

**Estudo da influência do ácido retinóico no
acidente vascular cerebral
Relação entre neurónios, astrócitos e músculo liso
vascular**

Manuel António do Rosário Pouso

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Bioquímica
(2^o ciclo de estudos)

Orientador: Prof. Doutora Maria Elisa Cairrão Rodrigues

janeiro de 2022

Efeito do ácido retinóico no acidente vascular cerebral.

Dedicatória

Esta dissertação é dedicada a todas as pessoas que, das mais diversas formas, contribuíram para a sua realização.

Efeito do ácido retinóico no acidente vascular cerebral.

Agradecimentos

Em primeiro lugar expresso o meu profundo agradecimento à Professora Doutora Elisa Cairrão pela oportunidade de desenvolver este trabalho, por toda a orientação, apoio e por todo o conhecimento que me transmitiu ao longo da realização deste trabalho.

Ao Emanuel pela ajuda na adaptação ao trabalho laboratorial e por, juntamente com a Professora Doutora Graça Baltazar e o seu grupo de investigação, ter obtido os meios condicionados pelas culturas corticais utilizados na realização deste trabalho.

Ao restante grupo de investigação, nomeadamente, Joana e Melissa por toda a ajuda no laboratório, à Margarida por todos ensinamentos, paciência e atenção para comigo, à Carolina e Maria Inês por todos os momentos de trabalho conjunto e de amizade e finalmente ao Rui por toda a ajuda e companheirismo ao longo deste trabalho.

À minha família, sobretudo aos meus pais, agradeço tudo o que sou hoje. Sem o seu esforço e incentivo não teria chegado até aqui, pelo que esta dissertação também é muito deles.

Por último, agradecer à Francisca por todo o amor, carinho, por ter estado comigo desde o início desta jornada, por todos os conselhos e confiança que me deu e por ter sempre acreditado em mim, mesmo quando nem eu acreditava.

Efeito do ácido retinóico no acidente vascular cerebral.

Resumo

O acidente vascular cerebral constitui uma das principais causas de morte e de invalidez em todo o mundo. A artéria cerebral média deriva da artéria carótida interna e é responsável pela irrigação de diversas áreas do cérebro, estando associada à maioria dos quadros clínicos de acidente vascular cerebral. Embora represente apenas 2% da massa corporal, o cérebro humano utiliza cerca de 20% da energia gerada pelo organismo. Desta forma, é de extrema importância manter os níveis de perfusão adequados, uma vez que é através do fluxo sanguíneo que o cérebro recebe os níveis corretos de oxigênio e nutrientes para o desempenho das suas funções. As células musculares lisas são os principais componentes celulares das artérias sendo responsáveis pela alteração do diâmetro das mesmas, através de mecanismos de contração e relaxamento, possibilitando a regulação do fluxo sanguíneo em função das necessidades energéticas do cérebro. Assim, o principal objetivo deste trabalho é analisar o efeito do ácido retinóico, um derivado da vitamina A com propriedades vasoativas e anti-inflamatórias, na regulação da função vascular mediada por neurónios e astrócitos após um evento isquémico. Foram isolados explantes da artéria cerebral média de ratos Wistar e aderidos a placas de culturas revestidas com colagénio. A partir dessas artérias foram obtidas células do músculo liso tendo estas sido expostas a meios condicionados por co-culturas de neurónios e astrócitos, previamente incubadas com diferentes concentrações de ácido retinóico e submetidas a isquemia. Através da técnica de *Planar Cell Surface Area*, foi analisada a resposta das células do músculo liso ao agente contráctil, noradrenalina, e ao agente relaxante, nitroprussiato de sódio. A utilização deste derivado da vitamina A modulou o secretoma de neurónios e astrócitos submetidos a ambiente isquémico. A concentração de 5 μ L de ácido retinóico apresenta os resultados mais promissores, promovendo o relaxamento das células musculares lisas quando expostas ao agente contráctil utilizado, mantendo o mesmo perfil após a adição do agente vasodilatador. Assim, estes dados indicam que a utilização de ácido retinóico apresenta benefícios terapêuticos, após um acidente vascular cerebral, promovendo o relaxamento das células do músculo liso e aumentando, assim, os níveis suprimento sanguíneo.

Efeito do ácido retinóico no acidente vascular cerebral.

Palavras-chave

Artéria Cerebral Média; Isquemia; Mecanismos Vasoativos; Retinoide; Unidade Neurovascular

Efeito do ácido retinóico no acidente vascular cerebral.

Abstract

Stroke constitutes one of the main causes of death and disability worldwide. The middle cerebral artery derives from the internal carotid artery and is responsible for the irrigation of several brain areas, being associated with most cases of stroke. Despite representing only 2% of the body mass, the human brain uses around 20% of organism energy. Therefore, is extremely important to maintain the correct perfusion levels, since it is through the blood flow that the brain achieves the proper levels of oxygen and nutrients. Smooth muscle cells are the main cellular components of arteries, enabling the regulation of blood flow, through contraction and relaxation mechanisms. Thus, the aim of this work is to analyze the effect of retinoic acid, a vitamin A derivative with vasoactive and anti-inflammatory properties, in vascular regulation after an ischemic event. Middle cerebral arteries explants from Wistar rats were isolated and adhered to collagen-coated culture plates. Smooth muscle cells were obtained from these arteries and exposed to different media conditioned by cortical cultures, previously incubated with different concentrations of retinoic acid and subjected to ischemia. Through the Planar Cell Surface Area technique, the smooth muscle cell response to the contractile agent, noradrenaline, and the relaxing agent, sodium nitroprusside, was analyzed. The obtained results demonstrate that the use of retinoic acid modulates the secretome of neurons and astrocytes subjected to an ischemic context. The retinoic acid concentration of 5 μ L exhibits the most promising results, promoting the relaxation of smooth muscle cells when exposed to the contractile agent, maintaining the same profile after the vasodilator agent addiction. Therefore, these data indicate that retinoic acid use demonstrates some therapeutic benefits after a stroke occurrence, promoting smooth muscle cells relaxation and, consequently, increasing blood supply levels.

Keywords

Ischemia, Middle cerebral artery, Neurovascular unit, Retinoid, Vasoative mechanisms

Efeito do ácido retinóico no acidente vascular cerebral.

Índice

1.	Introdução.....	1
1.1.	Sistema Vascular Cerebral.....	1
1.2.	Unidade Neurovascular.....	2
1.2.1.	Componentes Celulares da Unidade Neurovascular.....	4
1.3.	Ácido Retinóico.....	11
1.3.1.	Via de sinalização.....	11
1.3.2.	Efeito do ácido retinóico nas células da unidade neurovascular.....	13
1.4.	Acidente Vascular Cerebral.....	19
1.4.1.	Epidemiologia do Acidente Vascular Cerebral.....	19
1.4.2.	Patofisiologia do Acidente Vascular Cerebral.....	20
1.4.3.	Tratamento do Acidente Vascular Cerebral.....	22
2.	Objetivos.....	25
3.	Materiais e Métodos.....	26
3.1.	Exposição com ácido retinóico de culturas celulares de neurónios e astrócitos posteriormente sujeitas a privação de oxigénio e glucose.....	26
3.2.	Cultura celular de células musculares lisas.....	27
3.3.	Ensaio de Planar Cell Surface Area.....	27
3.4.	Análise Estatística.....	28
3.5.	Soluções e Materiais.....	29
3.5.1.	Soluções.....	29
3.5.2.	Químicos.....	29
3.5.3.	Materiais.....	30
4.	Resultados.....	31
4.1.	Obtenção de culturas primárias de células musculares lisas.....	31
4.2.	Ensaio de contractilidade celular.....	31
4.2.1.	Resposta celular à ação do agente contráctil.....	31
4.2.2.	Resposta celular à ação do agente relaxante.....	34
5.	Discussão.....	38
6.	Conclusão e Perspetivas Futuras.....	43
	Bibliografia.....	44

Efeito do ácido retinóico no acidente vascular cerebral.

Lista de Figuras

Figura 1. Imagem esquemática do círculo de Willis.....	2
Figura 2. Descrição esquemática da UNV ao longo da árvore vascular.....	3
Figura 3. Estrutura química do AR.	11
Figura 4. Via de sinalização do AR.....	12
Figura 5. Representação de um AVC isquêmico e de um AVC hemorrágico.....	22
Figura 6. Cultura primária de CML obtidas a partir do explante da ACM.	31
Figura 7. Efeito da NA (1 μ M) nas CML.	33
Figura 8. Perfil temporal da contração induzida por NA (1 μ M).	34
Figura 9. Efeito do SNP (1 μ M) nas CML após contração com NA.....	36
Figura 10. Perfil temporal de relaxamento induzido por SNP após contração com NA.....	37

Efeito do ácido retinóico no acidente vascular cerebral.

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Soluções utilizadas no decorrer deste trabalho.	29
Tabela 2 – Materiais/Equipamentos utilizados durante este trabalho.	30

Efeito do ácido retinóico no acidente vascular cerebral.

Lista de Acrónimos

20-HETE	Ácido 20-Hidroxieicosatetraenóico
AA	Ácido araquidónico
ACM	Artéria cerebral média
AIT	Acidente isquémico transitório
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico
ApoE	Apolipoproteína E
AR	Ácido retinóico
ATP	Adenosina trifosfato
AVC	Acidente vascular cerebral
β A	Beta-amiloide
BHE	Barreira hematoencefálica
BSA	Albumina de soro bovino (do inglês <i>Bovine Serum Albumin</i>)
Ca ²⁺	Ião cálcio
CE	Células endoteliais
CEN	Células estaminais neurais
cGMP	Monofosfato cíclico de adenosina (do inglês <i>cyclic Guanosine Monophosphate</i>)
CML	Células musculares lisas
CML-ACM	Células musculares lisas da artéria cerebral média
COX-2	Ciclooxigenase-2
CPO	Células progenitoras de oligodendrócitos
CRABP	Proteína celular de ligação ao ácido retinóico (do inglês <i>Cellular retinoic acid binding protein</i>)
CYP26	Enzimas da família 26 do citocromo P450 (do inglês <i>cytochrome P450 family 26</i>)
DA	Doença de Alzheimer
DAG	Diacilglicerol
DKK1	<i>Dickkopf homologue 1</i>
DP	Doença de Parkinson
EET	Ácidos epoxieicosatrienoicos (do inglês <i>Epoxyeicosatrienoic acids</i>)
EGF	Fator de crescimento epidérmico (do inglês <i>Epidermal Grow Factor</i>)
EM	Esclerose Múltipla
eNOS	Sintase do óxido nítrico endotelial (do inglês <i>Endothelial Nitric Oxide Synthase</i>)
FBS	Soro fetal de bovino (do inglês <i>Fetal Bovine Serum</i>)
FGF	Fator de crescimento fibroblástico
FSC	Fluxo sanguíneo cerebral
GABA	γ -aminobutírico (do inglês <i>γ-aminobutyric acid</i>)
HBSS	Solução salina tamponada de Hank (do inglês <i>Hank Balanced Salt Solution</i>)
HI	Hemorragia Intracerebral
HS	Hemorragia Subaracnóide
IL	Interleucina
IP3	1,4,5 – Trifosfato de Inositol (do inglês <i>Inositol-1,4,5-Triphosphate</i>)
JO	Junções oclusivas
K ⁺	Ião potássio

LPS	Lipopolissacarídeos (do inglês <i>Lipopolysaccharide</i>)
MAL	Moléculas de adesão leucocitárias
MCC	Meio de cultura completo
MSS	Meio de cultura sem soro
NA	Noradrenalina
NBM	Meio neurobasal (do inglês <i>Neurobasal Medium</i>)
N-G	Neuro-gliais
NMDA	Recetores N-metil-D-aspartato
OGD	Privação de oxigénio e glucose (do inglês <i>Oxygen and Glucose Deprivation</i>)
ON	Óxido nítrico
PBS	Tampão fosfato salino (do inglês <i>Phosphate-buffered saline</i>)
PCSA	Planar cell surface area
PDGF-B	Fator de crescimento derivado de plaquetas-B (do inglês <i>Platelet Derived Growth Factor Subunit B</i>)
PDGFR β	Recetor do fator de crescimento derivado de plaquetas (do inglês <i>Platelet Derived Growth Factor Receptor Beta</i>)
PGE ₂	Prostaglandinas E ₂ (do inglês <i>Prostaglandins E₂</i>)
PGI ₂	Prostaciclina I ₂ (do inglês <i>Prostacyclins I₂</i>)
PI3K/Akt	Via de sinalização Fosfatidilinositol-3-cinase/Proteína cinase B (do inglês <i>phosphoinositide-3-kinase/protein kinase B pathway</i>)
PKC α	Proteína cinase Ca (do inglês <i>Protein Kinase Ca</i>)
PLC	Fosfolipase C (do inglês <i>Phospholipase C</i>)
Ral	Retinaldeído
Raldh	Retinaldeído desidrogenase
RAR	Recetor de ácido retinóico
RARE	Elemento de resposta do ácido retinóico (do inglês <i>Retinoic Acid Response Element</i>)
RBP4	Proteína de ligação ao retinol 4 (do inglês <i>Retinol-binding protein 4</i>)
RXR	Recetor retinoide X
SAA	Solução antibiótico-antimicótico
sGC	Guanilato ciclase solúvel (do inglês <i>Soluble Guanylyl Cyclase</i>)
SNC	Sistema nervoso central
STRA6	Recetor de membrana para RBP4 (do inglês <i>Signaling Transporter And Receptor Of Retinol</i>)
TNF α	Fator de necrose tumoral α (do inglês <i>Tumor necrosis factor alpha</i>)
tPA	Ativador do plasminogénio tecidual (do inglês <i>tissue Plasminogen Activator</i>)
UNV	Unidade neurovascular
WNT	Via de sinalização Wnt- β -catenina

Efeito do ácido retinóico no acidente vascular cerebral.

1. Introdução

1.1. Sistema Vascular Cerebral

O cérebro apresenta-se como o órgão mais complexo do corpo humano, sendo caracterizado, entre outros aspetos, pela sua constante necessidade energética [1]. Em humanos, o cérebro representa 2% da massa corporal, utilizando no entanto cerca de 20% de energia, o que faz deste órgão o maior consumidor de glucose de todo o organismo [1, 2]. O fornecimento energético é deste modo crucial para a correta atividade cerebral, uma vez que, aliada à elevada necessidade energética, este órgão possui uma capacidade limitada no que diz respeito ao armazenamento de energia [1, 2]. Assim, o fornecimento de oxigénio e nutrientes, através do fluxo sanguíneo, é um processo contínuo e extremamente organizado, uma vez que pequenas alterações podem culminar em condições patológicas afetando não só o cérebro, como todo o organismo [1, 2]. A irrigação sanguínea cerebral é assegurada através de quatro artérias principais, nomeadamente duas artérias carótidas internas, responsáveis pela circulação anterior do cérebro e duas artérias vertebrais que controlam o fluxo sanguíneo na parte posterior do cérebro [3, 4]. Na base do crânio a circulação anterior e posterior unificam-se formando uma zona denominada de polígono de Willis (Figura 1) de onde derivam as principais artérias que possibilitam o fluxo sanguíneo colateral [3, 4]. A artéria cerebral média (ACM) é uma das artérias que deriva do polígono de Willis e é responsável pela irrigação de vastas áreas laterais do cérebro [5]. Esta artéria está associada à maioria dos quadros clínicos de acidente vascular cerebral (AVC), pelo que a ocorrência deste tipo de lesão cerebrovascular pode culminar em sintomas diversos consoante as áreas afetadas [6].

