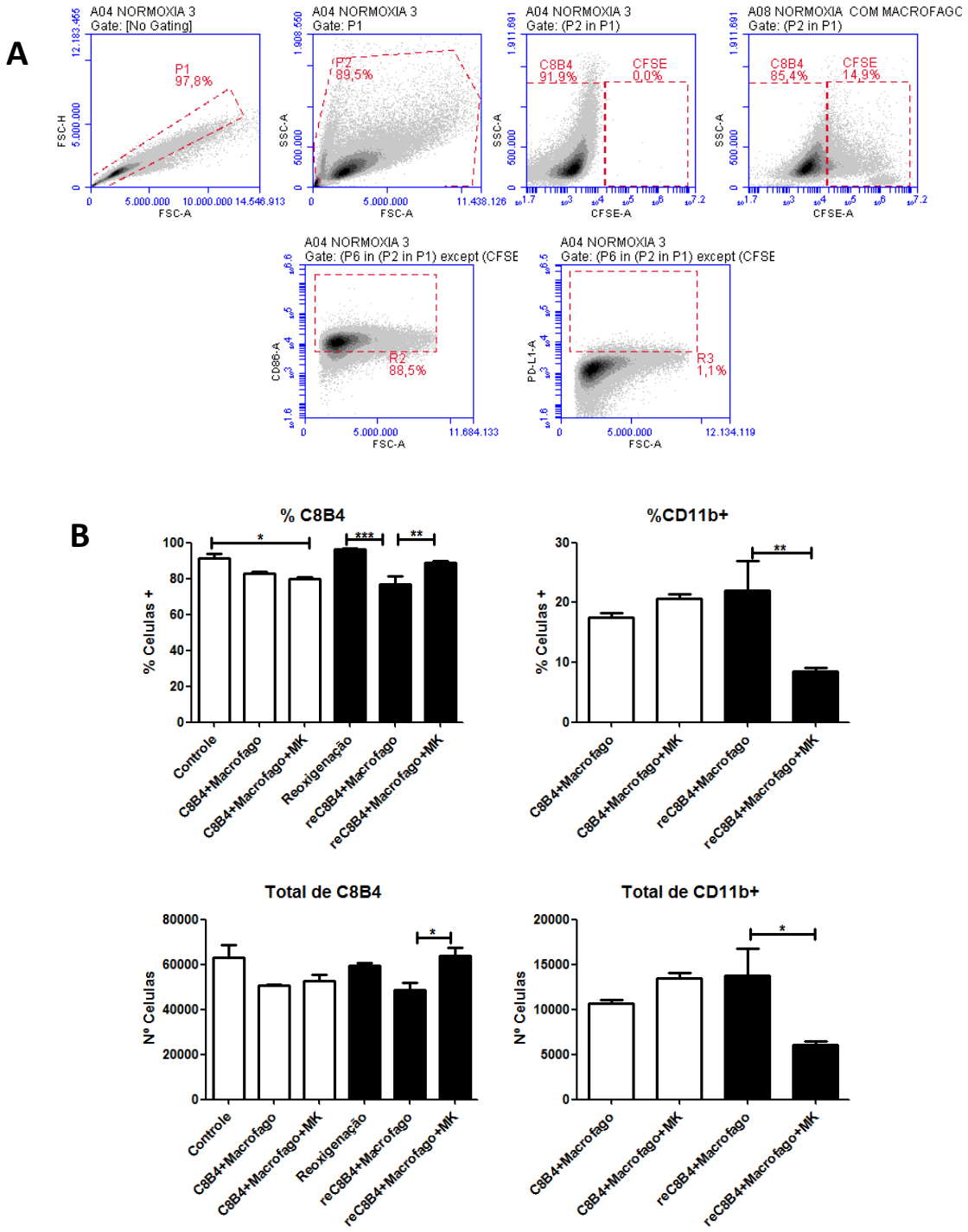


Figura 24 - Sinalização pelo NMDAr modula resposta de células CD11b+ que entram em contato com células da microglia. Células C8B4 que passaram ou não pelo processo de hipóxia por 24h foram adicionadas de macrófagos CD11b+ isolados do baço de camundongos C57Bl/6 marcadas com CFSE e tratadas ou não com MK801(20 minutos). A) Esquema da estratégia de *gates* utilizadas no experimento para avaliação de número, frequência e expressão de moléculas envolvidas na apresentação de antígenos. B) Frequência e número das células C8B4 e CD11b+ (CFSE +) após os diversos estímulos. One-way Anova e Tukey. * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001.