Vários mecanismos viabilizam o transporte correto de oxigénio e nutrientes através da corrente sanguínea, sendo os fenómenos de autorregulação e hiperemia os mais importantes [1]. A autorregulação é o mecanismo que assegura a chegada de níveis adequados de oxigénio e nutrientes através de alterações no tónus vascular em situações fisiológicas como o exercício físico [1, 7]. No fenómeno de hiperemia existe a regulação do fluxo sanguíneo a nível local, garantindo que a quantidade de oxigénio e nutrientes se adequa às alterações de atividade em diferentes locais do cérebro [1]. Estas alterações do fluxo sanguíneo, de acordo com os aumentos ou diminuições da necessidade energética, são controladas por um conjunto de células que compõem uma estrutura denominada de unidade neurovascular (UNV) [1].

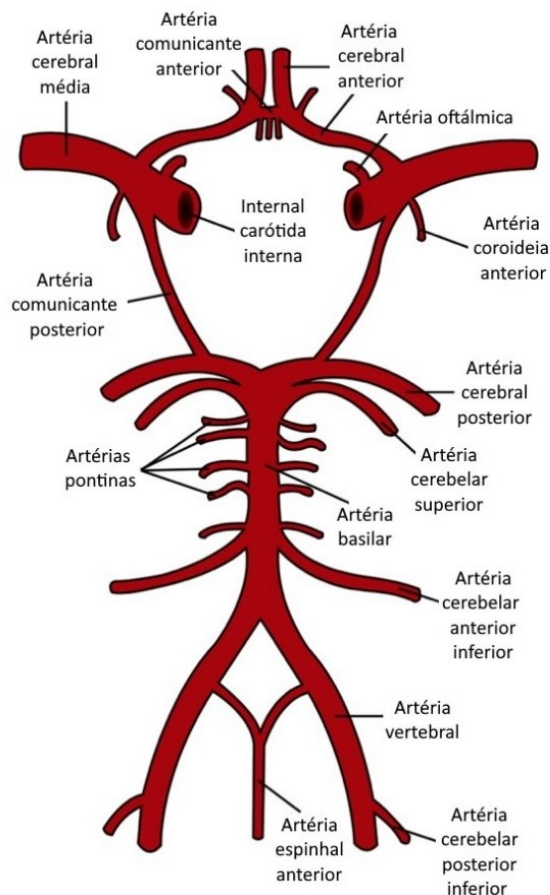


Figura 1. Imagem esquemática do círculo de Willis. Adaptado de [8].

1.2. Unidade Neurovascular

A UNV é constituída por células vasculares [células musculares lisas (CML), células endoteliais (CE) e pericitos], células gliais (astrócitos, microglia e oligodendrócitos) e neurónios, desempenhando um papel importante na manutenção da integridade da barreira hematoencefálica (BHE), bem como do controlo do fluxo sanguíneo cerebral (FSC) [9, 10]. No entanto, a interação entre as células que constituem esta estrutura fisiológica varia ao longo da árvore cerebrovascular (Figura 2) [11, 12]. Ao nível da superfície cerebral, as artérias que compõem o espaço subaracnoide são constituídas por CE que constituem a camada interna da parede dos vasos sanguíneos, sendo rodeadas por múltiplas camadas de CML e pelos pés astrocitários que limitam o espaço perivascular (espaço *Virchow-Robin*), sendo que, tanto as CML como os astrócitos são enervados por neurónios [11]. À medida que as artérias penetram o cérebro, dando origem a arteríolas que, tal como nas artérias da superfície cerebral, apresentam uma camada de CE responsáveis pela manutenção da estrutura da parede do vaso sanguíneo [11]. No entanto, estes vasos possuem camadas mais finas de CML, apresentando, em alguns casos, apenas uma camada, permitindo um contacto mais próximo com os pés astrocitários, por

comparação com as artérias superficiais, reduzindo assim o espaço perivascular [11]. As arteríolas transitam depois para capilares cerebrais, à medida que penetram ainda mais no cérebro, onde as CML são substituídas por pericitos, que partilham a membrana basal com as CE, estando estes vasos cobertos também por pés astrocitários [7, 11]. Ao longo da árvore cerebrovascular, encontram-se também vários processos neuronais que mantêm contacto com os astrócitos [7, 11].

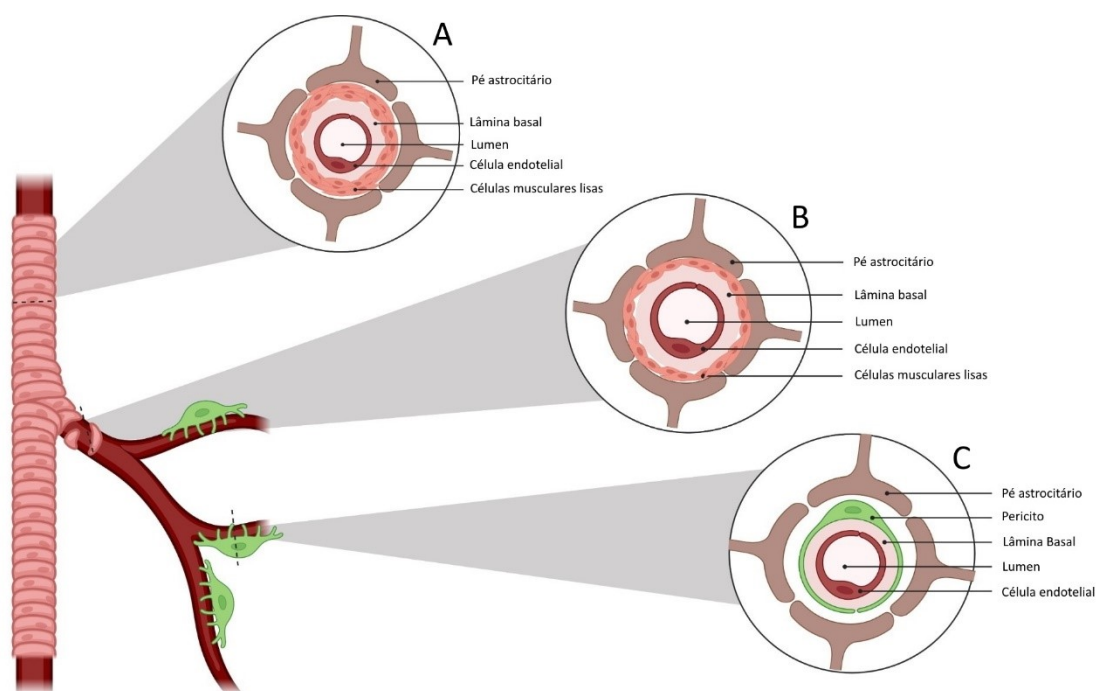


Figura 2. Descrição esquemática da UNV ao longo da árvore vascular. (A) A nível arterial, a UNV é constituída por CE que compõem a camada interna da parede dos vasos sanguíneos, sendo rodeadas por múltiplas camadas de CML e astrócitos que limitam o espaço perivascular (espaço *Virchow-Robin*). Neurónios são responsáveis por inervar as CML e os astrócitos. (B) A nível arteriolar, a percentagem de CML diminui por comparação com o nível arterial, apresentando somente uma camada. As CML, tal como nas artérias, são rodeadas por astrócitos sendo ambas as células inervadas por neurónios locais. (C) A nível capilar as CML são substituídas por pericitos, que partilham a mesma membrana basal que as CE. Neurónios locais são responsáveis pela inervação das CE e dos pericitos. Criado com *Biorender.com* (UNV – Unidade Neurovascular; CE – Células Endoteliais; CML – Células Musculares Lisas).

1.2.1. Componentes Celulares da Unidade Neurovascular

Neurónios

Os neurónios são considerados a unidade básica do sistema nervoso, sendo responsáveis pelos impulsos nervosos que controlam todo o organismo [13]. Estas células são muito sensíveis a alterações, sendo assim capazes de detetar pequenas variações de nutrientes e oxigénio, transformando esses sinais em impulsos elétricos e químicos de forma a comunicar com interneurónios adjacentes e astrócitos, repondo a homeostasia no ambiente cerebral [1]. Os neurónios podem também interagir com a vasculatura cerebral [14]. Esta associação é responsável pelo controlo do FSC em resposta ao aumento ou diminuição da necessidade energética numa determinada região cerebral, fenómeno conhecido hiperemia [14].

O processo de contração e relaxamento ao nível das arteríolas e dos capilares ocorre em resposta à libertação de substâncias vasoativas derivadas de neurónios e de astrócitos tais como ciclooxigenase-2 (COX-2), óxido nítrico (ON), acetilcolina, fator libertador de corticotropina, neuropeptido Y e somatostatina [14]. Um estudo desenvolvido por Mishra e colaboradores demonstrou que os neurónios possuem um papel fundamental no processo de dilatação a nível arteriolar através da ativação recetores N-metil-D-aspartato (NMDA) e consequente produção de ON [13, 15]. Esta relação entre a atividade neuronal e o controlo do FSC é denominada de acoplamento neurovascular [7]. A atividade sináptica glutamatérgica ativa recetores pós sinápticos NMDA e ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA), aumentando os níveis de Ca^{2+} intracelular [7]. Este aumento promove a ativação de enzimas dependentes de Ca^{2+} , tais como a sintase do ON endotelial (eNOS) e a COX-2 [7]. Estas enzimas geram moléculas vasodilatadoras, como ON e prostanóides [7]. Em simultâneo, o glutamato atua nos recetores metabotrópicos (recetores acoplados à proteína G que controlam os processos celulares por meio de segundos mensageiros) presentes nos astrócitos, despoletando o aumento dos níveis de Ca^{2+} intracelular e consequente produção de moléculas vasoativas [7, 16, 17].

Astrócitos

Os astrócitos são as células gliais mais abundantes no sistema nervoso central (SNC) [13, 18]. Devido à sua simultânea interação com a atividade sináptica e com o ambiente vascular, estas células apresentam-se como o principal elo de ligação entre a atividade neuronal e o controlo da vasculatura cerebral, sendo assim essenciais na regulação do FSC [14]. Os astrócitos estão em íntimo contacto com os neurónios e respetivas sinapses formando uma estrutura denominada de sinapse tripartida, estrutura essa responsável

pela limitação na difusão de neurotransmissores para o espaço sináptico [19]. O glutamato é um dos neurotransmissores captado pelos astrócitos e posteriormente convertido em glutamina, protegendo os neurónios da excitotoxicidade causada por este [20]. Estas células gliais controlam também a composição iónica do meio cerebral, recaptando K^+ proveniente da atividade neuronal [13, 21]. Além disso, estas células libertam também numerosas moléculas como D-serina, adenosina trifosfato (ATP), ácido γ -aminobutírico (GABA) e prostaglandinas, modulando assim a expressão de diversos recetores em neurónios pós-sinápticos e a sua respetiva atividade [13].

A nível vascular, o contacto dos astrócitos com os vasos sanguíneos cerebrais é fundamental para um controlo eficiente do FSC [1]. Esta interação com a vasculatura ocorre através de uma extensão dos astrócitos, denominada de pé astrocitário [1]. Através desta estrutura, estas células mantem contacto com a superfície das CML e dos pericitos [1]. Deste modo, os astrócitos providenciam uma área eficiente para a libertação de neurotransmissores e neuromoduladores [1]. Alguns estudos demonstraram que os astrócitos modulam a resposta vascular através da dilatação dos vasos sanguíneos [22], enquanto outros atribuem um papel de constrição a estas células gliais, equacionando-se assim a hipótese destas células realizarem ambas as tarefas [23]. A ação vasoconstritora dos astrócitos está possivelmente associada à síntese e libertação de ácido araquidónico (AA) e posterior conversão, através da enzima citocromo P450-4A, em ácido 20-hidroxiicosatetraenóico (20-HETE), que desempenha um papel vasoconstritor [7, 23].

Quanto ao processo de dilatação, este ocorre, aparentemente, como resposta por parte dos astrócitos à atividade neuronal, controlando a libertação de K^+ e consequente hiperpolarização das CML [23, 24]. Também o glutamato libertado pela atividade sináptica ativa recetores metabotrópicos de glutamato, levando à mobilização de 1,4,5 - trifosfato de inositol (IP₃). Esta alteração resulta na libertação de Ca^{2+} intracelular. O aumento dos níveis de Ca^{2+} leva à ativação da fosfolipase A₂, consequente libertação de AA e respetiva síntese dos seus derivados, tais como prostaglandinas E₂ (PGE₂) e ácidos epoxieicosatrienoicos (EET) [23-25].

Células Endoteliais

As CE são elementos fundamentais da BHE servindo de barreira física que isola o SNC, auxiliando a entrada e saída de substâncias e contribuindo também para um ambiente cerebral livre de toxinas e agentes patogénicos [10, 26]. O SNC requiere um ambiente controlado e livre de quaisquer substâncias que comprometam a transmissão sináptica [26]. Desta forma, as CE que constituem a BHE desempenham um papel fundamental na

manutenção da homeostasia do SNC [27]. De forma a manter a barreira física, as CE do SNC apresentam características distintas das CE de outros tecidos [12, 26, 27]. Estas células são caracterizadas pela presença de junções oclusivas (JO) (compostas por claudinas e ocludinas) e por junções aderentes (formadas por interações homofílicas entre caderninas) [27, 28]. Estas junções são cruciais na manutenção da correta função das CE, uma vez que impedem o movimento de substâncias entre células adjacentes (transporte paracelular) [27, 28]. Assim, o tráfego vesicular entre a membrana luminal e abluminal, processo denominado de transcitose, nas CE do SNC, é manifestamente inferior, aquando da comparação com as CE periféricas [12, 27]. A entrada de nutrientes, como glucose, aminoácidos, oxigénio e iões essenciais ao funcionamento cerebral é assegurado por proteínas transportadoras específicas das CE do SNC (transporte transcelular), impedindo também a difusão de substâncias neurotóxicas para o ambiente cerebral [12, 26]. Além disso, as CE cerebrais apresentam uma baixa expressão de moléculas de adesão leucocitárias (MAL), impedindo a entrada de células imunológicas para o ambiente cerebral, mantendo o SNC como um local imuno-privilegiado [12, 26, 27].

Do ponto de vista neurovascular, estas células produzem fatores vasoativos que são extremamente importantes no controlo do tónus vascular, alguns promovendo a vasodilatação, como o ON, mas também vasoconstritores, como tromboxanos e endotelinas [1]. Apesar das CE estarem presentes em todos os vasos sanguíneos cerebrais, estas apresentam diferente expressão proteica consoante o tipo de vaso [29]. Assim, o grau de transcitose e de organização das junções e de expressão enzimática, como a Na^+/K^+ ATPase diferem ao longo da árvore cerebrovascular [13]. Os transportadores associados às CE também diferem ao longo da vasculatura, sendo estas alterações dependentes, principalmente, da atividade sináptica [1, 13]. Estas células caracterizam-se pela expressão de recetores Frizzled, promovendo uma elevada expressão génica de proteínas da via de sinalização Wnt- β -catenina (WNT) [30]. A WNT é a via mais importante para o crescimento da vasculatura, regulando também as características dos vasos sanguíneos, tais como as propriedades da BHE [31]. Esta sinalização ocorre nas CE quando os ligandos Wnt7a/7b se ligam aos recetores Frizzled e de lipoproteína de baixa densidade associados a proteína (LRP5/6) expressos nas CE cerebrais [31]. Esta interação resulta na supressão do complexo de eliminação da β -catenina, impedindo a sua degradação proteossomal [31]. Desta forma, a β -catenina migra para o núcleo, promovendo a expressão dos genes alvo da WNT [31]. Para além do crescimento da vasculatura, a WNT desempenha um papel fundamental na expressão da Claudina 5, uma proteína de junção oclusiva que impede o movimento de moléculas do sangue para o ambiente cerebral [31]. A WNT regula também o correto recrutamento de pericitos para a vasculatura cerebral [31].

Pericitos

Os pericitos são células perivasculares de origem mesodérmica, que se encontram inseridas na membrana basal [10, 26]. Estas células estão localizadas entre as CE e os astrócitos, envolvendo a parede dos vasos sanguíneos de menor calibre [10, 26]. A vasculatura do SNC apresenta um maior número de pericitos, quando comparada com a vasculatura periférica, sendo que estas células contribuem para a regulação do tónus vascular ao nível dos capilares [26]. Um estudo demonstrou este papel por parte dos pericitos, regulando o fluxo sanguíneo, uma vez que o neurotransmissor glutamato promove a libertação de mensageiros, como PGE2 e ON, que auxiliam na dilatação dos capilares, promovendo o relaxamento ativo dos pericitos [10, 26]. Por outro lado, Kawamura e colaboradores demonstraram um efeito contráctil por parte dos pericitos como resposta ao aumento de ATP [1, 32]. Para além disso, existem também evidências que demonstram um efeito contráctil por parte dos pericitos, aquando da propagação de ondas de cálcio, ao longo da UNV [1]. Também durante o desenvolvimento embrionário, os pericitos desempenham funções importantes, nomeadamente no processo de angiogénese do SNC, bem como na formação da BHE [12]. Através da libertação da subunidade B do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF-B) pelas CE, durante o desenvolvimento embrionário, os pericitos são recrutados, uma vez que este fator se liga ao recetor do fator de crescimento derivado de plaquetas β (PDGFR β), expresso na superfície dos pericitos [12]. Estudos demonstraram que ratos com deleção no recetor PDGFR β , apresentaram micro-hemorragias ao nível do SNC e JO disfuncionais, traduzindo-se este facto numa permeabilidade vascular aumentada. [26]. Deste modo, estas células promovem a redução do tráfego transendotelial, contribuindo para a expressão de proteínas por parte das JO [12, 26]. Os pericitos possibilitam também a inibição da expressão de MAL nas CE, impedindo assim a infiltração de células imunitárias no ambiente cerebral [26].

Células Musculares Lisas

As CML são os principais elementos celulares que envolvem a parte externa dos vasos sanguíneos cerebrais, contribuindo para o tónus vascular basal, para a regulação do diâmetro dos vasos sanguíneos, pressão sanguínea e distribuição do fluxo sanguíneo [13, 33, 34]. Através dos fenómenos de contração e relaxamento, estas células alteram o diâmetro dos vasos sanguíneos, permitindo que estes mantenham a pressão sanguínea adequada [35, 36]. No entanto, as CML são também importantes na manutenção de outras funções relacionadas com a remodelação do tecido vascular aquando de uma lesão [35, 36]. Nestes casos, as CML sintetizam grandes quantidades de componentes da matriz

extracelular e aumentam as suas taxas de proliferação e migração [35]. Devido às diferentes funções que as CML podem exercer, estas podem variar entre dois fenótipos, um contráctil, com CML num estado diferenciado e um sintético, com as células num estado proliferativo [35, 37]. A proporção entre os dois fenótipos é alterada de acordo com as diferentes situações fisiológicas [13, 35]. O primeiro fenótipo mencionado anteriormente expressa um conjunto de marcadores característico deste tipo de células, como proteínas contrácteis e de citoesqueleto, entre as quais α -actina, cadeia pesada da miosina, calponina e proteína 22 α do músculo liso [33, 36, 37]. Estas proteínas desempenham um papel fundamental na principal função das CML, a contração da parede dos vasos sanguíneos [13, 33, 36]. No fenótipo sintético, a expressão destes marcadores é regulada negativamente, sendo esta a principal diferença entre os dois fenótipos, uma vez que a expressão de proteínas características deste fenótipo é rara [33, 35]. A morfologia apresenta-se também como um parâmetro importante no que diz respeito à definição dos dois fenótipos [13, 35]. As CML pertencentes ao fenótipo contráctil apresentam uma forma alongada, fusiforme, apresentando diversos filamentos contrácteis [13, 35, 36]. Por outro lado, o fenótipo sintético apresenta células menos alongadas, contendo um elevado número de organelos envolvidos na síntese proteica, ao invés dos filamentos apresentados no fenótipo contráctil [13, 35, 36]. Também a nível proliferativo e migratório, os dois fenótipos apresentam diferenças, com o fenótipo sintético a apresentar maior taxa de crescimento e atividade migratória que o fenótipo contráctil [35].

Como referido anteriormente, a principal função das CML é a contração, tendo como principal mediador o cálcio [13]. Este liga-se à calmodulina, criando o complexo cálcio/calmodulina que ativa a cadeia leve da miosina cinase, enzima que fosforila as cadeias leves da miosina, na presença de ATP [13, 38]. Esta fosforilação forma pontes cruzadas entre a cabeça da unidade de miosina e os filamentos de actina, criando a força necessária para a contração muscular [13, 38]. Uma vez que estes filamentos se encontrem acoplados à membrana celular, através do sistema viscoelástico, variações nestes filamentos levam a alterações na área celular e conseqüente relaxamento do vaso [13]. Estudos recentes afirmam que o 20-HETE é um importante mediador envolvido na contração cerebral [13, 39]. Estudos demonstram que os astrócitos libertam 20-HETE, que causa a inibição dos canais de potássio e conseqüente despolarização e contração das CML [13]. Recentemente, Mariana e colaboradores demonstraram que os astrócitos, em resposta à isquemia, libertam mediadores vasoativos que promovem o relaxamento das CML [22].

Microglia

Derivadas de precursores hematopoiéticos que migram do saco vitelino para o parênquima do SNC, a microglia desempenha um papel fundamental nas respostas imunes inatas [26]. Apesar de colonizarem o ambiente cerebral no início do desenvolvimento, estudos recentes demonstraram que após a deleção total de microglia do SNC, nichos de células precursoras de microglia tem capacidade de repovoar o cérebro e repor a homeostasia [40]. Estas células compreendem 12-16 % da população total do cérebro e devido à sua localização perivascular, patrulham o parênquima cerebral em busca de substâncias estranhas e de possíveis estímulos inflamatórios, atuando como a principal linha de defesa do ambiente cerebral após a BHE [26, 28]. Em condições fisiológicas, estas células possuem múltiplos processos que permitem a vigia de todo o parênquima cerebral [41]. Além disso, possuem pouca atividade e expressam diversos marcadores de superfície específicos de macrófagos, incluindo fator estimulador de macrófagos, glicoproteínas F4/80, integrina α M, recetor de fractalina, o recetor inibitório CD200R e a proteína intracelular de ligação ao cálcio [40]. Aquando da presença de um estímulo que promova a ativação microglial, estas células alteram a sua morfologia, passando de um formato ramificado para um formato ameboide [41]. Após a ativação, estas células podem expressar dois fenótipos distintos, sendo estes definidos consoante o tipo de doença, ou a severidade da lesão [41]. Quando ativadas pela via clássica (M1), normalmente em resposta a uma lesão aguda ou a um processo infeccioso, estas células gliais adquirem um fenótipo pró-inflamatório, libertando diversas citocinas (IL-1 β , IL-6 e TNF- α), quimiocinas (CCL2, CXCL1, MIP-1), radicais livres e ON [40, 41]. Quando ativada pela via alternativa (M2), a microglia está envolvida nos processos de cicatrização da lesão e na reposição da homeostasia cerebral [41, 42]. Deste modo, através da libertação de citocinas anti-inflamatórias (IL-4, IL-13, IL-10 e TGF- β), a microglia do fenótipo M2 são as principais células com capacidade para antagonizar as respostas pró-inflamatórias [41, 42]. Além disso, a microglia ativada pela via alternativa, pode também libertar fatores neurotróficos (tais como o fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1) capazes de cessar a resposta inflamatória, bem como promover a sobrevivência das células neuronais [42]. Não está ainda claro se existem diferenças morfológicas entre os dois fenótipos e se estes podem coexistir no mesmo ambiente [42]. No entanto, os dois fenótipos podem converter-se um no outro, em doenças neurodegenerativas tais como a doença de Parkinson (DP) e a esclerose lateral amiotrófica, dependendo dos estágios e da gravidade das doenças, de forma a fornecer o melhor benefício terapêutico [42].

Oligodendrócitos

Os oligodendrócitos são definidos como as células mielinizantes do SNC [43, 44]. Geradas a partir de células progenitoras de oligodendrócitos (CPO), estas células desempenham um papel fundamental no processo de mielinização, após várias etapas de proliferação, migração e diferenciação [43-45]. O cérebro apresenta diferentes regiões de onde as CPO derivam [44]. Estas células são caracterizadas pela expressão de elevados níveis de mRNA de DM-20, pelo que, através da utilização deste marcador, foram observadas três zonas distintas de desenvolvimento de CPO, sendo a expressão destas células desfasadas no tempo [44]. A primeira onda de CPO tem origem na zona ventricular média, seguida por uma segunda onda com origem na parte dorsal da zona ventricular [43, 44]. Por último, a terceira onda ocorre no córtex, após o nascimento [43, 44]. Apesar da formação de diferentes populações de CPO, todas estão envolvidas num processo de migração [43]. Três classes de moléculas aparentam estar relacionadas com a migração das CPO: fatores de crescimento como PDGF, FGF ou HGF; moléculas quimiotrópicas como netrinas e semaforinas; e a quimiocina CXCL1 [43]. Uma vez no local final, algumas CPO permanecem durante a idade adulta [43]. Nestes casos, estas células desempenham um papel fundamental no processo de remielinização [43]. As CPO dão origem a novos oligodendrócitos para que estes possam substituir os lesados, após a ocorrência de algum tipo de dano axonal [43]. No entanto, a maioria diferencia-se em oligodendrócitos produtores de mielina, iniciando assim a sua principal função no ambiente cerebral [43, 44]. A bainha de mielina é uma extensão dos oligodendrócitos que envolve os axónios de forma concêntrica [44, 46]. Esta estrutura isola eletricamente os axónios, facilitando a rápida transmissão dos potenciais do axónio [44, 46]. A formação desta membrana é regulada por diversos fatores, nomeadamente pela atividade do Ca^{2+} , bem como pela atividade neuronal, que identifica os axónios que devem ser mielinizados [44]. Devido à sua baixa capacitância, o potencial do axónio transita entre os nodos de Ranvier (pequenas porções de axónio não envolvidas pela bainha de mielina, onde estão localizados canais de sódio dependentes de voltagem que permitem a entrada de corrente despolarizante sob a forma de iões Na^+), num processo conhecido como “condução saltatória” [44, 47]. Isto culmina numa transmissão muito mais rápida do potencial de ação, devido à pouca energia necessária para despolarizar o axónio mielinizado [44, 47]. Para além do contributo na propagação do potencial de ação, os oligodendrócitos e a bainha de mielina suportam o metabolismo dos axónios [44, 48]. Estas células podem gerar lactato, que é posteriormente transferido para os axónios, através do transportador monocarboxilado-1 (MCT1), de forma a produzir energia sob a forma de ATP [44, 48]. Além disso, a bainha

de mielina expressa diversas enzimas como succinato desidrogenase e fumarase, que contribuem para o catabolismo da glucose e produção de ATP [44].

1.3. Ácido Retinóico

Há muito que se sabe que os derivados da vitamina A (retinoides) são necessários para o desenvolvimento e manutenção da visão, preservação de um estado diferenciado da pele, espermatogénese e manutenção da imunidade [49, 50]. Na fase embrionária estes derivados da vitamina A são essenciais para o correto desenvolvimento de diferentes órgãos e tecidos [49]. O ácido retinóico (AR) (Figura 3) é o principal derivado ativo da vitamina A (também denominada retinol) e desempenha um papel importante na diferenciação neuronal, como também no desenvolvimento e maturação da vasculatura cerebral [30, 51]. Níveis alterados de sinalização por parte desta molécula estão relacionados com a manifestação de sintomas relacionados com doenças neurodegenerativas, levando vários estudos a apontar esta molécula como uma possível terapêutica na prevenção e recuperação deste tipo de patologias [51, 52].

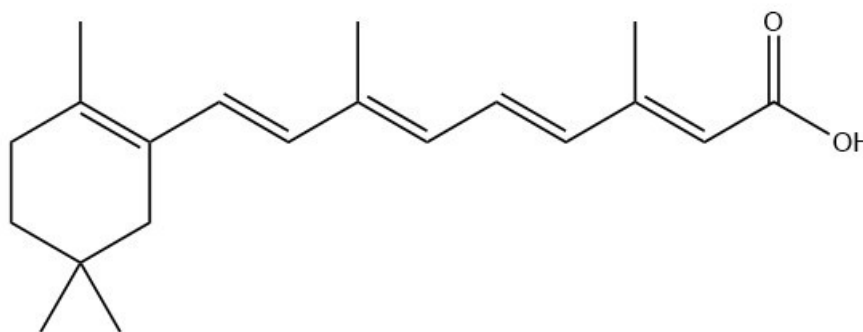


Figura 3. Estrutura química do AR. (AR – Ácido Retinóico)

1.3.1. Via de sinalização

O ser humano é incapaz de sintetizar vitamina A, pelo que a mesma é obtida através da dieta, sob a forma de carotenoides (provenientes de alimentos de origem vegetal) e de ésteres de retinil (provenientes de alimentos de origem animal) [51]. Estes derivados da dieta são armazenados como ésteres de retinil (também conhecidos como retinoides) no fígado, pulmão, medula óssea e rim [51]. O transporte destes retinoides para as células é realizado pelo retinol, o qual é libertado para a corrente sanguínea e circula ligado á proteína 4 de ligação ao retinol (RBP4) [49, 51]. O retinol é metabolizado pelas células alvo através de uma interação com um recetor membranar específico para a RBP4, o STRA6 [49, 51]. Após esta ligação o retinol entra no citoplasma, onde se liga à proteína 1 de ligação ao retinol (RBP1) e é metabolizado a AR em duas etapas [49, 51]. Na primeira

etapa ocorre a conversão de retinol a retinaldeído (Ral), através da enzima retinol desidrogenase 10 (RDH10) [49]. Na segunda etapa o Ral formado é convertido em AR pela retinaldeído desidrogenase (Raldh) [49]. Em diversos tipos de células, duas proteínas citoplasmáticas, denominadas proteínas celulares 1 e 2 de ligação ao AR (CRABP 1/2), ligam-se ao AR sintetizado [51]. Esta molécula, após sintetizada, possui duas vias de sinalização distintas. Assim, aquando da atuação parácrina, o AR é libertado do citoplasma, por mecanismos desconhecidos, e internalizado pelas células alvo [51]. No entanto, o AR pode também atuar de forma autócrina. Assim, esta molécula entra no núcleo das células, assistido pela CRABP2, ligando-se de seguida a um complexo de transcrição que inclui um par de fatores de transcrição ativados por ligando, que compreendem o recetor de AR (RAR) e o recetor retinoide X (RXR), formando um heterodímero [51]. Existem três genes RAR (RAR α , RAR β e RAR γ) e três genes RXR (RXR α , RXR β e RXR γ) [49, 51]. Este complexo liga-se depois a uma sequência de DNA, denominada de elemento de resposta do AR (RARE) [49, 51]. Após a ligação da molécula de AR ao complexo, e consequente ativação, esta molécula sai do núcleo e é degradada no citoplasma por enzimas da família 26 do citocromo P450 (CYP26) [51]. A figura 4 representa resumidamente a sinalização exercida pelo AR.