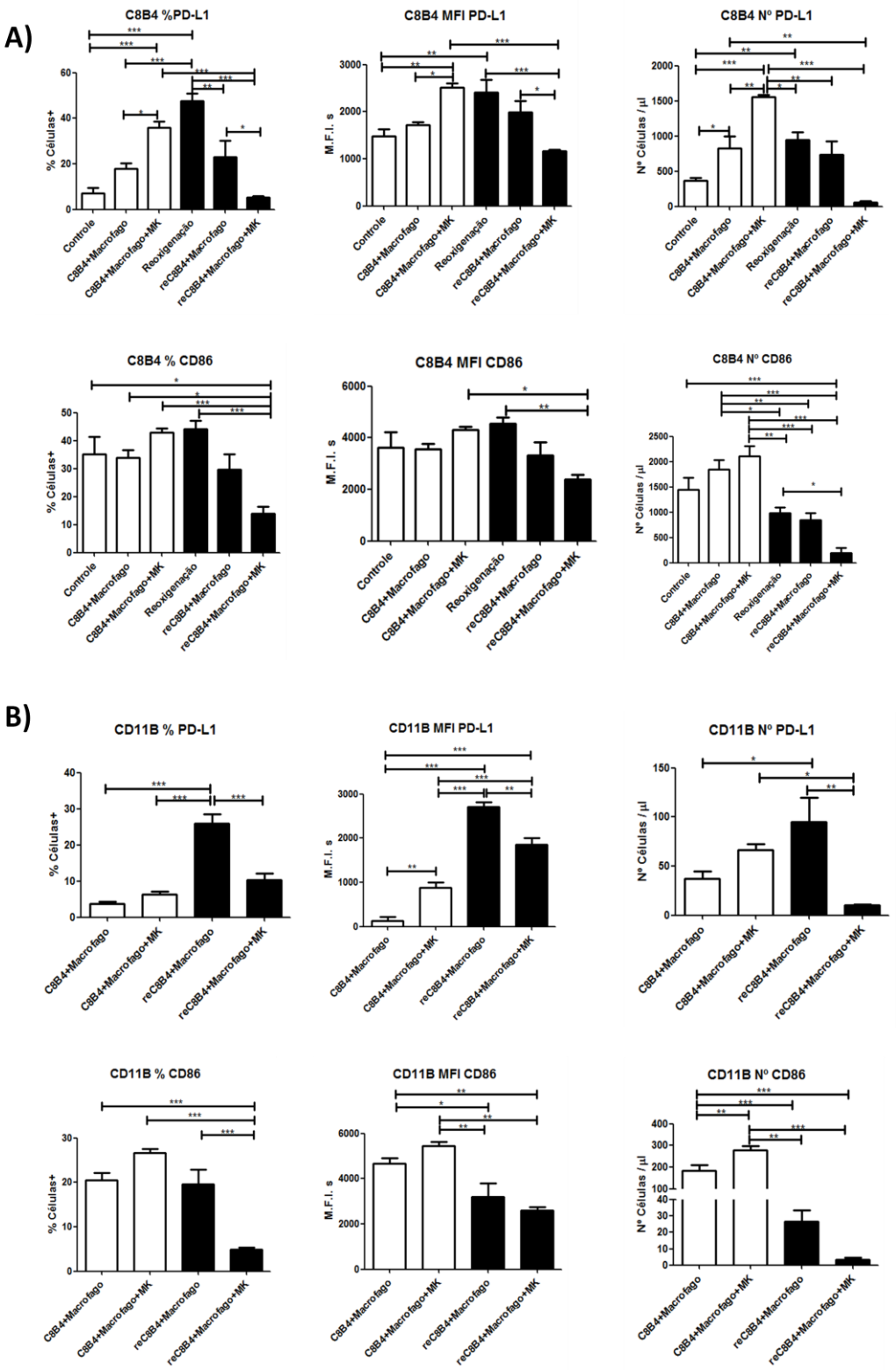


Figura 25 - Modulação das moléculas envolvidas na apresentação de antígeno em células C8B4 e macrófagos, tratados ou não com MK801 durante o período de reoxigenação. Células C8B4 que passaram pela hipóxia por 24h tiveram a adição de células CD11b+ (isoladas do baço de camundongos C57BL6) marcadas com CFSE, tratadas ou não com MK801(20 minutos), e adicionadas à cultura de células da microglia. Posteriormente, as mesmas foram descoladas e marcadas para Citometria de fluxo com os anticorpos CD86-PERCP (CD86) e PD-L1-PE (PD-L1). Os resultados estão representados em frequência de células positivas para tais moléculas e Média de Intensidade de Fluorescência (M.F.I.s). Sendo A) resposta das células C8B4 e B) resposta das células CD11b+. Analise estatística feita por One-way Anova e Tukey. * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001

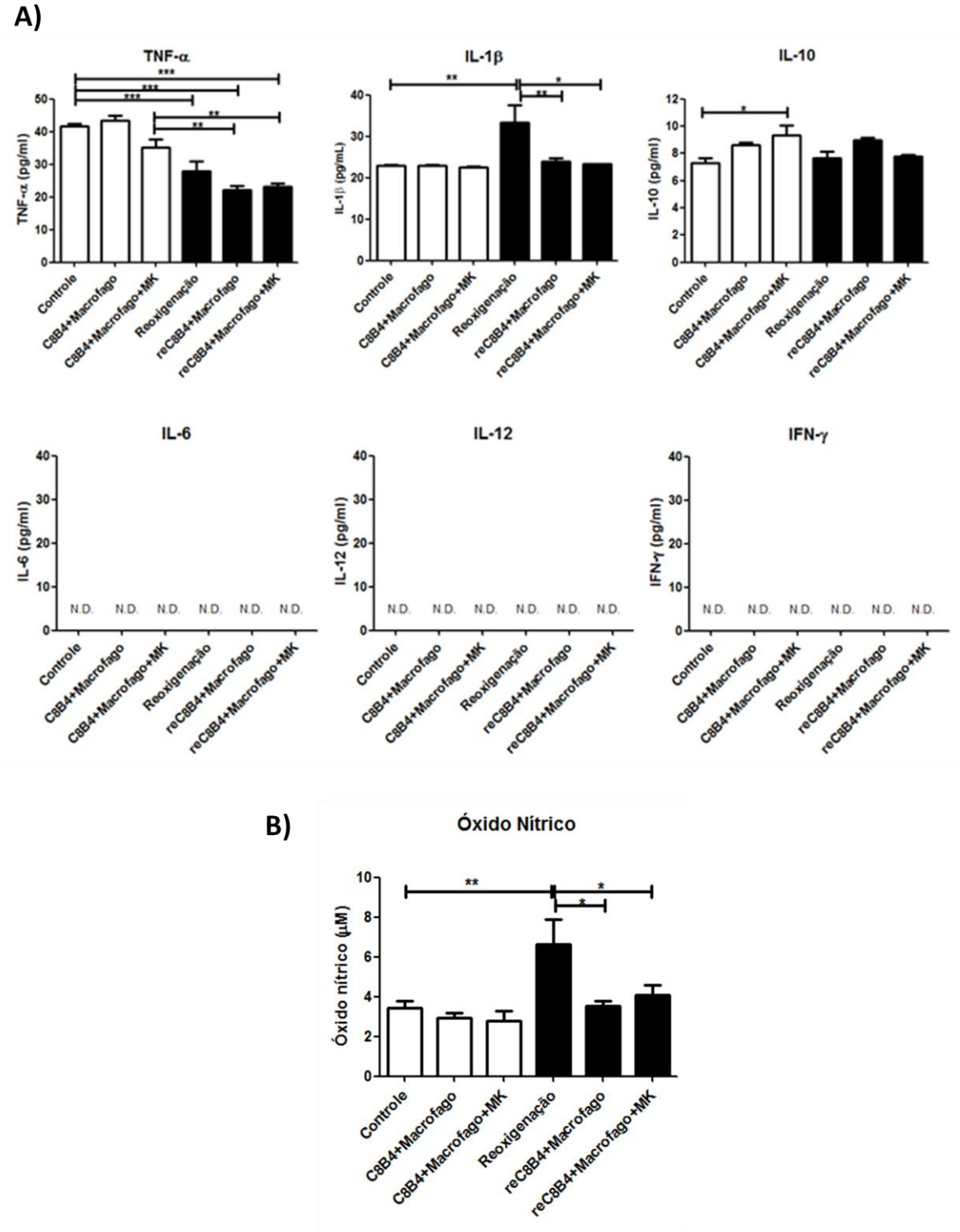


Figura 26 - Avaliação das citocinas produzidas por células C8B4 e macrófagos tratados ou não com MK801 durante o período de reoxigenação. Células C8B4 que passaram ou não pelo processo de hipóxia por 24h foram adicionadas de macrófagos CD11b+ isolados do baço de camundongos C57BL6 e marcados com CFSE e tratados ou não com MK801(100uM) por 20 minutos. Os sobrenadantes foram coletados e as citocinas analisadas por CBA kit flex (A) e o óxido nítrico por teste de Griess (B). Valores representados em pg/ml, N.D. (citocina não detectada). One-way Anova e Tukey. * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001.