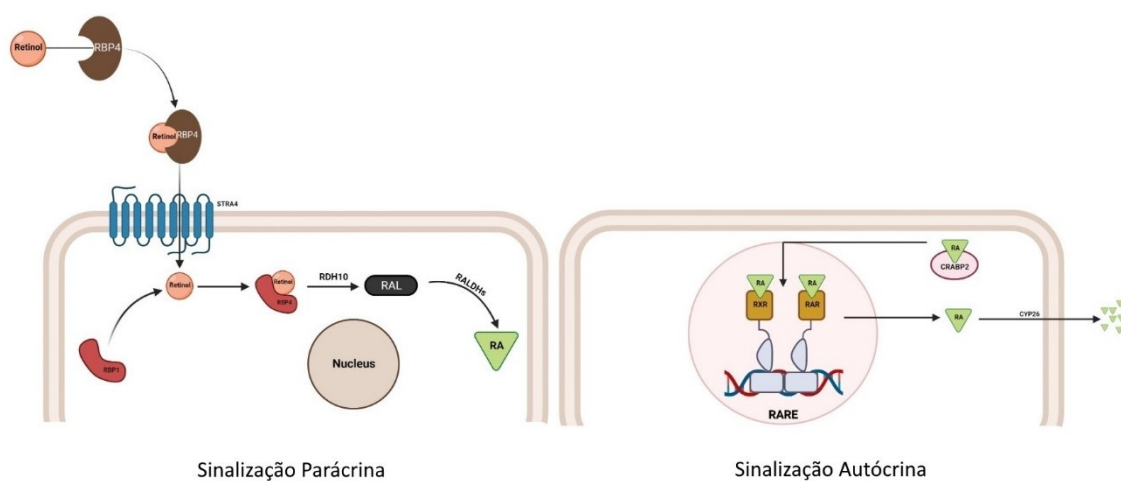


Figura 4. Via de sinalização do AR. O retinol libertado na corrente sanguínea circula ligado ao RBP4, entrando nas células alvo através da interação com a STRA6, um recetor de membrana para a RBP4. No citoplasma, o retinol liga-se ao RBP1 e é depois convertido a Ral pela RDH10. Após isto, retinaldeído é convertido em AR por três Raldh. O AR pode ser depois libertado do citoplasma e entrar em células vizinhas (sinalização parácrina) ou atuar a nível nuclear na célula onde foi produzido (sinalização autócrina). Nestes casos a CRABP2 auxilia a entrada do AR no núcleo, ligando-se de seguida a um complexo de transcrição composto pelo heterodímero formado pelos recetores RAR e RXR. Após esta ligação, este complexo associa-se a uma sequência de DNA denominada de RARE e ativa a transcrição de genes alvo. Após a atuação do AR, a enzima CYP26 degrada esta molécula em metabólitos polares. Criado com *BioRender.com* (AR – Ácido Retinóico; RBP4 – Proteína 4 de ligação ao retinol; STRA6 – Recetor de membrana para a RBP4; RBP1 – Proteína 1 de ligação ao retinol; Ral – Retinaldeído; RDH10 - Retinol desidrogenase 10; Raldh – Retinaldeído desidrogenase; CRABP2 – Proteína celular de ligação ao ácido retinóico 2; RAR – Recetor ácido retinóico; RXR – recetor retinoide X; RARE – Elemento de resposta ao ácido retinóico; CYP26 – Enzimas da família 26 do citocromo P450).

1.3.2. Efeito do ácido retinóico nas células da unidade neurovascular

Neurónios

O AR contribui para a diferenciação neuronal [51]. Estudos *in vitro*, utilizando linhas celulares de carcinoma embrional (P19) e de neuroblastoma, demonstraram que a utilização de doses elevadas de AR conduziu à diferenciação destas células em vários tipos de neurónios e células gliais [51]. O AR promoveu a transcrição de um elevado número de genes, incluindo alguns que codificam fatores de transcrição, moléculas de sinalização, proteínas estruturais e recetores de superfície [51]. Entre estas proteínas estão os fatores de transcrição BRN2, fator nuclear kB, STRA13, SOX1, SOX6 e neurogenina-1, as moléculas de sinalização citoplasmáticas proteína cinase C ϵ , ceramida, presenilina-1, a proteína associada ao microtúbulo-2, a molécula extracelular trombospondina, e componentes da WNT [51]. No entanto, algumas vias necessitam de ser antagonizadas de forma a possibilitar a diferenciação [51, 53, 54]. Uma destas é a tirosina fosfatase, que regula o nível de fosforilação dos resíduos de tirosina em diferentes proteínas intracelulares [51]. Outra é o inibidor da WNT *dickkopfhomologue 1* (DKK1), induzido pelo AR, permitindo assim o efeito do mesmo de forma a possibilitar a diferenciação das células estaminais [51, 53, 54]. As células estaminais embrionárias hematopoiéticas e neuronais podem ser assim diferenciadas em neurónios, usando AR, bem como combinações de AR e fatores de crescimento ou neurotrofinas [51]. Para além disso, vários tipos de células estaminais neuronais, diferenciadas com AR, sobreviveram e deram origem a neurónios quando enxertadas em diferentes zonas do cérebro adulto, como no estriado (para tratamento para a doença de Huntington ou da DP) e na zona subventricular (para tratamento do AVC) [51]. O AR controla também o número de neurónios primários formados em modelos de anfíbios e peixes [51]. Estes neurónios são os primeiros a ser desenvolvidos, formando circuitos que coordenam movimentos de escape, sendo deste modo cruciais para a sobrevivência [51]. Na presença de AR ou após a injeção de mRNA sintético que codifica RAR α e RXR β , o número de neurónios aumenta [51]. Por outro lado, a diminuição da sinalização realizada pelo AR, através da administração de um antagonista dos recetores RAR α e RAR β , reduziu o número de neurónios [51]. Este efeito do AR é possível devido à ativação de reguladores da neurogénese (X-ngnr-1, Gli3 e X-MyT1) e à diminuição dos reguladores negativos da mesma (Zic2) [51].

Assim, podemos concluir que o AR desempenha um papel importante no processo de neurogénese durante o desenvolvimento embrionário, bem como na manutenção de neurónios adultos num estado diferenciado.

Astrócitos

Os astrócitos são a maior fonte de AR no SNC, isto é, produzem AR, contribuindo assim para a formação de neurónios a partir de células estaminais embrionárias [55]. Para além disso, a aplicação exógena de AR promove a diferenciação glial de células estaminais, devido à indução da expressão da proteína glial fibrilar acídica em linhas celulares de glioblastoma [55]. Este derivado da vitamina A parece também desempenhar um papel importante no correto funcionamento dos astrócitos no que à manutenção da BHE diz respeito [56]. Estas células gliais libertam diversos fatores que atenuam a permeabilidade da BHE, nomeadamente a apolipoproteína E (ApoE), uma proteína envolvida no transporte de colesterol no cérebro [56, 57]. Uma vez que o colesterol é um elemento fundamental das membranas e da bainha de mielina, a ApoE desempenha um papel muito importante na manutenção da plasticidade sináptica e da função neuronal [57]. O AR promove um aumento da expressão de ApoE, através dos recetores RAR e RXR, bem como dos níveis de expressão de transportadores cassete de ligação a ATP, associados ao transporte de colesterol, contribuindo para uma diminuição da formação das placas de beta-amiloide (β A), o evento central da doença de Alzheimer (DA) [57].

Além disso, o RA aparenta modular também a resposta inflamatória mediada pelos astrócitos [58, 59]. A ocorrência de uma lesão ao nível do SNC é normalmente acompanhada pela libertação de diversos fatores inflamatórios que, em última instância, comprometem a viabilidade dos neurónios e a integridade da BHE [58]. Estas células gliais, são responsáveis pela libertação de alguns desses fatores, entre os quais quimiocinas (CCL2, CCL3, CCL5, CXCL1 e CXCL2) e citocinas (IL-1 β , IL-6, IFN γ e TNF α) [58, 59]. Em culturas corticais de astrócitos, previamente tratadas com lipopolissacarídeos (LPS) de forma a estimular a inflamação, a utilização de AR reduziu consideravelmente a expressão destes fatores inflamatórios [58, 59]. Além disso, este derivado de vitamina A modula também a produção de prostanóides, como PGE2, consoante o estado inflamatório [59]. Assim, a utilização de AR pode reduzir a expressão de prostanóides em contexto patológico [59]. No entanto, o AR pode também estimular a expressão destes fatores influenciando assim diversas funções fisiológicas como o controlo do fluxo sanguíneo, devido ao efeito vasodilatador de alguns prostanóides, como PGE2 e EET [59, 60].

Deste modo, a suplementação com AR pode apresentar benefícios terapêuticos, nomeadamente no tratamento da DA, devido à influência do mesmo na *clearance* das placas de β A. Além disso, esta molécula apresenta também um potencial terapêutico no

tratamento de lesões ao nível do SNC, nomeadamente em situações de isquemia, devido ao seu efeito anti-inflamatório.

Células Endoteliais

Como referido anteriormente, as CE expressam recetores Frizzled, demonstrando elevada atividade de transcrição e conseqüente expressão de proteínas da WNT [30]. O AR é um importante regulador do desenvolvimento vascular a nível cerebral controlando a WNT [30, 31]. Para além disso, através da antagonização dos inibidores desta via de sinalização, tais como DKK1 e Sfrp, o AR cria um ambiente permissivo para o crescimento vascular [30]. No entanto, um estudo realizado por Bonney e colaboradores demonstrou que a molécula de AR inibe a sinalização endotelial da WNT [31]. Em ratos onde a ação do AR foi inibida, a sinalização endotelial da WNT foi elevada, culminando em vasos hiperplásticos com pequenas hemorragias, demonstrando um papel específico por parte do AR nas CE, através da inibição desta via de sinalização [31]. Esta ação por parte do AR foi recentemente demonstrada, uma vez que a ligação desta molécula ao recetor RAR α inibe a sinalização da WNT, direcionando a β -catenina para a degradação e impedindo assim a sua sinalização [30]. Na ausência do ligando e da sua respetiva via de sinalização, a β -catenina é fosforilada, nos resíduos Ser33, Ser37 e Thr41, através da proteína cinase C α (PKC α). Desta forma, a β -catenina é conduzida para degradação proteassomal, impedindo assim a sua translocação para o núcleo de forma a ativar a transcrição mediada por esta via de sinalização [30, 31]. Esta inibição da WNT, por parte do AR, define, aparentemente, o nível de sinalização adequado por parte da interação PDGF-B-PDGFr β , permitindo a correta associação entre os pericitos e as CE, associação essa necessária para a manutenção da estabilidade dos vasos sanguíneos [30]. Deste modo, o AR apresenta-se como um indutor potente das propriedades da BHE em culturas celulares de CE [30]. A sua administração promove também a expressão de proteínas aderentes (como VE-caderninas) e oclusivas (como ocludinas), impedindo o movimento paracelular de moléculas entre CE [30]. A molécula de AR apresenta também um papel importante no controlo do FSC, aumentando a síntese de ON por parte das CE, modulando a produção do inibidor da sintase do ON [61]. Não obstante, Uruno e colaboradores demonstraram a indução da produção de ON, por parte do AR, através da fosforilação da eNOS com recurso ativação da via de sinalização fosfatidilinositol-3-cinase/proteína cinase B (PI3K/Akt), mediada pelos recetores RAR [61].

Assim, podemos concluir que o AR desempenha um papel fundamental na viabilidade da BHE, através do auxílio na manutenção da integridade dos vasos sanguíneos, bem como no correto funcionamento das junções presentes na barreira, apresentando-se assim como

Efeito do ácido retinóico no acidente vascular cerebral.

uma excelente alternativa terapêutica no tratamento de lesões cerebrais que comprometem o estado e a função da BHE.

Pericitos

Como referido anteriormente, a WNT é fundamental para o crescimento e desenvolvimento da vasculatura cerebral [30, 31]. Um dos efeitos desta via de sinalização é o recrutamento de pericitos para a vasculatura cerebral (através da regulação do fator PDGF-B que posteriormente se liga ao PDGFr β , expresso na superfície dos pericitos) [30]. Este recrutamento permite que os pericitos interajam com o tecido endotelial, sendo cruciais na manutenção da integridade vascular, providenciando suporte para a BHE [30, 31]. Apesar da extrema importância destas células na vasculatura cerebral, um aumento excessivo do número de pericitos pode traduzir-se numa diminuição da estabilidade vascular [31]. Deste modo, a WNT necessita de ser regulada de forma a manter o correto recrutamento de pericitos para o ambiente vascular [31]. O AR pode modular esta via de sinalização através da diminuição da expressão da proteína β -catenina, prevenindo deste modo a estimulação excessiva da sinalização PDGFB-PDGFr β [30]. Estudos em ratos com deficiência na sinalização por parte do AR demonstraram um perfil de sinalização da WNT elevado, traduzindo-se esse facto numa expressão elevada da proteína β -catenina [31]. Este excesso na expressão conduziu a um aumento da sinalização PDGFB-PDGFr β e consequente aumento do número de pericitos em torno da vasculatura [31]. Através da sua ligação ao recetor RAR α , o AR promove a fosforilação da β -catenina, nos resíduos de Ser33, Ser37 e Thr41 via PKC α , sinalizando a mesma para degradação proteassomal e impedindo, assim, a sua translocação para o núcleo de forma a ativar a atividade transcricional inerente à WNT [30, 31]. Para além disso, estudos sugerem que o AR possa também suprimir a transcrição do gene *Ctnnb1* que codifica a proteína β -catenina [31, 62].

Assim, podemos concluir que o AR desempenha um papel fundamental na definição do nível correto de recrutamento de pericitos. Através do controlo da WNT, o AR permite que estas células se fixem à vasculatura, onde libertam diversos fatores, garantindo assim a viabilidade da vasculatura cerebral.

Células Musculares Lisas

O crescimento, diferenciação e migração das CML têm um papel muito importante na resposta a uma lesão vascular [61]. Durante as primeiras etapas da lesão vascular, as CML da túnica média migram para a túnica íntima, onde promovem a deposição de matriz extracelular [61]. Deste modo, a mudança entre fenótipo contráctil e fenótipo sintético é apontada como a alteração principal na resposta arterial a uma lesão [61]. O AR modula o comportamento das CML, aumentando a expressão de plasminogénio ativador tecidual (tPA), um agonista da migração celular, promovendo assim a migração das CML [61]. No entanto, outros estudos apontam para uma diminuição da migração das CML, aquando da utilização de AR [63]. Estes resultados contraditórios demonstram a complexa regulação das respostas vasculares após lesão [61]. Por outro lado, o AR modula o comportamento e a função das CML, aumentando a expressão do complexo major de histocompatibilidade, um marcador do fenótipo contráctil, bem como de α -actina [61, 64]. Além disso, o AR inibe a atuação de antagonistas da função contráctil, sugerindo assim que a administração deste metabolito da vitamina A contribui para a manutenção do fenótipo contráctil destas células, auxiliando deste modo a regulação do FSC [61]. O AR controla também a proliferação das CML, outro fator muito importante na resposta à lesão vascular [61]. Esta molécula aparenta também desempenhar uma ação limitante no que diz respeito à proliferação das CML [61]. Induzindo a acetilação do fator de transcrição Klf4, esta molécula promove a capacidade deste fator transativar a expressão da mitofusina-2, uma proteína mitocondrial de fusão capaz de limitar a proliferação destas células [61, 62, 65]. Esta limitação impede o desenvolvimento de potenciais doenças a nível vascular, uma vez que o efeito anti-proliferativo impede a remodelação vascular [61, 62, 65]. Outros estudos apontam que o efeito anti-proliferativo do AR aparenta estar também relacionado com alteração da expressão de proteínas proliferativas tais como ciclinas (D1, D3, A2) e cinases dependentes de ciclinas (CDK2, CDK4, CDK6) [62]. Apesar deste facto, o AR apresenta efeitos distintos e complexos no que à regulação da proliferação diz respeito [63]. A utilização desta molécula em CML, num ambiente desprovido de quaisquer fatores de crescimento, levou a um aumento do número destas células [61]. No entanto, na presença de fatores mitogénicos, o efeito do AR é contrário, conduzindo à inibição da proliferação [61].

Assim, podemos concluir que a utilização de AR suprime a proliferação e a migração das CML, podendo deste modo a administração de AR apresentar um benefício terapêutico no sentido de inibir fenómenos de hiperplasia e, a nível cerebrovascular, contribuir ativamente para a diminuição do risco de AVC.

Microglia

Como referido anteriormente ativação do fenótipo M1 da microglia tem como principal característica a libertação de diversos fatores pró-inflamatórios [66]. No entanto, estes fatores causam toxicidade às células do SNC, exacerbando algumas doenças neurodegenerativas [66-68]. O AR desempenha um papel muito importante na modulação da resposta inflamatória por parte da microglia [67]. Atuando através do RXR, esta molécula inibe a atuação de LPS, regulando negativamente a produção de TNF- α e IL-1 β , bem como a produção de ON por parte da microglia [68]. Para além de modular a resposta inflamatória, o AR demonstra capacidade de induzir o fenótipo M2, promovendo a expressão de IL-4, uma citocina indutora da ativação da microglia pela via alternativa e de Arg-1, um mediador anti-inflamatório altamente expresso no fenótipo M2 [69]. Além disso, a utilização de AR encapsulado em nanopartículas poliméricas permite a alteração morfológica entre os dois fenótipos [69]. Assim, microglia com corpos celulares aumentados e processos microgliais reduzidos e curtos, dão origem a microglia de pequenas dimensões com elevado número de processos microgliais, após o tratamento com AR [69].

Deste modo, devido à capacidade de antagonizar a produção de mediadores inflamatórios e de regular a expressão do fenótipo imunomodulador da microglia, a utilização de AR apresenta um enorme potencial terapêutico, uma vez que a inflamação cerebral é um fator de risco para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, tais como esclerose múltipla (EM), DA, DP e AVC isquémico.

Oligodendrócitos

Os oligodendrócitos são reconhecidos como reguladores extremamente importantes das funções neuronais, homeostasia e regeneração ao nível do SNC [44]. A existência de uma disfunção ou de uma falha na ação destas células está diretamente envolvida no desenvolvimento de diversas doenças ao nível do SNC como é o caso da EM [70]. As células estaminais neurais (CEN) tem despertado o interesse como uma possível terapêutica para estas doenças desmielinizantes [70]. Para além disso, diversos estudos em modelos animais demonstraram uma recuperação da função neurológica após o transplante destas células [70]. Este potencial terapêutico está maioritariamente relacionado com a capacidade de diferenciação e proliferação que as CEN apresentam, podendo assim apresentar capacidade para substituir células lesadas, potenciando deste modo a recuperação de áreas do SNC afetadas [70, 71]. A molécula de AR, para além de promover o crescimento axonal e a padronização neuronal do ambiente cerebral em

desenvolvimento, estimula a diferenciação neuronal, sendo utilizada *in vitro* de forma a induzir a diferenciação de diversas populações de células estaminais incluindo CEN [51, 70]. Assim, o AR pode desempenhar um papel fundamental na formação de CPO e consequente contribuição para a substituição de oligodendrócitos que apresentem danos, bem como para a mielinização de axónios lesados [51, 70]. Um estudo de Carradori e colaboradores desenvolveu uma nanocápsula lipídica, encapsulada com AR, com capacidade de penetrar seletivamente a zona subventricular, onde se localizam alguns nichos neurogénicos de CEN [70]. O encapsulamento com AR promoveu a diferenciação das CEN em células de linhagem oligodendrocítica, *in vitro*, bem como a oligodendrogénese e consequente remielinização dos axónios, após indução de lesão na bainha de mielina em modelos animais [70]. Morrison e colaboradores evidenciaram também a importância do AR na formação e diferenciação de CPO [71]. A deleção da enzima Raldh não só conduziu a uma diminuição do número de CPO formadas, como também contribuiu para um decréscimo da diferenciação das mesmas em oligodendrócitos maduros [71]. Um estudo de Huang e colaboradores demonstrou que o RXR γ é ativamente expresso após a indução de lesão ao nível da mielina, apontando o aumento da expressão deste recetor como um indicador fisiológico de lesão ao nível do SNC [72]. Além disso, aquando da utilização de antagonistas específicos deste recetor em culturas celulares, foi observada uma diferenciação ineficiente dos oligodendrócitos [72]. Tal facto demonstrou que este recetor apresenta um papel regulador importante no processo de remielinização [72]. Este recetor promove também a transcrição do gene que codifica a proteína básica de mielina, altamente expressa em oligodendrócitos maduros ou produtores de mielina [72, 73].

Deste modo, a utilização de AR apresenta-se como uma terapêutica bastante promissora para a remielinização de axónios lesados do CNS, impedindo assim o comprometimento dos mesmos e possível degeneração.

1.4. Acidente Vascular Cerebral

1.4.1. Epidemiologia do Acidente Vascular Cerebral

O AVC é considerado a segunda causa de morte mais comum a nível global, afetando cerca de 13,7 milhões de pessoas por ano e conduzindo à morte de aproximadamente 5,5 milhões [74]. Nas últimas décadas, a incidência do AVC tem aumentado nos países em desenvolvimento, ao invés do que acontece nos países desenvolvidos, onde o número de episódios de AVC tem decrescido [74]. No entanto, apesar do decréscimo na prevalência de AVC, a faixa de idades, o género e a localização geográfica demonstram que os custos associados a esta lesão aumentaram nos últimos anos [74]. A nível económico, são gastos,

em contexto europeu, cerca de 64,1 biliões de euros, anualmente, no combate a esta patologia [75].

O risco de ocorrência deste tipo de lesão cerebrovascular tende a aumentar com a idade, duplicando a partir dos 55 anos de idade [74]. No entanto, o fator idade tem causado alarme, uma vez que a prevalência de AVC na faixa etária entre os 20 e os 54 anos de idade aumentou 5,7 % entre 1990 e 2016 [74]. A idade é também importante quando se pretende relacionar a incidência deste tipo de lesão cerebrovascular em função do género [74]. Em idades mais jovens a ocorrência de AVC é predominante no sexo feminino, enquanto no sexo masculino a incidência desta lesão cerebrovascular tende a aumentar com a idade [74]. O risco de desenvolvimento de AVC em pessoas do sexo feminino é maioritariamente relacionado com fenómenos associados à gravidez, como o desenvolvimento de pré-eclampsia, uso de métodos contraceptivos e o recurso a terapia hormonal [74]. No que ao sexo masculino diz respeito, o tabagismo, o consumo excessivo de álcool e a presença de doenças arteriais apresentam-se como as principais causas de desenvolvimento desta lesão [74]. A incidência do AVC varia também de acordo com a etnia, sendo a prevalência desta lesão de 6,0% entre populações índio-americanas, 4,0% entre populações de raça negra, 2,6% entre latinos, 2,3% entre populações de raça branca e cerca de 1,6% entre populações asiáticas [76]. Também a zona geográfica aparenta ter influência no risco de desenvolvimento de AVC, uma vez que regiões que apresentam elevada poluição atmosférica contribuem ativamente para a mortalidade devido à ocorrência de um AVC [74]. Por último, o ponto de vista económico é também um fator importante na incidência deste tipo de lesão cerebrovascular, existindo uma relação direta entre o risco de ocorrência de AVC e as baixas possibilidades económicas da população, traduzindo-se este facto em condições de saúde desajustadas [76]. Entre estas incluem-se o conhecimento insuficiente acerca da sintomatologia do AVC, falta de administração de tratamento apropriado e instalações hospitalares com poucos recursos [77]. Deste modo, estes entraves impossibilitam, muitas vezes, a utilização de dois recursos essenciais no tratamento urgente, como é o caso da tomográfica computadorizada e dos agentes trombólitos [77].

1.4.2. Patofisiologia do Acidente Vascular Cerebral

O AVC é definido como um rápido défice neurológico, devido à interrupção da perfusão cerebral [74, 76]. Esta interrupção culmina no entupimento de artérias, causando o comprometimento dos vasos sanguíneos e possível sangramento, levando à morte das células do ambiente cerebral devido à falta de oxigénio [74]. Este tipo de lesão cerebrovascular pode ser descrita como isquémica (aquando da oclusão do vaso sanguíneo) ou hemorrágica (na presença de rotura do vaso sanguíneo) (Figura 5) [76].

Cerca de 85% dos episódios de AVC dizem respeito a oclusões isquémicas, sendo estas maioritariamente causadas por doença aterosclerótica, formação de trombos, ou oclusão de pequenos vasos sanguíneos [76, 78]. Perto de 45% dos casos de AVC isquémico são causados pela presença de placas de aterosclerose nas artérias cerebrais, levando à diminuição da área dos vasos sanguíneos e consequente decréscimo do fluxo sanguíneo [74, 79]. O desenvolvimento de um AVC isquémico pode também ter origem num fenómeno cardioembólico [78]. Este tipo de acidente cerebrovascular contabiliza cerca de 14-30% dos episódios de oclusões isquémicas, sendo causado por uma interrupção do fluxo sanguíneo devido à presença de um trombo normalmente proveniente do coração [80]. O AVC isquémico pode também ser do tipo lacunar, sendo caracterizado pela presença de uma obstrução, com menos de 15 mm de diâmetro, localizada em vasos de pequeno calibre, como é o caso das arteríolas que penetram o interior do cérebro [81]. Este tipo de lesão isquémica representa cerca de 15-25% do total de oclusões [74].

No que diz respeito ao AVC do tipo hemorrágico, este é responsável por 10-15% dos episódios totais de AVC estando associado a uma elevada taxa de mortalidade [74]. Este tipo de lesão pode ser classificada em hemorragia intracerebral (HI) ou hemorragia subaracnoide (HS) [74, 76]. No AVC causado por HI, dá-se uma rutura dos vasos sanguíneos, causando um aumento anormal de sangue no interior do cérebro [74]. Fenómenos como hipertensão, uso excessivo de anticoagulantes ou de agentes trombolíticos podem potenciar a disrupção dos vasos sanguíneos, culminando num aumento de sangue no interior do cérebro [74]. No AVC causado por HS, o sangue acumula-se no espaço subaracnoide devido à ocorrência de uma lesão traumática ou de um aneurisma cerebral [74]. Além destes dois tipos de AVC, pode também ocorrer um outro tipo de fenómeno, denominado de ataque isquémico transitório (AIT) [74]. Um AIT define-se com uma disfunção cerebral numa área circunscrita devido a uma redução temporária do fluxo sanguíneo (com duração máxima de 24 horas), resultando em sintomas transitórios e com consequências menos gravosas por comparação com um AVC isquémico ou hemorrágico [76, 82]. No entanto, a ocorrência de um AIT pode ser considerado um indicador de possível desenvolvimento de AVC, uma vez que 10 % dos pacientes que sofreram um AVC desenvolveram um AIT nos 90 dias precedentes [76, 83].

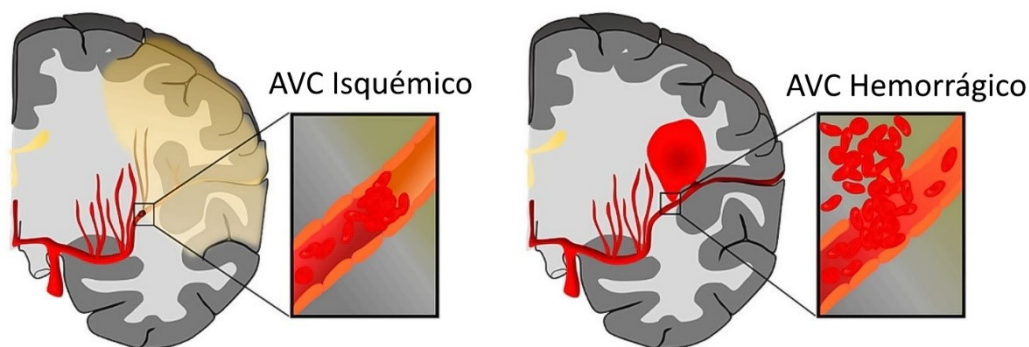


Figura 5. Representação de um AVC isquêmico e de um AVC hemorrágico. No AVC isquêmico existe a oclusão do vaso sanguíneo devido à presença de um coágulo, enquanto no AVC hemorrágico existe a ruptura de um vaso sanguíneo com extravasamento de sangue para o interior do cérebro. (AVC - Acidente Vascular Cerebral) Adaptado de [84].

1.4.3. Tratamento do Acidente Vascular Cerebral

O tratamento do AVC envolve a modulação dos fatores de risco que potenciam a ocorrência deste tipo de lesão, o combate à sua fisiopatologia perante tal quadro clínico e, por último, a prevenção da reincidência deste tipo de lesão cerebrovascular [74, 78]. Os fatores de risco estão associados a cerca de 90% de risco de desenvolvimento de AVC, sendo deste modo fundamental identificar e controlar estes fatores de forma a prevenir a ocorrência deste tipo de lesão [78]. Estes fatores dividem-se em modificáveis e não-modificáveis, sendo os primeiros aqueles que captam maior atenção, uma vez que podem ser modulados de forma a reduzir o risco de desenvolvimento de um quadro de AVC [74, 78]. Entre estes evidenciam-se fatores como hipertensão, hiperlipidemia, hábitos tabágicos e obesidade [78]. A hipertensão é considerada o fator de risco mais importante para a eficiente prevenção deste tipo de lesão cerebrovascular, uma vez que mais de metade dos casos de AVC a nível mundial são atribuídos a este fator [74, 78]. Deste modo, a utilização de beta bloqueadores (como o labetamol), fármacos bloqueadores dos canais de cálcio (como a nicardipina) e inibidores da enzima conversora da angiotensina (como o enalapril) são utilizados para controlar a pressão arterial [74, 78, 85]. Também os níveis elevados de colesterol total potenciam a ocorrência de episódios de AVC [78]. Diversos estudos demonstraram que a utilização de estatinas reduziu o número de complicações vasculares [78]. No entanto, é ainda controverso determinar quando iniciar tratamento com recurso aos respetivos fármacos, pelo que, todos os pacientes com hiperlipidemia são encorajados a vigiar o seu peso, bem como a adotar uma dieta saudável aliada à prática de exercício físico [5, 78]. Os hábitos tabágicos contribuem também para o desenvolvimento de lesões cerebrovasculares, com um aumento do risco de lesão isquémica ou hemorrágica

dependente do consumo [78]. A cessação do consumo de tabaco diminui o risco de complicações vasculares, pelo que a substituição de tabaco por outras fontes de nicotina, bem como o recurso a terapia são as principais estratégias para o controlo deste fator de risco [78]. Para além destes indicadores, também a obesidade é um fator de risco para o desenvolvimento de um AVC [78]. O tratamento da obesidade prende-se essencialmente por alterações na rotina dos pacientes, nomeadamente no tipo de alimentação e na prática de exercício físico [78].