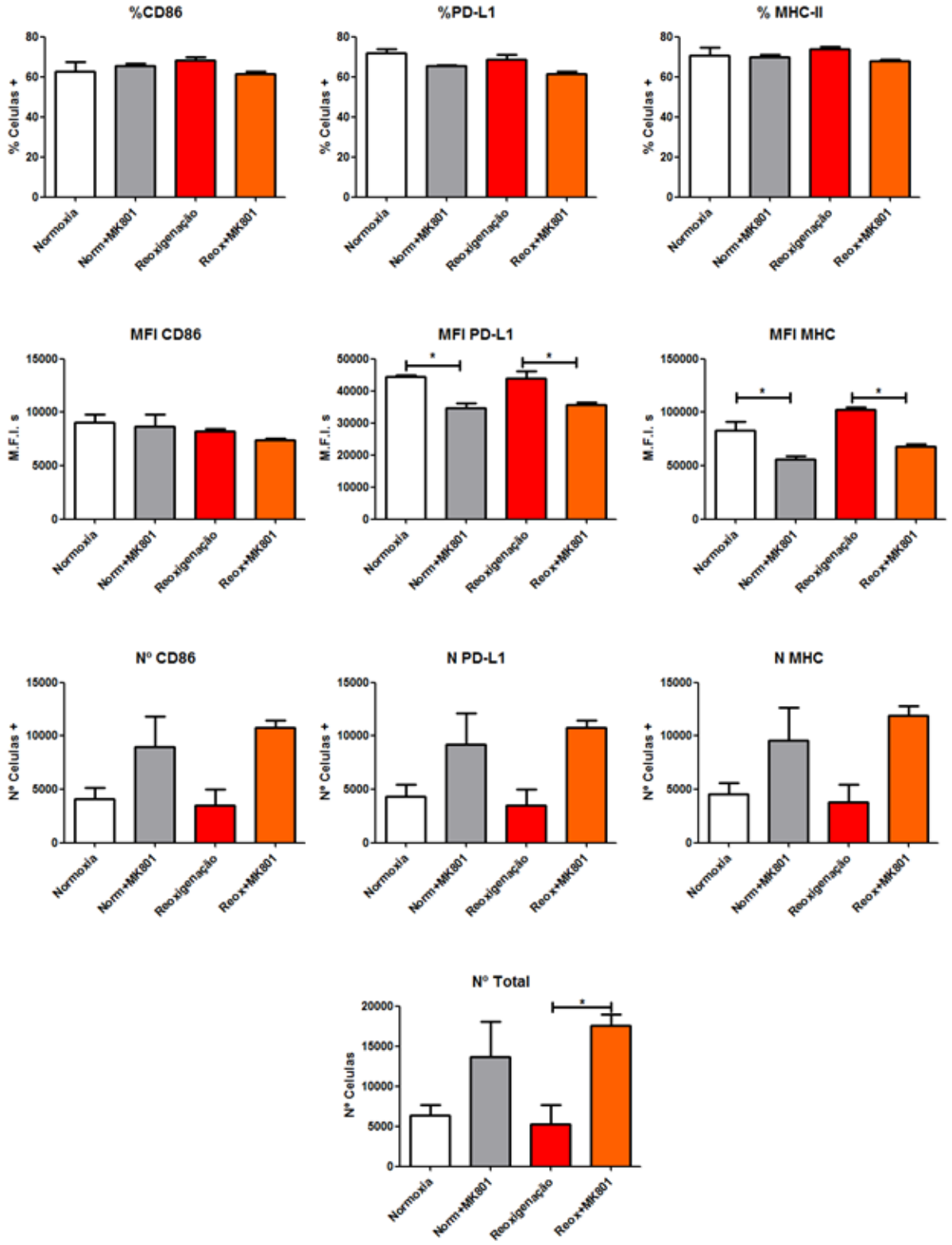


Figura 27 - Tratamento com MK801 modula moléculas envolvidas na apresentação de antígeno de macrófagos de medula óssea. Macrófagos derivados de medula óssea foram tratados ou não com MK801 e estimulados com sobrenadante de células C8B4 que passaram pelo período de normóxia ou reoxigenação. Os resultados estão representados em número, frequência de células positivas para tais moléculas e Média de Intensidade de Fluorescência (M.F.I.s). Analise estatística feita por One-way Anova e Tukey. * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001.

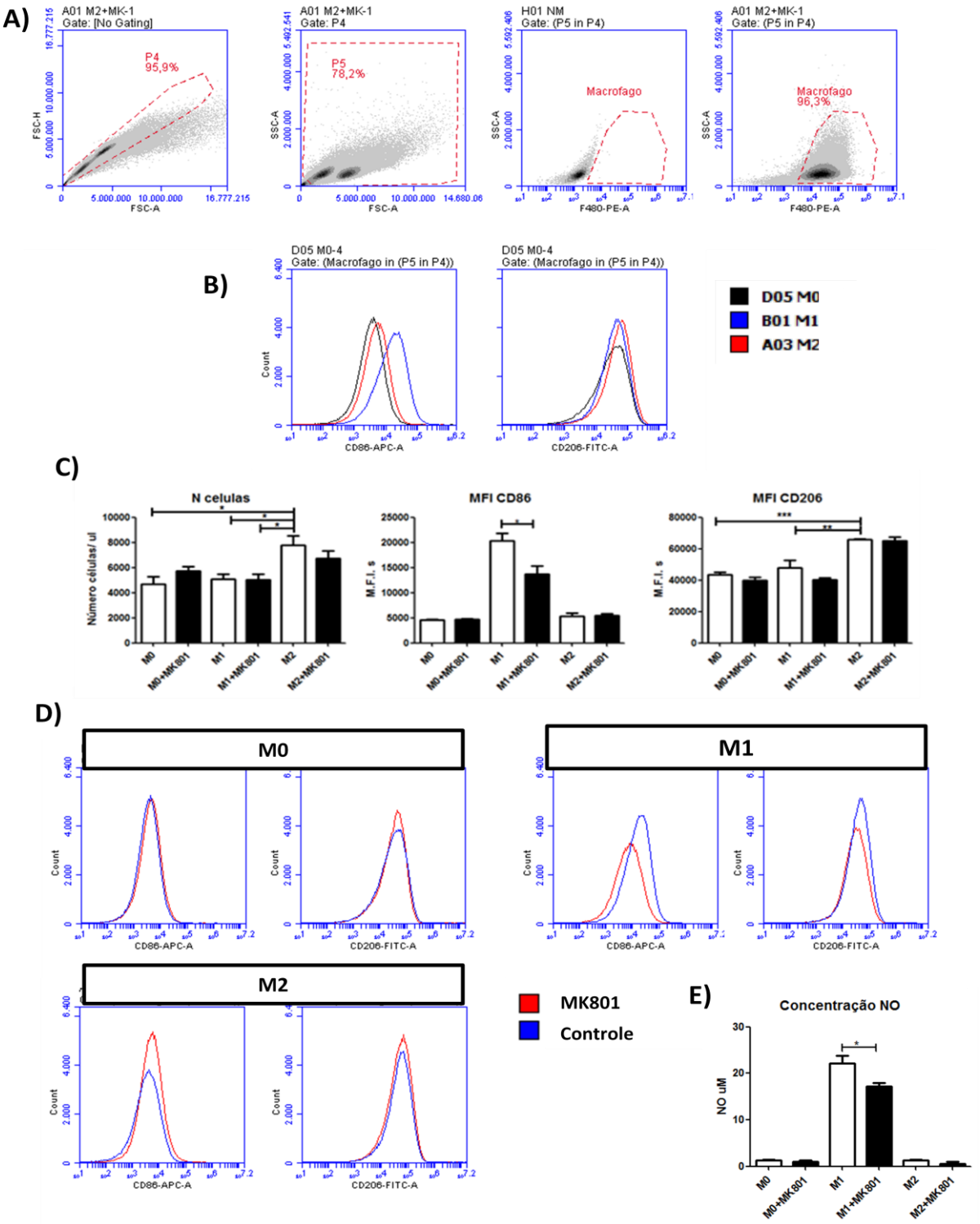


Figura 28 - Tratamento com MK801 modula a polarização de macrófagos provenientes da medula óssea. Macrófagos derivados de medula óssea foram tratados ou não com MK801 durante os estímulos para diferenciação dos mesmos para os perfis M1 e M2 e avaliados por citometria de fluxo. O grupo M1 recebeu 10ng/ml de LPS mais 50 ŋg/mL IFN-γ por 24 horas. O grupo M2 foi tratado com 10 ŋg/mL de IL-4 e IL-13 por 24 horas e o grupo M0 fora cultivado apenas com meio. Os resultados estão representados em frequência de células positivas para tais moléculas e Média de Intensidade de Fluorescência (M.F.I.s). A) Representação da estratégia de gate. B) Histogramas representativos da diferença da intensidade de fluorescência para as moléculas CD206 e CD86 entre os três grupos. C) Quantificação da frequência, número e intensidade de fluorescência. D) Histogramas representativos da diferença da intensidade de fluorescência dentro de cada grupo. E) Concentração de óxido nítrico obtido no sobrenadante das culturas celulares dosado pelo teste de Gris. Analise estatística feita por One-way Anova e Tukey. * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001.