No que diz respeito ao tratamento de um quadro de AVC isquémico, a janela de tempo para efetuar o tratamento é fundamental para impedir sequelas [78]. A terapêutica mais comum é a administração intravenosa de tPA (como Alteplase®) de forma a promover a dissolução do coágulo responsável pela oclusão do vaso sanguíneo [74, 79]. Este fármaco aparenta melhorar o quadro clínico quando administrado entre 3-4,5 horas após o início do AVC isquémico [79]. A trombólise intra-arterial apresenta-se também como outra terapêutica desenhada para combater o AVC isquémico, apresentando uma efetividade de tratamento por um período de 6 horas após a ocorrência da oclusão [5, 74]. Para além destas terapêuticas, outras estão a ser testadas em ensaios clínicos, entre as quais a combinação entre agentes trombolíticos e antagonistas da glicoproteína IIb/IIIa, tendo este ensaio demonstrado maior eficácia para oclusões ateroscleróticas, e menor para oclusões cardioembólicas [74]. Quanto ao tratamento de um quadro de AVC hemorrágico, as abordagens são diversas, prendendo-se essencialmente pela tentativa de redução da pressão intracraniana com recurso a diuréticos (como o manitol), tratamento hemostático através da utilização de fator recombinante de coagulação VII e concentrados de protrombina, existindo também a necessidade frequente de recurso a cirurgia [85].

Para além disto, também depois da ocorrência de um AVC existem terapêuticas necessárias, não só de reabilitação, como também de prevenção, uma vez que a maioria dos pacientes que sobrevivem a um primeiro AVC, apresentam alto risco de desenvolver novamente este tipo de lesão [74]. Assim, neste tipo de casos, é recorrente a utilização de fármacos anti plaquetários (como Aspirina®) com o intuito de prevenir a formação de novos coágulos [74, 78]. No entanto, para além da terapêutica, também a identificação da etiologia do AVC é fundamental, visto que permite o desenho de terapêuticas mais personalizadas [78]. Também no AVC do tipo hemorrágico existe a possibilidade de voltar a desenvolver tal tipo de lesão [85]. Assim, o controlo da pressão sanguínea é um fator extremamente importante na prevenção de um novo quadro de AVC hemorrágico [85]. Além disso, a modificação do estilo de vida é fundamental, nomeadamente no que diz respeito ao consumo de álcool e tabaco [85].

Efeito do ácido retinóico no acidente vascular cerebral.

Apesar de vários tipos de tratamento, a maioria apresenta uma janela de tempo estreita para providenciarem benefício terapêutico, sendo úteis para um reduzido número de pacientes [75]. Além disso, a administração de agentes trombolíticos pode causar hemorragia cerebral e outros efeitos relevantes, sendo deste modo necessário equacionar outro tipo de terapêuticas que se revelem mais inclusivas focando principalmente a unidade neurovascular [75].

2. Objetivos

O AVC é uma das principais causas de morte e de invalidez a nível global, causando diversas alterações a nível celular e molecular que comprometem a viabilidade do ambiente cerebral. Este tipo de lesão afeta consideravelmente os vasos sanguíneos, conduzindo a uma diminuição do fluxo sanguíneo para as diferentes áreas cerebrais. As CML desempenham um papel fundamental na regulação do tónus vascular e conseqüentemente na homeostasia cerebral. No decurso de algumas condições patológicas, como o AVC, a viabilidade destas células fica comprometida o que pode ser prejudicial na recuperação. Além disso, a ocorrência deste tipo de lesão cerebrovascular pode conduzir à libertação de diversos fatores que modificam a sinalização existente entre as células gliais e as células vasculares, alterando tanto os processos de vasoconstrição, como os processos de vasorelaxamento devido a fatores ainda desconhecidos.

Deste modo, o principal objetivo deste trabalho é analisar o efeito do AR, um metabolito ativo da vitamina A com propriedades vasoativas e anti-inflamatórias, na regulação vascular mediada pelos neurónios e astrócitos após estes serem submetidos a condições de isquemia. Assim, este trabalho pretende determinar se o AR é benéfico na recuperação de um AVC.

De forma a atingir este objetivo principal foi proposto:

- Obter cultura de CML da ACM (CML-ACM) de rato Wistar.
- Analisar a resposta das CML-ACM à NA, após incubação com os meios de reperfusão de co-culturas de neurónios e astrócitos incubados com diferentes concentrações de AR.
- Analisar a resposta das CML-ACM ao SNP, após incubação com os meios de reperfusão de co-culturas de neurónios e astrócitos incubados com diferentes concentrações de AR.

3. Materiais e Métodos

3.1. Incubação com ácido retinóico de culturas celulares de neurónios e astrócitos posteriormente sujeitas a privação de oxigénio e glucose

O método utilizado para obtenção de culturas celulares foi baseado num modelo estabelecido por Roque e colaboradores [86], tendo estas sido realizadas por Emanuel Farinha, no âmbito da tese de mestrado. Resumidamente, embriões de fêmeas Wistar (com 15 dias de vida) foram retirados, através da cavidade abdominal, e decapitados tendo as células corticais sido isoladas de acordo com Roque e colaboradores [86]. Os córtices foram de seguida cortados em pequenas porções, tendo estes sido colocadas em tampão fosfato salino (PBS) (Tabela 1). Seguidamente o tecido foi dissociado mecanicamente e centrifugado a 400 x g, durante 3 minutos, tendo o *pellet* sido ressuscitado em meio Neurobasal [(NBM; Gibco) suplementado com 2% de B27 (Gibco), 0,5 mM de glutamato (Sigma), 0,5 mM de glutamina (Sigma), 120 µg/mL de gentamicina (Sigma) e 10% de soro fetal de bovino (FBS)] e colocado em placas de cultura de 24 poços previamente revestidas com poli-D-lisina. As células foram mantidas numa incubadora a 37° C numa atmosfera de 95% de ar atmosférico e 5% de CO₂. Após 4 dias em cultura, o meio foi renovado, tendo-se iniciado os ensaios experimentais no sexto dia de cultura. Vinte e quatro horas antes da exposição destas culturas a privação de oxigénio e glucose (OGD), o meio de cultura foi substituído por NBM sem soro, tendo as células sido incubadas com diferentes concentrações de AR (0,1 µM, 1 µM, 5 µM e 10 µM). As culturas primárias de neurónios e astrócitos foram posteriormente sujeitas a OGD, sendo usadas como modelo de AVC isquémico. Estas células foram lavadas duas vezes e de seguida incubadas com solução salina tamponada de Hank (HBSS) (HBSS; 1,26 mM CaCl₂, 5,36 mM KCl, 0,44 mM KH₂PO₄, 0,49 mM MgCl₂, 139,9 mM NaCl, 4,17 mM NaHCO₃, 3,38 mM Na₂HPO₄, pH = 7,4). As células submetidas a OGD foram colocadas numa câmara de hipóxia (*Stemcell Technologies*), com uma atmosfera de 95% N₂ e 5% de CO₂, tendo esta sido colocada numa incubadora, a 37°C, durante 4 horas. Simultaneamente, o grupo controlo (HBSS + Glucose) foi lavado duas vezes e incubado com HBSS suplementado com 5,56 mM de glucose e colocado, durante o mesmo período de tempo, numa incubadora a 37° C com uma atmosfera de 95% de ar atmosférico e 5% de CO₂. Após este período de tempo, as co-culturas foram retiradas da incubadora e o meio de reperfusão foi obtido através da substituição de HBSS por NBM. As células foram mantidas na incubadora com uma atmosfera de 95% de ar atmosférico e 5% de CO₂, a 37°C, por mais 20 horas. Após este

período de tempo, o meio condicionado por estas co-culturas foi recolhido e armazenado a -80°C .

3.2. Cultura celular de células musculares lisas

Todos os animais utilizados na preparação da cultura celular foram tratados respeitando todos os requisitos éticos de pesquisa animal, convenção europeia para a proteção dos animais vertebrados utilizados para fins experimentais ou de outro tipo de propósito científico (Decreto-Lei nº 113/2013). O método de cultura utilizado foi baseado num modelo estabelecido por Quelhas e colaboradores para isolamento de CML-ACM [37]. Machos Wistar foram anestesiados (quetamina 87,5 mg/Kg e xilazina 12,5 mg/Kg) e de seguida decapitados. Através da utilização de material cirúrgico, o cérebro foi removido e colocado numa placa de Petri contendo PBS (1400 mM de NaCl, 81 mM de Na_2HPO_4 , 27 mM de KCl e 15 mM de KH_2PO_4 , pH 7,4) (Tabela 1). De seguida foi realizado o explante das ACM, tendo estas sido colocadas também em PBS. As artérias foram posteriormente colocadas numa placa de cultura de 6 poços, previamente revestida com colagénio ($5\mu\text{g}/\text{cm}^2$) e colocadas, durante 3 minutos, na incubadora a 37°C numa atmosfera de 95% de ar atmosférico e 5% de CO_2 . Após este tempo, foi adicionado 1 mL de meio de cultura completo [MCC; DMEM-F12 suplementado com soro fetal bovino (FBS – 5%), Albumina de soro bovino (BSA - 0,5%), fator de crescimento epidérmico (EGF, $5\mu\text{g}/\text{mL}$), fator de crescimento fibroblástico (FGF, $0,5\text{ ng}/\text{mL}$), heparina ($2\mu\text{g}/\text{mL}$), insulina ($5\mu\text{g}/\text{mL}$) e SAA (1%), pH 7,4] (Tabela 1). Após 24h foi adicionado novamente 1 mL de MCC. O meio de cultura foi posteriormente renovado a cada 2 dias, tendo estas culturas atingindo a confluência após 15-20 dias. Subculturas destas células foram preservadas até à quarta passagem.

3.3. Ensaio de *Planar Cell Surface Area*

O estudo de contractilidade celular através da técnica de *Planar Cell Surface Area* (PCSA) foi baseado num protocolo previamente descrito por Mariana e colaboradores [87] e Quelhas e colaboradores [37]. De forma a realizar este ensaio foi necessário que as CML entre a terceira e a quarta passagem atingissem a confluência, tendo sido posteriormente colocadas em meio de cultura sem soro (MSS) (Tabela 1), durante 24 horas. Após este período de tempo, o MSS foi retirado e as células foram incubadas com meios condicionados por co-culturas de neurónios e astrócitos, previamente expostas a diferentes concentrações de AR, sujeitas e não sujeitas a OGD, durante 24 horas. Após este tempo de incubação, as células foram tripsinizadas e plaqueadas em caixas de Petri, previamente revestidas com $5\mu\text{L}$ colagénio, e colocadas em MSS. Estas caixas foram de seguida colocadas na incubadora a 37°C , numa atmosfera composta por 95% de ar

Efeito do ácido retinóico no acidente vascular cerebral.

atmosférico e 5% de CO₂, durante 4 horas. O MSS foi depois removido, tendo as células sido lavadas 4 vezes com 500 µL de Krebs (Tabela 1). Após a última lavagem, a solução de Krebs foi mantida na caixa de Petri, tendo a mesma sido colocada no microscópio.

As células foram observadas através de um microscópio de fluorescência invertido (*Zeiss Axio Observer Z1*, Jena, Alemanha). Este microscópio totalmente motorizado, equipado com uma câmara digital monocromática de alta velocidade (*Axio Cam Hsm*), que possui um sistema de incubação incorporado permitiu o controlo da temperatura, fator este determinante para a manutenção da viabilidade das células no decorrer do processo experimental. Após a primeira observação, foi tirada uma foto que serviu de controlo. Durante 20 minutos as células foram deixadas no microscópio sem a adição de nenhum agente contráctil ou relaxante. Após este período de tempo foi tirada uma segunda foto, para observação da contração basal, tendo sido adicionado de seguida o agente contráctil (NA - 1 µM). Passados novamente 20 minutos foi tirada uma nova foto e foi adicionado o agente relaxante (SNP - 1 µM), tendo sido tirada novamente uma foto após 20 minutos. A análise e o tratamento das imagens foram posteriormente realizados através do programa *AxioVision 4.8 software*, com o programa medição automática (*Automatic measurement*) conseguindo-se assim medir a diferença de área das células após a adição dos agentes vasoativos.

3.4. Análise Estatística

Os dados obtidos encontram-se expressos em função da média ± erro padrão (S.E.M.) de n experiências independentes. A análise estatística dos mesmos foi realizada no programa *SigmaStat Statistical Analysis System*, versão 3.5 (2006). A significância estatística entre dois grupos foi analisada com recurso ao teste *t-student*. A comparação entre mais de dois grupos foi analisada através do método *One-way ANOVA* seguido de teste de *Dunnnett*. Foram consideradas diferenças significativas quando os níveis de probabilidade foram inferiores a 5% ($p < 0,05$).

3.5. Soluções e Materiais

3.5.1. Soluções

Na realização desta investigação foram usadas diversas soluções. A Tabela 1 contém as várias soluções utilizadas e respectivas composições.

Tabela 1 – Soluções utilizadas no decorrer deste trabalho.

Solução	Composição
Krebs Básico Concentrado	KCl 5,0mM; EDTA 0,03 mM; MgSO ₄ ·7H ₂ O 1,2 mM; KH ₂ PO ₄ 1,2 mM e ácido L-ascórbico 0,6 mM
Krebs Diluído	Krebs Básico Concentrado; CaCl ₂ 0,5 mM; NaCl 119 mM; NaHCO ₃ 25 mM e Glucose 11 mM, pH = 7,4
Meio de Cultura Completo (MCC)	DMEM-F12 suplementado com soro fetal bovino (FBS-5%); Albumina de soro bovino (BSA-0.5%); fator de crescimento epidérmico (EGF,5µg/ml); fator de crescimento fibroblástico (FGF,0.5ng/ml); heparina (2µg/ml), insulina (5µg/ml) e solução antibiótico- antimicótico (SAA), pH=7,4
MCC com 10% FBS	DMEM-F12 suplementado com soro fetal bovino (FBS – 10%); Albumina de soro bovino (BSA -0,5%) e SAA (1%), pH = 7,4
Meio de Cultura sem soro (MSS)	DMEM-F12; Albumina de soro (BSA-0,5%), pH= 7,4
Solução <i>phosphate buffered saline</i> (PBS) ou solução fosfato-salino diluído	1,37 M NaCl; 27 mM KCl; 100 mM Na ₂ HPO ₄ e 20 mM KH ₂ PO ₄ , pH=7,4
Solução antibiótico-antimicótico (SAA)	Mistura de penicilina (10000 U); estreptomicina (10 mg) e anfotericina (25 mg)
Solução de BSA (Albumina de soro bovino)	250 g BSA e 10 mL H ₂ O
Solução de <i>Dulbecco's modified Eagle's médium/F12</i> (DMEM-F12)	DMEM-F12 liofilizado sigma, NaHCO ₃ (1,2 g/L) e ácido L-ascórbico (20 mg/L), pH = 7,4
Solução de Tripsina - EDTA	0,5 g de tripsina de porco e 0,2 g de EDTA

3.5.2. Químicos

No decorrer desta investigação foram utilizados diversos compostos químicos, tais como NA, SNP e AR. Todos os químicos foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Os químicos NA e SNP foram diluídos em água destilada, tendo sido preparadas diluições no dia da realização da metodologia laboratorial. Quanto ao AR, este foi diluído em etanol 99,8 %.