4.1.6 Glutamato é produzido por células imunes

Os resultados com macrófagos indicam que a resposta ao glutamato não se limita ao SNC. Contudo, para que esta sinalização seja funcional é necessário a presença desse neurotransmissor no microambiente em que estas células se encontram. Assim, verificamos se culturas de células imunes seriam capazes de produzir e secretar o glutamato. Na figura 29 constatamos que as células imunes provenientes do baço, timo e medula óssea são capazes de secretar esse neurotransmissor, sendo a cultura de células do baço a que possui maior concentração. Por sua vez, as culturas de timócitos e macrófagos demonstraram uma produção menor, mas semelhante a cultura primária de células da microglia (Figura 14).

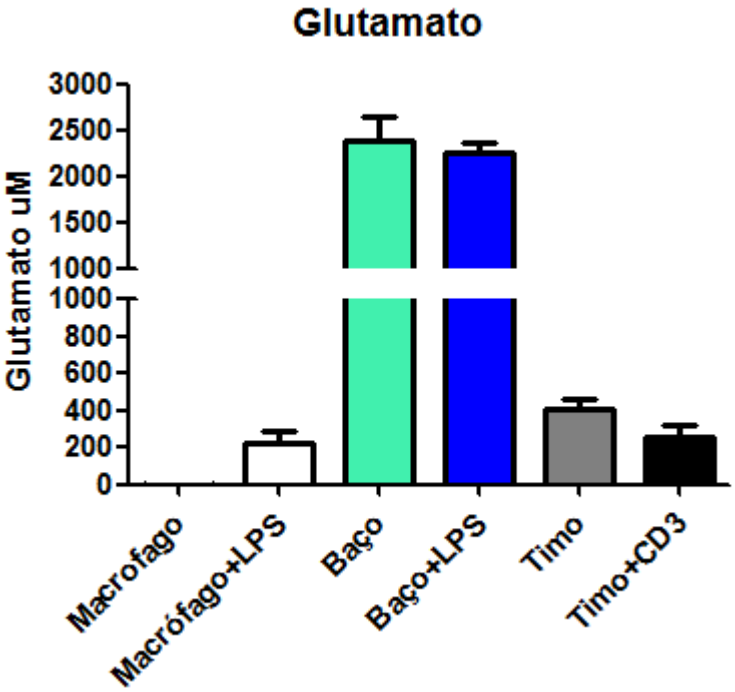


Figura 29 - Concentração de por células imunes periféricas. Culturas de macrófagos derivados de medula óssea, esplenócitos totais e células tímicas cultivadas por três dias, foram estimuladas ou não com LPS 100ŋg/ml ou anti-CD3 1µg/ml por 24 horas. Após esse período as células tiveram seus sobrenadantes coletados e o glutamato dosados pelo " *Glutamate Colorimetric Assay Kit*" da BioVision e sua concentração dada em µM.

4.1.7 NMDAr modula a resposta de neutrófilos.

Ao compreendermos que o glutamato é expresso nos diversos âmbitos do organismo, procuramos avaliar quais alterações este promoveria sobre os neutrófilos. Ao tratamos uma cultura de neutrófilos com MK801, tais células passam a diminuir não só o número de células produtoras de NO mas também a expressão dessa molécula em cada célula (Figura 30). Tal fenômeno sugere que a sinalização pelo receptor de NMDA tem uma ação direta na resposta efetora dessas células.

Por fim, decidimos avaliar se as diferenças apresentadas no modelo in vitro pelo bloqueio da sinalização do NMDAr, alterariam a resposta de uma isquemia in vivo, no modelo de obstrução da artéria cerebral média (MCAO).

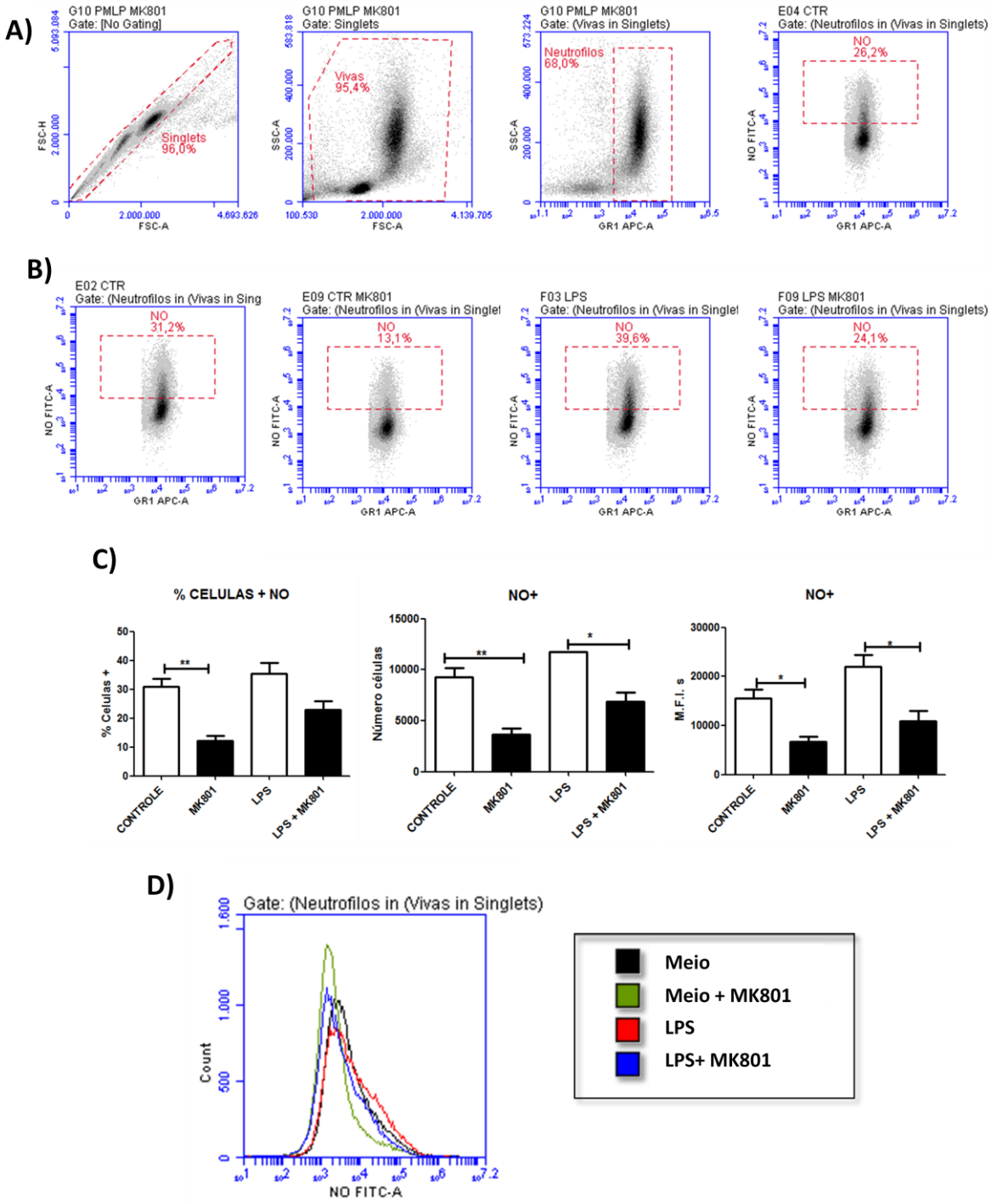


Figura 30 - Tratamento com MK801 diminui a síntese de NO em neutrófilos. Neutrófilos derivados de medula óssea foram tratados ou não por 20 minutos com MK801 (100µM) seguido de estimulação por LPS 1µg/ml pelo período de 3 horas. Posteriormente as células foram tratadas com o protocolo de DAF-FM para visualização do óxido nítrico (NO) e com o anticorpo GR1-PE para reconhecimento da população de neutrófilos. A) Representação da estratégia de gate utilizada. B)) Dotplots representativos da frequência de células positivas para NO. C) Quantificação da frequência, número e intensidade de fluorescência. D) Histograma representativo da diferença das intensidades de fluorescências para NO entre os diferentes grupos. Análise por citometria de fluxo. Analise estatística feita por One-way Anova e Tukey. * p<0,05, ** p<0,01, ***p<0,001

4.2 Resultados In vivo:

4.2.1 Obstrução da artéria cerebral média - MCAO

Dentre os modelos utilizados pela literatura, o MCAO (*Middle cerebral artery occlusion*) é um dos que possui maior similaridade à doença humana, por apresentar um curto período de hipóxia (entre 30 minutos à 1 hora) seguida de reperfusão. O desenvolvimento dessa técnica consiste na introdução de um filamento cirúrgico de medida específica pela artéria carótida interna ao encontro da artéria cerebral média (MCA). Quando este filamento se encontra na região da MCA, o mesmo bloqueia o fluxo sanguíneo, por ter sua espessura semelhante a da artéria em questão.

Nossos resultados, demonstram que o tratamento prévio com MK801 (1 Hora antes da obstrução) diminui a lesão gerada pelo processo de isquemia e reperfusão (Figura 31A). Além disso, não encontramos mudanças na frequência dos leucócitos na circulação desses animais (Figura 31B). Ainda assim, através de técnica de RT-PCR, percebemos que a MCAO promove aumento na expressão dos receptores de NMDA, sendo a subunidade NR1 mais expressa nos animais tratados com MK801, do que nos controles. Além disso vemos o aumento da expressão de HIF-1α (do inglês: *Hypoxia-inducible factor 1-alpha*) no lado isquemiado dos camundongos controle. Contudo essa diferença deixa de ser significativa nos animais cujo NMDAr estava bloqueado, e isso devido ao aumento da expressão dessa molécula no lado ipsilateral desses animais (Figura 31C).

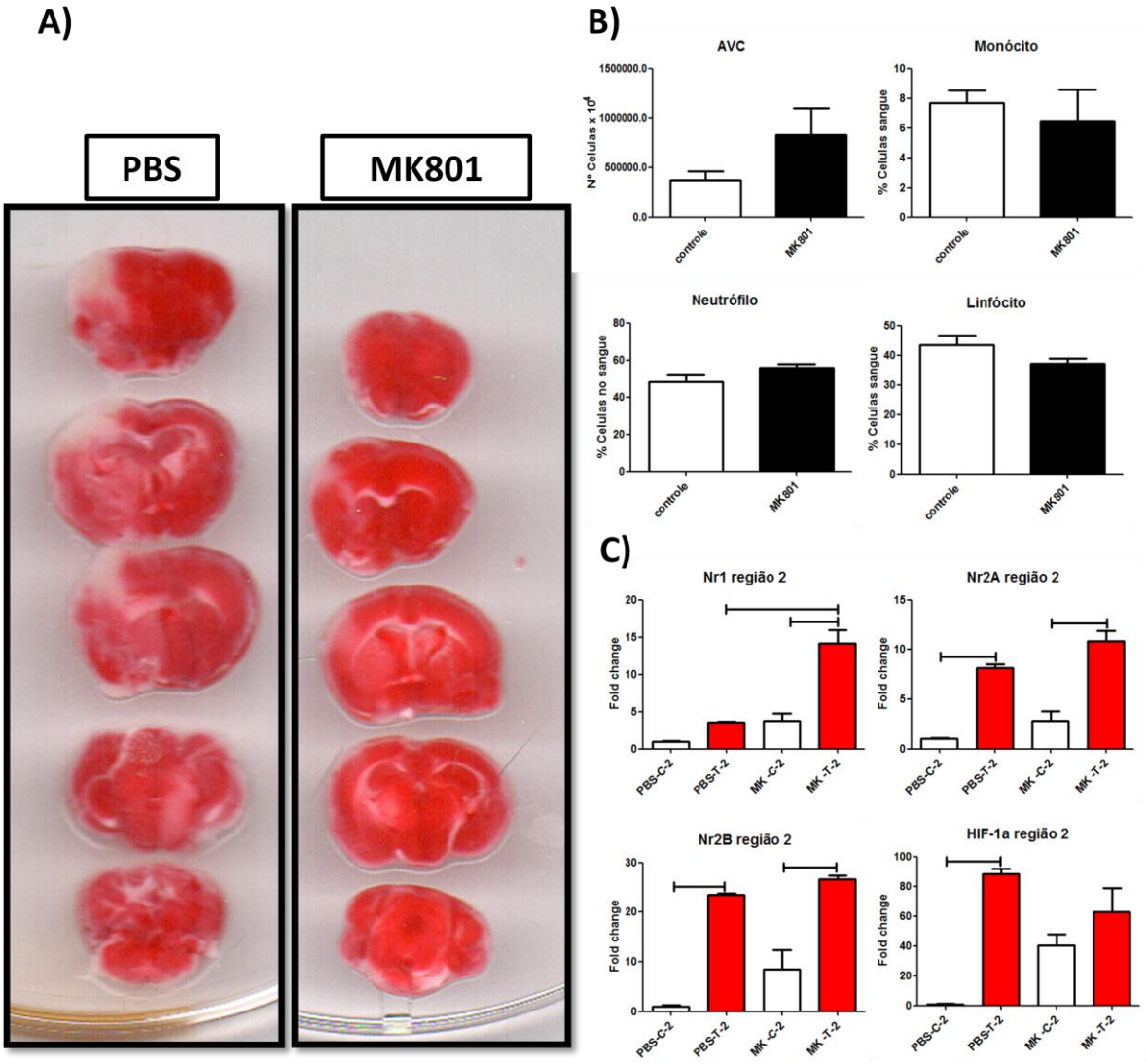


Figura 31 - Tratamento com MK801 diminui lesão gerada por MCAO. Animais C57B/6 que passaram pelo protocolo de MCAO foram ou não pré-tratados 1 hora antes com 0,3 mg/Kg de MK801. A) avaliação por TTC da área infartada. B) Contagem diferencial de leucócitos presentes no sangue dos animais isquemiados. C) Avaliação por RT-PCR do corte 2 do cérebro dos animais que passaram pela MCAO. Analise estatística feita por One-way Anova e Tukey. * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$

5 DISCUSSÃO

Nossos dados demonstram que o estresse promovido pela hipóxia seguido de reoxigenação é suficiente para, não só ativar, mas também induzir a morte das células da microglia. É interessante observar que tal fator exclusivamente parece não mudar a viabilidade dos neurônios da linhagem SHY. Dentre os possíveis mecanismos envolvidos nesse processo de morte temos o estresse por espécies reativas do oxigênio (ROS) e nitrogênio (NOS). Este pode ser desencadeado por dois fatores: I) Aumento na produção de ROS e NOS. II) Diminuição da capacidade das enzimas antioxidantes de promover a eliminação dos mesmos.

Seguindo este conceito, temos no estresse oxidativo a superprodução de espécies reativas, tais como o ânion superóxido ($O2^{\bullet -}$), o ânion peroxinitrito ($ONOO^{-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o óxido nítrico ($NO^{\bullet}$) e o radical hidroxila ($OH^{\bullet}$) podem culminar em processos de morte celular por necrose ou apoptose, por meio da interação com lipídeos, proteínas e ácido desoxirribonucléico (DNA) (Maccioni et al., 2001).