Efeito do ácido retinóico no acidente vascular cerebral.

3.5.3. Materiais

Na realização desta investigação foram utilizados diversos equipamentos e materiais. A Tabela 2 apresenta os equipamentos e materiais utilizados no decorrer deste trabalho.

Tabela 2 – Materiais/Equipamentos utilizados durante este trabalho.

Isolamento e Cultura da artéria cerebral media	
Materiais/Equipamentos	Marca
Câmara de Fluxo Laminar	NuAire
Frascos de Cultura/<i>Multiwells</i>	Orange Scientific
Material Cirúrgico Específico	Tekno; FST; Dumostar; Stainless
Material Específico de Laboratório	-
Sistema de Incubação	Pecon
<i>Planar Cell Surface Area</i>	
Materiais/Equipamentos	Marca
Caixas de Petri Específicas para o Microscópio de Fluorescência	Sarstedt
Material Específico de Laboratório	-
Microscópio de Fluorescência	Zeiss Axio Observer Z1
Software do Microscópio de Fluorescência	Axio Vision program 4.8
Preparação de Soluções	
Materiais/Equipamentos	Marca
Balança Digital	Sartorius
Medidor de pH	Metrohm

4. Resultados

4.1. Obtenção de culturas primárias de células musculares lisas

A cultura de CML foi obtida através de explantes da ACM, tal como descrito no protocolo para obtenção de culturas primárias de CML-ACM, previamente estabelecido por Quelhas e colaboradores [37]. A figura 6A mostra a cultura após 10 dias em cultura. A figura 6B mostra a cultura após 20 dias, onde as CML atingiram o estado de confluência.

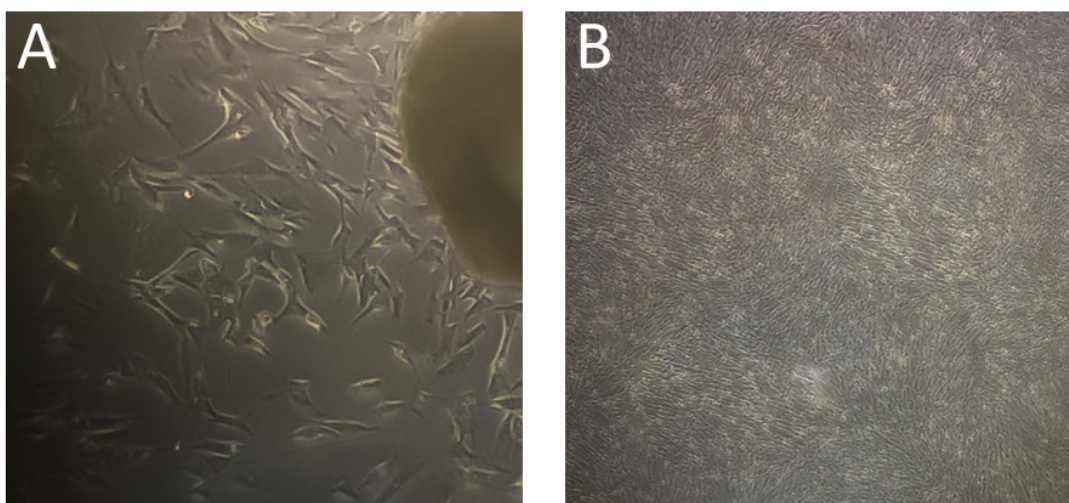


Figura 6. Cultura primária de CML obtidas a partir do explante da ACM. (A) Imagem da cultura de CML após 10 dias adquirida num microscópio ótico através da objetiva de 40x. (B) Imagem da cultura de CML após 30 dias, em estado de confluência, num microscópio ótico através da objetiva de 10x. (CML – Células Musculares Lisas; ACM – Artéria Cerebral Média).

4.2. Ensaios de contractilidade celular

De forma a avaliar o potencial do AR na resposta vasoativa das CML-ACM após a ocorrência de um evento isquémico, procedeu-se à pré-incubação destas células com meios condicionados por co-culturas de neurónios e astrócitos, previamente incubadas com diferentes concentrações de AR (0,1 μM , 1 μM , 5 μM e 10 μM). Através da técnica de PCSA, de acordo com Quelhas e colaboradores [37] e Mariana e colaboradores [22], foi avaliada a resposta vasoativa das CML ao agente contráctil (NA - 1 μM) e ao agente relaxante (SNP - 1 μM).

4.2.1. Resposta celular à ação do agente contráctil

A figura 7 representa o efeito induzido pela NA após pré-incubação das CML-ACM com meios condicionados por co-culturas de neurónios e astrócitos incubadas com AR, submetidas (grupo OGD) e não submetidas (grupo HBSS + Glucose) a ambiente

isquémico. Para além disso estão também representados os respetivos controlos (resposta das CML condicionadas pelo secretoma das co-culturas de neurónios e astrócitos, não incubadas com AR, sujeitas e não sujeitas a ambiente isquémico).

A ação da NA induziu contração nas CML condicionadas pelo secretoma das co-culturas neuro-gliais (N-G) não incubadas com quaisquer concentrações de AR, não sujeitas (Controlo HBSS + Glucose = $14,70 \pm 1,35$ %) e sujeitas a ambiente isquémico (Controlo OGD = $10,09 \pm 1,24$ %) existindo, no entanto, diferenças significativas entre estas (Figura 7). Deste modo, foi possível observar que os fatores libertados por neurónios e astrócitos, sujeitos a ambiente isquémico, atenuaram significativamente resposta contráctil das CML.

No que diz respeito à resposta das CML condicionadas pelo secretoma de co-culturas N-G não sujeitas a ambiente isquémico, a incubação com concentrações de $0,1 \mu\text{M}$ AR e $10 \mu\text{M}$ AR resultou numa diminuição significativa da resposta contráctil das CML à NA ($0,1 \mu\text{M}$ AR HBSS + Glucose = $9,66 \pm 0,86$ %; $10 \mu\text{M}$ AR HBSS + Glucose = $3,82 \pm 2,27$ %) quando comparadas com CML condicionadas pelo secretoma de co-culturas N-G não incubadas com AR (Controlo HBSS + Glucose = $14,70 \pm 1,35$ %) (Figura 7). As concentrações de $1 \mu\text{M}$ AR e $5 \mu\text{M}$ AR não induziram diferenças significativas na resposta contráctil das CML. Assim, conforme evidenciado, aquando da incubação destas células com meios condicionados pelas co-culturas de neurónios e astrócitos incubadas com AR, o perfil contráctil destas diminuiu em resposta ao agente contráctil.

Aquando da exposição das co-culturas N-G a OGD, as incubações com as concentrações de $1 \mu\text{M}$, $5 \mu\text{M}$, $10 \mu\text{M}$ de AR promoveram alterações significativas na resposta contráctil das CML ($1 \mu\text{M}$ AR OGD = $-5,72 \pm 2,40$ %; $5 \mu\text{M}$ AR OGD = $-6,92 \pm 1,65$ %; $10 \mu\text{M}$ AR OGD = $-5,78 \pm 2,12$ %) quando comparadas à resposta de CML condicionadas pelo secretoma de co-culturas N-G, sem incubação com AR (Controlo OGD = $10,09 \pm 1,24$ %) (Figura 7). Estes resultados evidenciaram uma alteração na resposta das CML quando condicionadas pelo secretoma de co-culturas N-G incubadas com as concentrações anteriormente referidas e sujeitas a ambiente isquémico. Além disso, foi constatado que, para a mesma concentração de AR, o ambiente isquémico só não alterou significativamente a resposta das CML quando estas foram incubadas com o secretoma de co-culturas previamente expostas à concentração de $0,1 \mu\text{M}$. Observou-se, assim, que a utilização de AR potenciou o efeito dos fatores libertados por neurónios e astrócitos sujeitos a ambiente isquémico, condicionando a resposta contráctil das CML à NA, conduzindo as mesmas ao relaxamento.

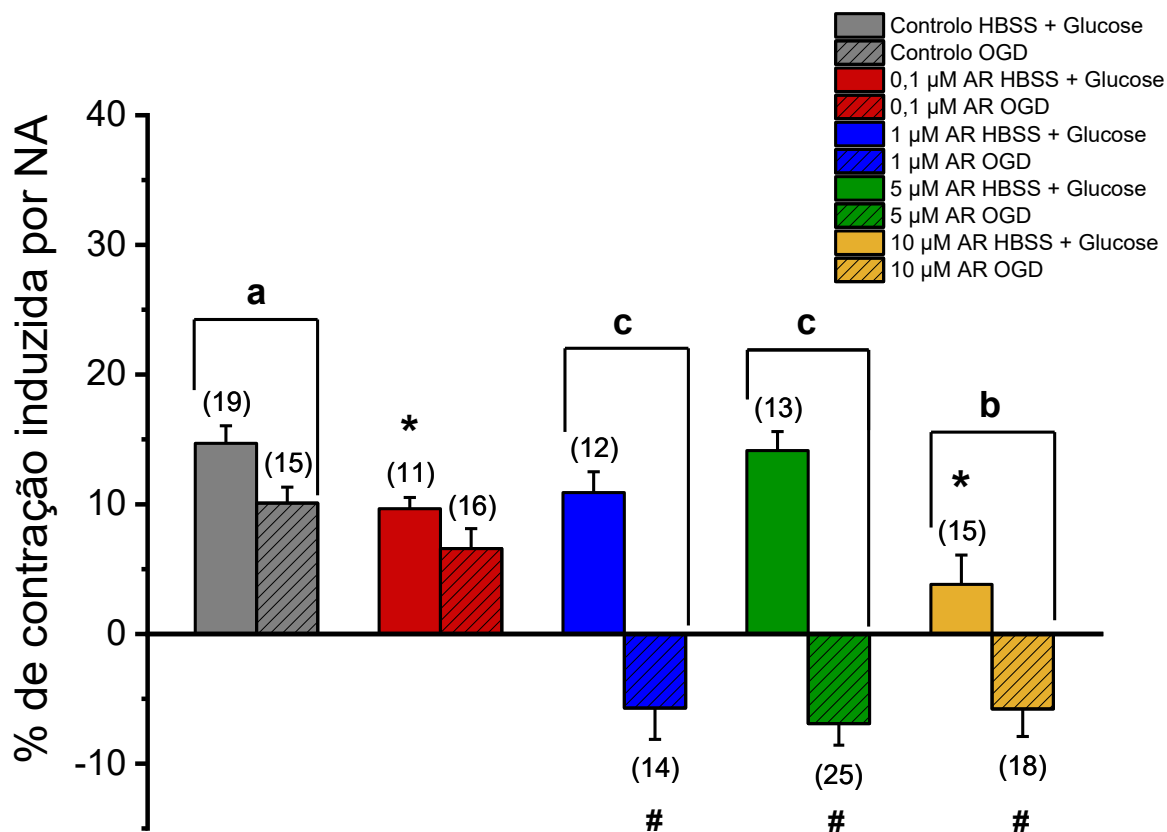


Figura 7. Efeito da NA (1 μ M) nas CML. Percentagem de contração induzida por NA após 24h de incubação com meios condicionados por co-culturas corticais de neurónios e astrócitos incubadas com AR (0,1 μ M, 1 μ M, 5 μ M e 10 μ M), submetidas (OGD) e não submetidas (HBSS + Glucose) a ambiente isquémico e respetivos controlos (co-culturas de neurónios e astrócitos não incubadas com AR). Os dados foram expressos em percentagem (%) de variação da área celular em relação à área inicial de cada célula. As barras representam a média \pm erro padrão da média (S.E.M) de três experiências independentes. A análise estatística foi realizada pelo teste *One-way ANOVA* seguido de teste de *Dunnnett* onde * $P < 0,05$ versus Controlo HBSS + Glucose; # $P < 0,05$ versus Controlo OGD e pelo teste *t-student*, onde ^a $P < 0,05$; ^b $P < 0,01$; ^c $P < 0,001$. (NA – Noradrenalina; CML – Células Musculares Lisas; OGD – Privação de oxigénio e glucose; AR – Ácido Retinóico).

A figura 8 evidencia o perfil de contração das CML durante o tempo de atuação da NA após incubação destas células com meios condicionados por co-culturas corticais de neurónios e astrócitos, não submetidas (figura 8A) e submetidas (figura 8B) a ambiente isquémico.

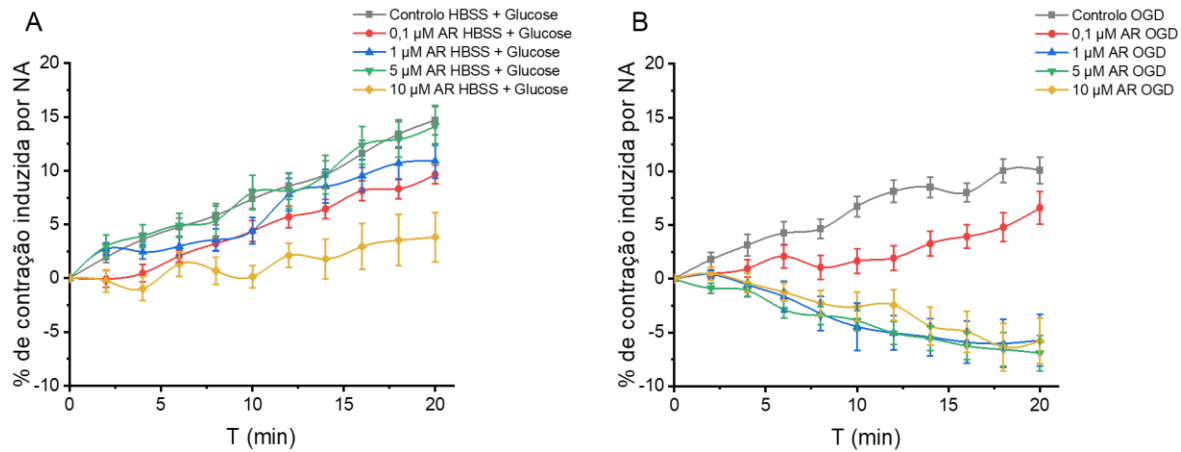


Figura 8. Perfil temporal da contração induzida por NA (1 μM). (A) Perfil de contração celular induzida pela ação da NA nos 20 minutos experimentais em CML incubadas, durante 24 horas, com meios condicionados por co-culturas de neurónios e astrócitos não incubadas (Controlo HBSS + Glucose) e incubadas com concentrações de 0,1 μM, 1 μM, 5 μM e 10 μM de AR, não submetidas a ambiente isquémico; (B) Perfil de contração celular induzida pela ação da NA nos 20 minutos experimentais em CML incubadas, durante 24 horas, com meios condicionados por co-culturas de neurónios e astrócitos não incubadas (Controlo OGD) e incubadas com concentrações de 0,1 μM, 1 μM, 5 μM e 10 μM de AR, submetidas a ambiente isquémico. (NA – Noradrenalina; CML – Células Musculares Lisas; AR – Acido Retinóico).