A atividade enzimática da glutationa peroxidase (GPx) é um importante componente na proteção contra radicais livres em espécies que utilizam o metabolismo oxidativo, sendo importante para a sobrevivência da célula por catalisar a redução de peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos lipídicos. Esta enzima incorpora um resíduo de selenocisteína no seu sítio ativo (Banerjee, 2008). O núcleo do resíduo cistenilglicina da glutationa reduzida (GSH) está envolvido na sua função como antioxidante, mais especificamente como um redutor intracelular, sendo capaz de formar um radical $GS^{\bullet}$, que produz por dimerização a glutationa oxidada (GSSG). A GPx catalisa esse processo e a GSSG produzida é então reduzida pela glutationa redutase (GR), regenerando a GSH, em um processo dependente de NADPH. A disponibilidade limitada de NADPH pode levar ao aumento de GSSG e deixar as células mais sensíveis ao dano oxidativo (Vannucchi, 1998).

A enzima glutationa S-transferase (GST) é descrita como a mais importante enzima envolvida no processo de metabolismo de compostos eletrofílicos. As GSTs são enzimas envolvidas no processo de detoxificação celular, mecanismo responsável pela metabolização de xenobióticos, na qual através da avaliação desta enzima podemos ter uma melhor compreensão do ambiente em que estas células se encontram (Banerjee, 2008; Dourado et al., 2008).

Ao analisarmos isoladamente nossas culturas de neurônios e células da microglia percebemos que após o período de reoxigenação, as células da microglia possuem uma queda na atividade enzimática mais pronunciada do que os neurônios, este pode ser um indicativo para as diferenças na viabilidade celular observadas entre os neurônios e células da glia após o estímulo da hipóxia. Estímulo este que também promoveu alterações em moléculas associadas a função de apresentação de antígeno das células da microglia. Dentre essas mudanças temos uma diminuição da expressão das moléculas de MHC-II, a qual pode estar associada com menor ativação da via do NF-κB, uma vez que observamos diminuição da expressão gênica de IKKα. Experimentos envolvendo o bloqueio da sinalização do NF-κB por diethyldithiocarbamato no modelo animal de obstrução da artéria cerebral média (MCAO) demonstraram que a diminuição da ativação dessa via resulta em aumento da morte das células neurais (Hill et al., 2001). Tal resultado está associado a atuação dessa via na indução de fatores tróficos para neurônios bem como ativação de enzimas antioxidantes (Mattson, Meffert, 2006).

Além das mudanças na expressão de MHC-II, observamos aumento da molécula PD-L1 (*Programmed Death Ligant-1*). Este atua principalmente nos processos de exaustão da resposta imunológica, com diminuição da produção de citocinas e da proliferação de linfócitos T ativados. O PD-L1 é geralmente expresso em células apresentadoras de antígenos enquanto que o seu receptor PD-1 (*Programmed Death-1*) é comumente expresso em linfócitos e monócitos ativados. A presença do ligante em células de origens não hematopoiéticas está associada como proteção tecidual com menor dano associado ao tecido. Sua sinalização está intrinsecamente relacionada com a tolerância imunológica auxiliando no desenvolvimento de novas células T reguladoras, bem como na inativação de clones de linfócitos T que reconheçam antígenos próprios (Francisco et al., 2010).

Após a ligação do PD-L1 com seu receptor, ocorre a fosforilação de SHIP-2 (*SH2-domain containing tyrosine phosphatase-2*) que promove bloqueio da ativação de PI3K (*phosphatidylinositol-3-kinase*). Ao bloquear PI3K a sinalização de AKT se torna prejudicada impedindo a transcrição de genes importantes para sobrevida, como o Bcl-xL e vias de ativação celular como a do NF-κB e NFAT. Contudo a ligação PD-L1 com PD-1 parece ser uma via de mão dupla, a qual promove mudanças nas células apresentadoras de antígenos (APCs) que expressam o ligante. Esta sinalização pode induzir diminuição da ativação das mesmas

bem como aumento na produção de IL-10 (Keir et al., 2008; Francisco et al., 2010). Entretanto, o entendimento sobre esta molécula não está completamente elucidado e ainda não está claro se ela participa diretamente da morte das células da glia diminuindo genes anti-apoptóticos, ou se é apenas uma resposta à ausência de oxigenação.

Já é bem descrito que o processo de isquemia promove aumento nos níveis de glutamato, seja em parte devido a maior produção por neurônios, ou pelo extravasamento do conteúdo contido no interior das células mortas. Em condições basais, através da sinalização pelo NMDAr, o glutamato produzido auxilia na sobrevivência de neurônios, principalmente por aumentar a produção de fatores tróficos como o BDNF, contudo o que se visualiza no AVC é um aumento massivo nas concentrações desse neurotransmissor conduzindo a morte celular pelo processo de excitotoxicidade. O controle da produção do glutamato se dá através da ação de duas enzimas importantes a glutaminase que atua transformando a glutamina em glutamato e a glutamina sintetase que possui o papel oposto (Lai et al., 2011; Kritis et al., 2015;).

Nossos dados apontam que a diminuição na concentração de oxigênio leva a uma menor expressão gênica da glutamina sintetase nas células da microglia. Este fenômeno por sua vez pode ser um dos responsáveis pelo aumento do glutamato durante hipóxia. A fim de observar quais os efeitos gerados por esse neurotransmissor sobre a resposta inflamatórias das células da microglia, iniciamos a avaliação da via de sinalização do NMDA sobre as células C8B4. Através da técnica de imunofluorescência percebemos que a linhagem C8B4, não só apresenta os receptores NMDA, como também a vesícula transportadora responsável por transportar o glutamato do citoplasma para as vesículas sinápticas que liberam esse neurotransmissor.

Ao quantificarmos esse glutamato produzido por essas células, vemos que as mesmas promovem uma alta concentração do mesmo que muito se estende a da cultura primária. Essa diferença pode se estender a habilidade de proliferação dessa linhagem, muito maior do que a cultura primária, podendo ao longo dos três dias de cultivo mais que triplicar o seu número e consequentemente sua produção do neurotransmissor. Possivelmente por apresentar tais características de produção, as células C8B4 manifestam maior resistência à concentrações mais elevadas do estímulo com NMDA. Entretanto, ao utilizarmos antagonista do receptor (MK801), demonstraram uma citotoxicidade a partir da

concentração de 500 µM, bem como um efeito supressor sobre a resposta das C8B4 mais evidente na concentração de 100 µM. Sendo assim, é plausível imaginarmos que a ativação do NMDAr seja de importância para viabilidade desse tipo celular, bem como mudanças na sua sinalização em estado basal podem mudar o seu limiar de ativação e de resposta à estímulos inflamatórios.

A atuação da microglia sobre estímulos inflamatórios se estende por mais de duas décadas, quando Kreutzberg (1996) já indicava-a como o sensor para eventos patológicos no SNC. Atualmente vemos que esta célula não é apenas um sensor para respostas infecciosas, mas também para todo o tipo de sinal que reflita em quebra na homeostase desse tecido. Podemos citar como exemplo a sua capacidade em responder a estímulos de dano como o ATP liberado por células mortas, aumentando assim sua mobilidade, proliferação e capacidade fagocítica (Lee, 2013).

Nossos dados apontam para uma mudança na forma como a microglia responde à estímulos inflamatórios na ausência de uma sinalização conjunta do NMDAr. Durante o estado basal, sem estímulos inflamatórios, o bloqueio da sinalização pelo MK801 diminui a expressão de moléculas co-estimuladoras, se mantendo baixas mesmo após a incitação por LPS. Junto a isso, é descrito na literatura que altas concentrações de LPS podem induzir morte celular, além de promover maior produção de glutamato por parte das microglias podendo assim induzir apoptose pela ativação de p38 (Takaki et al., 2012). Ao tratarmos as células previamente com MK801 (20 minutos antes) vemos que as mesmas tem menor perda do número células vivas comparadas com as culturas que receberam apenas estímulos por LPS, o que poderia servir de tratamento se transportado ao contexto de uma neuroinflamação.

Ao utilizarmos o tratamento prévio com MK801 durante o protocolo de hipóxia percebemos uma melhora na sobrevida das células no período de reoxigenação, além de retornar a expressão de IKKα durante o período de hipóxia, tanto na linhagem celular quanto na cultura mista de células da glia. Contudo este tratamento tende a diminuir a expressão gênica da glutamina sintetase nos períodos de normóxia, indicando que sua ação possa vir como um *feed back* da ativação promovida pelo glutamato.

Segundo a literatura, após os eventos iniciais com morte neuronal e ativação das células da glia, o processo de isquemia *in vivo* é acompanhado por infiltração de células

imunes residentes, sendo os neutrófilos os primeiros, seguido dos monócitos. A entrada dessas células no SNC tem um papel agravante na doença, principalmente pela sua capacidade de produção de espécies reativas do oxigênio e nitrogênio além de aumentar a concentração de citocinas pró-inflamatórias como o TNF-α, induzindo maior morte neuronal (Xu, Jiang, 2014). Com o intuito de compreender qual o papel do glutamato, altamente expresso nessa patologia, sobre estas células iniciamos experimentos que visassem as mudanças no perfil de ativação dos monócitos e a produção de NO por neutrófilos.

A plasticidade e flexibilidade são as principais características de fagócitos mononucleares e de seus estados de ativação. Estes estados são derivados de uma polarização diferencial que pode ser promovida através de vários estímulos entre eles os ligantes de TLR como é o caso do LPS, além da ação direta de citocinas como IFN-γ , estes estímulos promovem o fenótipo de monócitos "Classicamente ativados" designado por M1. Por outro lado, uma ativação promovida por estímulos de IL-4 / IL-13 ou IL-10 e fagocitose de células apoptóticas, desencadeiam um fenótipo conhecido como monócitos "Alternativamente ativados", conhecido por M2 (Sica, Mantovani, 2012).

Nossos dados apontam que a sinalização do NMDAr participa do processo de polarização que a célula irá aderir. Ao promover o bloqueio de sua sinalização percebemos que mesmo em condições ótimas para sua diferenciação em um perfil M1, com adição de LPS e IFN-γ, os macrófagos apresentam menores quantidades da molécula có-estimuladora como CD86 e da produção de NO, indicando uma diferenciação menos efetiva.

Dentre as hipóteses que expliquem a atuação do NMDAr na modulação dos macrófagos está a relação da proteína HIF-1α para o desenvolvimento da resposta M1 (Figura 2). Em condições normais de O_2 ocorre a ativação da enzima PHD (*Prolyl hydroxylase*) que tem a função de hidroxilar o HIF-1α mandando-o ao encontro do proteassoma para sua degradação (Brüne et al., 2013). Em contrapartida, durante um processo de isquemia cerebral, ou seja, privação de O_2, ocorre aumento da produção de glutamato pelas células neurais e menor capitação do mesmo pelas células da glia, o que aumenta as concentrações desse neurotransmissor no microambiente. Este glutamato passaria a sinalizar pelo NMDAr promovendo maior influxo de cálcio (Fann et al., 2013).

Ao adentrar nas células, o cálcio atuará nas mitocôndrias alterando a cadeia transportadora de elétrons com aumento na produção do ânion superóxido. A entrada de

Ca^{2+} também é capaz de ativar a NADPH oxidase e a óxido nítrico sintetase as quais aumentam as concentrações de ROS e NOS. Baixas concentrações de oxigênio junto a NOS e ROS promovem o bloqueio da PHD levando ao aumento da expressão de HIF-1α que atuará em conjunto com NF-κB para a promoção de um perfil M1 (Brüne et al., 2013).

Sendo assim é plausível especularmos que o bloqueio da sinalização do NMDAr possa modular essa via através da diminuição dos radicais livres. Um mecanismo semelhante deve ocorrer aos neutrófilos, pois os mesmos desenvolvem uma queda na produção de NO, tanto no estado basal quanto estimulado por LPS, ao terem a via do NMDAr bloqueada.

A fim de mimetizar o contato que ocorre entre os monócitos da periferia com as células da microglia ativadas pela isquemia, realizamos um experimento utilizando células CD11b provenientes do baço de animais C57BL/6, isoladas por *beads* magnéticas. Estas células foram marcadas com CFSE para serem reconhecidas posteriormente por citometria de fluxo e tratadas ou não com MK801 por 20 minutos. Após esse período as células foram colocadas em cultura com células da microglia que passaram 24 horas sob a condição de hipóxia e permaneceram com as mesmas por mais 24 horas em estufa com concentrações normais de oxigênio.

Nossos resultados apontam para ações antagônicas nessa interação, a qual depende do microambiente em que a célula se encontra. Os monócitos cujo a sinalização do NMDAr estava bloqueada ao entrarem em contato com as células que estavam em normóxia promoveram maior expressam de PD-L1 bem como aumento nas concentrações de IL-10. Por sua vez, aqueles que entram em contato com células da microglia após um insulto de hipóxia, desenvolveram uma reposta completamente diferente. Os monócitos tratados com MK801 induziram a diminuição tanto da molécula de exaustam PD-L1 quanto de CD86, além de que só a presença dessas células já foram suficientes para diminuírem as concentrações de IL-1β e NO nesse microambiente.

Contudo o contato celular parece promover forte impacto nessa modulação, uma vez que o tratamento apenas com o sobrenadante das linhagens de C8B4 não promoveu mudanças nas moléculas de superfície dos macrófagos derivados de medula óssea. Ainda assim, o tratamento com MK801 por si só foi suficiente para diminuição das moléculas de MHC-II e PD-L1, além de aumentar o número de células detectadas. Estes resultados

demonstram que mesmo em estados basais a sinalização pelo NMDAr é importante para determinar o limiar de ativação dos macrófagos.

Apesar de observarmos efeitos do bloqueio do NMDAr nas células imunes da periferia, era necessário entender como que o glutamato chega nesse locais. Pois se observamos um efeito ainda que nos estados basais de ativação dessas células é de se esperar que o ligante esteja presente nesse microambiente. Ao dosarmos a concentração de glutamato em diversas culturas diferentes, vemos que todas expressam ao menos em baixa concentração o glutamato. É interessante observar que no caso da cultura de macrófagos provenientes de medula óssea, apenas após o estímulo por LPS que a produção de glutamato se inicia. Este aumento provavelmente atua auxiliando na ativação da via do NADPH com promoção da diferenciação dessas células para macrófagos do perfil M1. Já ao olharmos as culturas de células do baço e do timo percebemos uma maior concentração desse neurotransmissor, isto pode ser devido a presença de mais subtipos celulares capazes de expressar essa molécula, como é o caso das células dendríticas (Affaticati et al., 2011).

Tais resultados demonstram que a atuação do glutamato se estende à diversos compartimentos da resposta imune e que a sinalização pelo NMDAr parece desenvolver um papel chave na ativação dessas células. Sendo assim é de se esperar que o bloqueio dessa sinalização *in vivo* seja capaz de diminuir parte da resposta inflamatória desencadeada no desenvolver de um AVC, melhorando assim o aspecto clínico da doença.

Existem diversos modelos de isquemia para o estudo do AVC, sendo estes comumente separados em modelos de isquemia global (o fluxo sanguíneo é diminuído em quase todo o encéfalo) ou focal (diminuição do fluxo de sangue em uma única região). Dentro dessas categorias ainda podem ser classificados em transitório (com reperfusão) e permanente (sem reperfusão). Para o estudo dos fenômenos que o bloqueio na sinalização do NMDAr provocaria, escolhemos o modelo de oclusão da artéria cerebral média (MCAO) que consiste na introdução de um fio intralumial através da artéria carótida interna até chegar na altura da artéria cerebral média obstruindo assim a passagem do fluxo sanguíneo para essa região pelo período de uma hora, seguido de reoxigenação pelas próximas 24 horas (Fonteles, 2013).

Neste modelo vimos uma lesão isquêmica característica, bem como mudanças clínicas no animal (caminhar em sentido único), além disso o tratamento com MK801

promoveu menor área infartada, bem como uma tendência ao aumento do número de leucócitos circulantes na corrente sanguínea. Tal fenômeno nos leva a hipotetizar que estas células são ativadas, mas não infiltram com tanta facilidade o parênquima cerebral. Essa ação poderia ser decorrente de menor permeabilidade na barreira hematoencefálica, devido a menor produção de radicais livres pela microglia, bem como menor expressão de citocinas pró-inflamatórias e produção de NO pelas células infiltrantes (Figura 32). A administração prévia do MK801 também induz aumento de HIF-1α no lado ipsilateral que por sua vez poderia sinalizar ao sistema um trauma futuro.

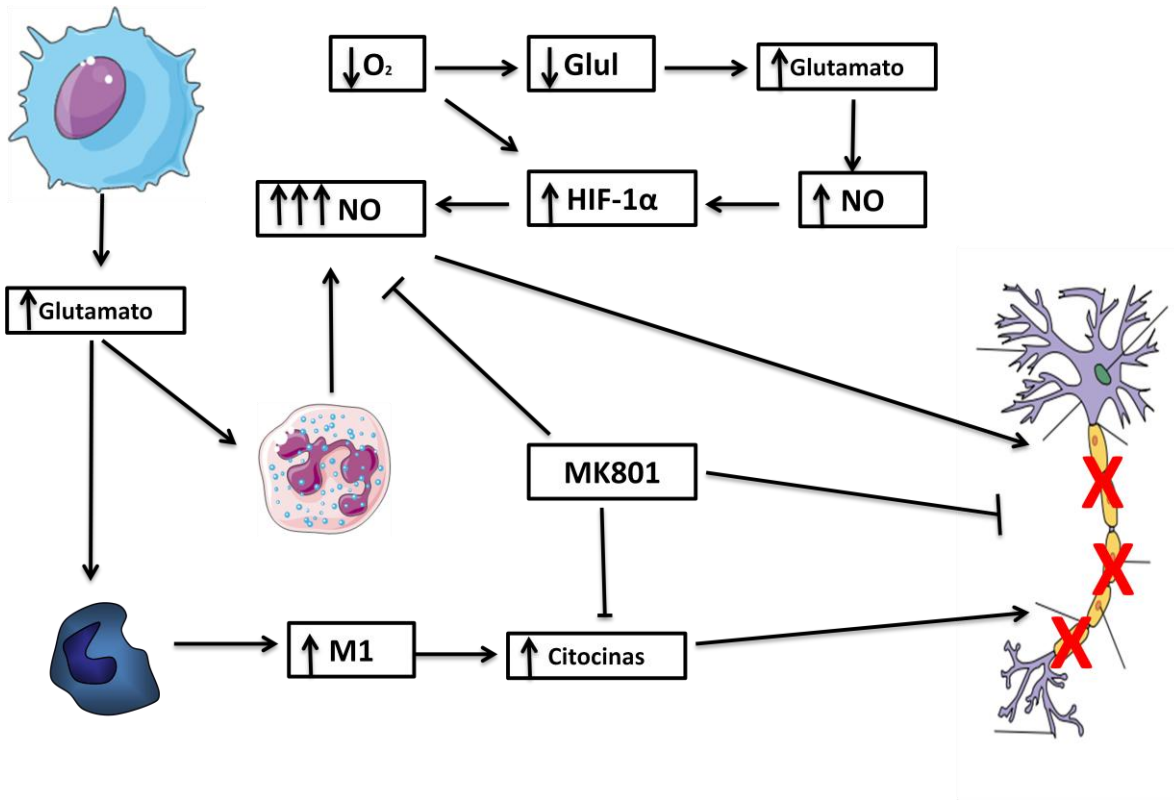


Figura 32 - Esquema ilustrativo das ações do glutamato sobre a resposta das células inatas e suas influências sobre a morte neuronal no AVC. Representação da sequência de fenômenos desencadeados pela diminuição da concentração de O2 e a repercussão do tratamento com MK801. A diminuição da oxigenação age sobre as células da micróglia diminuindo a expressão de glutamina sintetase, culminado no aumento das concentrações do glutamato. Este aumento induz maior produção de óxido nítrico (NO) que junto a diminuição do oxigênio amplificam a expressão de HIF-1α refletindo no aumento da produção de NO e morte neuronal. O glutamato produzido pelas células da micróglia, é capaz de agir sobre os neutrófilos, induzindo-os a secretar NO, e nos macrófagos polarizando-os para o perfil M1 com maior produção de citocinas pró-inflamatórias gerando aumento da morte neuronal. Por sua vez o bloqueio da sinalização do NMDAr pelo tratamento com MK801 diminuiria as concentrações de NO produzidos por células da micróglia e neutrófilos, bem como a produção de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos, diminuindo assim a lesão no SNC.

Por fim, vemos uma resposta concisa da sinalização do NMDAr no desempenhar da patologia do AVC, tanto em ação direta na excitotoxicicidade quanto na resposta inflamatória, o que o torna um alvo válido para futuros tratamentos. Ainda assim, novos experimentos são necessários para melhor entender os mecanismos desempenhados por essa sinalização, não apenas para os processos de hipóxia, mas para as doenças neuroinflamatórias em geral.

6 CONCLUSÕES

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

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS*

Affaticati P et al. Sustained calcium signalling and caspase-3 activation involve NMDA receptors in thymocytes in contact with dendritic cells. Cell death and differentiation.2011; 18 (1): 99–108.

Banerjee R. Redox Biochemistry.Willey-Interscience.2008

Boldyrev AA, Bryushkova EA, Vladychenskaya EA. NMDA receptors in immune competent cells. Biochemistry. Biokhimiia. 2012;77(2):128–34.

Brouns R, De Deyn PP. The complexity of neurobiological processes in acute ischemic stroke. Clinical Neurology and Neurosurgery. 2009; 111(6): 483–495.

Brüne B et al. Redox control of inflammation in macrophages. Antioxidants & redox signaling. 2013; 19 (6): 595–637.

Chen, Z. et al. Microglial displacement of inhibitory synapses provides neuroprotection in the adult brain. Nature communications. 2014; 5 (n): 4486.

Cosentino M, et al. Human CD4+CD25+ regulatory T cells selectively express tyrosine hydroxylase and contain endogenous catecholamines subserving an autocrine/paracrine inhibitory functional loop. Blood. 2007; 109 (2): 632–642.

Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke : an integrated view. trends neuroscience. 1999; 22(n):391–397.

Dourado DFAR, et al. Glutathione transferase: New model for glutathione activation. Chemistry - A European Journal. 2008; 14 (31): 9591–9598.

Dudvarski Stankovic N, et al. Microglia–blood vessel interactions: a double-edged sword in brain pathologies. Acta Neuropathologica.2016; 131 (3): 347–363.

Durukan A, Tatlisumak T. Acute ischemic stroke: Overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. Pharmacology Biochemistry and Behavior.2007; 87 (1): 179–197.

Duvoisin RM, Zhang C, Ramonell KA. Novel metabotropic glutamate receptor expressed in the retina and olfactory bulb. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience. 1995; 15(4): 3075–83.

---

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Segovia G, et al. Glutamatergic neurotransmission in aging: A critical perspective. Mechanisms of Ageing and Development. 2011; 122 (1) 1–29.
Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. Journal of Clinical Investigation. 2012; 122 (3): 787–795.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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