4.2.2. Resposta celular à ação do agente relaxante

Após exposição das CML à ação da NA foi analisado o efeito vasoativo do SNP (Figura 9). A ação deste vasodilatador promoveu um aumento não significativo do relaxamento das CML incubadas com meios condicionados por co-culturas N-G sujeitas a OGD (Controlo OGD = $14,27 \pm 4,74$ %) quando comparado com o relaxamento das CML incubadas com meios condicionados por co-culturas não sujeitas a ambiente isquémico (Controlo HBSS + Glucose = $12,62 \pm 5,75$ %). Estes resultados demonstraram que, apesar de não significativo, os fatores libertados por neurónios e astrócitos, quando submetidos a OGD, induziram relaxamento das CML em resposta ao SNP.

Quanto aos meios condicionados por co-culturas N-G incubadas com as diferentes concentrações de AR e não sujeitas a ambiente isquémico, estes provocaram alterações significativas nas respostas das CML ao SNP (0,1 μM AR HBSS + Glucose = $-17,56 \pm 1,81$ %; 1 μM AR HBSS + Glucose = $-14,32 \pm 1,70$ %; 5 μM AR HBSS + Glucose = $-22,72 \pm 2,07$ %; 10 μM AR HBSS + Glucose = $-8,00 \pm 2,46$ %) quando comparadas às respostas de CML condicionadas pelo secretoma de co-culturas N-G, não incubadas com AR e não sujeitas a condições isquémicas (Controlo HBSS + Glucose = $12,62 \pm 5,75$ %). Conforme evidenciado, a incubação das co-culturas de neurónios e astrócitos com as diferentes concentrações de AR culminou numa contração das CML em resposta ao agente vasodilatador.

A exposição das co-culturas N-G a OGD conduziu também a uma alteração na resposta das CML ao SNP. Os meios condicionados por estas co-culturas, previamente incubadas com as concentrações de 0,1 μM , 1 μM e 10 μM de AR, culminaram em respostas significativamente diferentes por parte das CML ao SNP (0,1 μM AR OGD = $-10,98 \pm 2,64$ %; 1 μM AR OGD = $-2,56 \pm 2,42$ %; 10 μM AR OGD = $-2,73 \pm 1,83$ %) quando comparadas com as respostas de CML condicionadas pelo secretoma de co-culturas N-G sujeitas a OGD e sem incubação com AR (Controlo OGD = $14,27 \pm 4,74$ %). Deste modo, estes resultados demonstraram que apenas a concentração de 5 μM de AR promoveu um relaxamento das CML em resposta ao SNP (5 μM AR OGD = $6,98 \pm 3,38$ %), apresentando uma resposta significativamente similar ao respetivo controlo (Controlo OGD = $14,27 \pm 4,74$ %). Nas restantes concentrações, o ambiente isquémico conduziu a uma diminuição no perfil de contração das CML, por comparação com a resposta destas células vasculares após incubação com meios condicionados por co-culturas N-G não sujeitas a OGD. Por último, foi ainda observado que, para a mesma concentração de AR, a exposição das co-culturas de neurónios e astrócitos a OGD alterou significativamente a resposta das CML quando estas foram incubadas com o secretoma de co-culturas N-G, previamente expostas às concentrações de 1 μM e 5 μM .

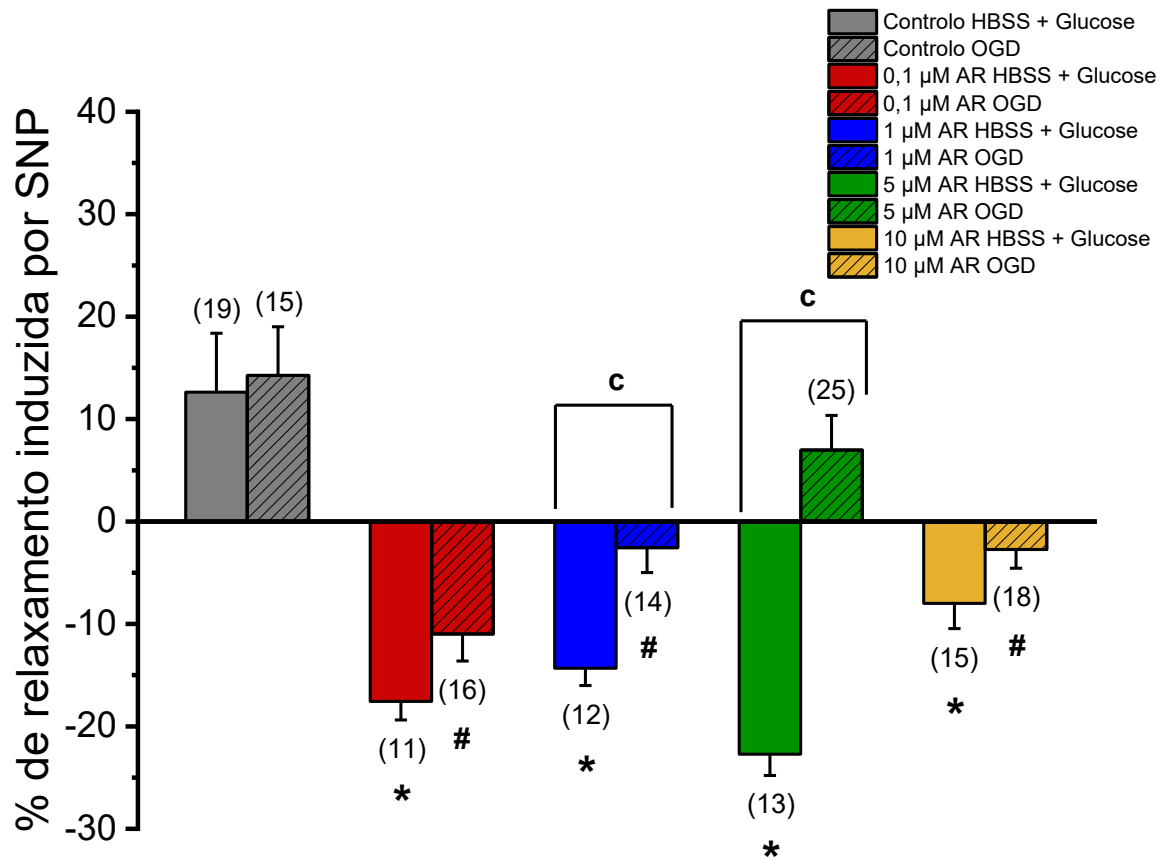


Figura 9. Efeito do SNP (1 μ M) nas CML após contração com NA. Percentagem de relaxamento induzido pelo SNP após 24h de incubação com meios condicionados por co-culturas corticais de neurónios e astrócitos incubadas com AR (0,1 μ M, 1 μ M, 5 μ M e 10 μ M), submetidas (OGD) e não submetidas (HBSS + Glucose) a ambiente isquémico e respetivos controlos (co-culturas de neurónios e astrócitos não incubadas com AR). Os dados foram expressos em percentagem (%) de variação de área celular em relação à área inicial de cada célula. As barras representam a média \pm erro padrão da média (S.E.M) de três experiências independentes. A análise estatística foi realizada pelo teste *One-way ANOVA* seguido de teste de *Dunnett* onde * $P < 0,05$ versus Controlo HBSS + Glucose; # $P < 0,05$ versus Controlo OGD e pelo teste *t-student*, onde ^a $P < 0,05$; ^b $P < 0,01$; ^c $P < 0,001$. (SNP – Nitroprussiato de sódio; CML – Células Musculares Lisas; NA- Noradrenalina; AR – Ácido Retinóico; OGD – Privação de oxigénio e glucose).

A figura 10 evidencia o perfil de relaxamento das CML durante o tempo de atuação do SNP, após incubação destas células com meios condicionados por co-culturas corticais de neurónios e astrócitos, não submetidas (figura 10A) e submetidas (figura 10B) a ambiente isquémico.

Efeito do ácido retinóico no acidente vascular cerebral.

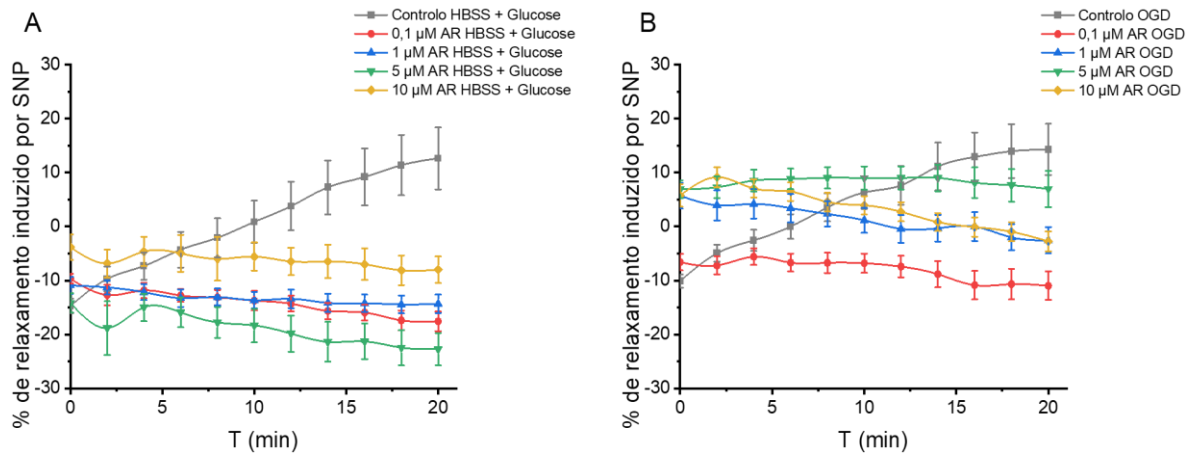


Figura 10. Perfil temporal de relaxamento induzido por SNP após contração com NA (1 μM). (A) Perfil de relaxamento celular induzido pela ação do SNP nos 20 minutos experimentais em CML incubadas durante 24 horas com meios condicionados por co-culturas de neurónios e astrócitos não incubadas (Controlo HBSS + Glucose) e incubadas com concentrações de 0,1 μM , 1 μM , 5 μM e 10 μM de AR, não submetidas a ambiente isquémico; (B) Perfil de relaxamento celular induzido pela ação do SNP nos 20 minutos experimentais em CML incubadas durante 24 horas com meios condicionados por co-culturas de neurónios e astrócitos não incubadas (Controlo OGD) e incubadas com concentrações de 0,1 μM , 1 μM , 5 μM e 10 μM de AR, submetidas a ambiente isquémico. (SNP – Nitroprussiato de sódio; NA – Noradrenalina; CML – Células Musculares Lisas; AR – Acido Retinóico).

5. Discussão

O AVC é uma das principais causas de morte e invalidez em todo o mundo, sendo por isso amplamente estudado, de forma a reduzir taxa de mortalidade e de complicações decorrentes desta lesão [88]. Cerca de 85% dos casos de AVC são do tipo isquémico, caracterizando-se pela oclusão de vasos sanguíneos e consequente diminuição do fluxo sanguíneo para diversas áreas do cérebro [89]. Uma vez que este órgão apresenta elevadas necessidades metabólicas, a diminuição do aporte sanguíneo, mesmo que por um curto período de tempo, culmina em lesões neuronais [2, 90].

A ACM é o vaso sanguíneo mais afetado por este tipo de lesão [91, 92]. Um dos constituintes celulares mais importantes desta artéria são as CML, que fazem parte da túnica média e que, como descrito anteriormente, são as principais reguladoras do fluxo sanguíneo. Deste modo, uma vez que o AVC isquémico é caracterizado por uma interrupção do fluxo sanguíneo, a compreensão de como o ambiente adverso altera a função vasoativa das CML, bem como o desenvolvimento de mecanismos capazes de controlar o tónus vascular são de extrema importância [37, 91].

O AR desempenha um papel fundamental no desenvolvimento do sistema nervoso dos mamíferos [93]. No entanto, para além do seu efeito benéfico em diversos processos biológicos (entre as quais a manutenção da sobrevivência de neurónios) este derivado da vitamina A desempenha funções importantes no controlo das respostas inflamatórias levadas a cabo por diversas células, nomeadamente os astrócitos [58, 59, 93]. Para além disso, foi também reportado por Wang e colaboradores um efeito vasodilatador mediado pelo AR em artérias mesentéricas de rato [94].

Durante o período de isquemia, diversos tipos de células podem adaptar-se a essas condições e libertar diversos fatores que protegem as redes neuronais afetadas pela diminuição do fluxo sanguíneo [86]. Um estudo levado a cabo por Roque e colaboradores demonstrou que os astrócitos possuem a capacidade de se adaptar ao ambiente isquémico, podendo conferir proteção aos neurónios através da libertação de fatores neurotróficos e moléculas antioxidantes [86]. Estas células gliais providenciam também suporte energético aos neurónios através da produção de lactato [86, 95]. Além disso, Mariana e colaboradores demonstraram que, em condições de isquemia, as células referidas anteriormente, juntamente com neurónios, atuam como mediadores da resposta das CML, através da libertação de fatores vasoativos [22]. Neste sentido, de forma a analisar o efeito profilático do AR na modulação da resposta vasoativa das CML por parte dos neurónios e astrócitos, foram utilizados meios de reperfusão de culturas mistas de neurónios e

astrócitos, previamente incubadas com diferentes concentrações de AR (0,1 μM , 1 μM , 5 μM e 10 μM) e sujeitas a OGD durante 4 horas. O período de tempo em que as co-culturas foram submetidas a ambiente isquémico foi definido anteriormente por Roque e colaboradores, tendo sido observado que a exposição destas co-culturas a 4 horas de OGD não produziu um decréscimo significativo na viabilidade das células, por comparação com outros tempos de isquemia [22, 86].

O método de cultura utilizado para obtenção de CML-ACM, tal como descrito previamente por Quelhas e colaboradores [37], promove o crescimento das CML num fenótipo sintético, o que não corresponde ao presente nos vasos sanguíneos e que é responsável pelo controlo do tónus vascular [37]. Deste modo, 48 horas antes da realização dos ensaios experimentais, as CML foram expostas a MSS, por um período de 24 horas, com o objetivo de promover a alteração do fenótipo para o estado contráctil [35, 37, 96]. Uma vez obtidas culturas de CML neste fenótipo, as mesmas foram incubadas com meios condicionados por co-culturas de neurónios e astrócitos, previamente incubadas com diferentes concentrações de AR, sujeitas e não sujeitas a ambiente isquémico.

A resposta vasoativa das CML foi avaliada através da técnica de PCSA com recurso à utilização de NA, como agente contráctil, e SNP, como agente relaxante. A escolha dos dois agentes foi baseada em estudos previamente realizados neste tipo de células, onde foram demonstradas alterações na resposta vasoativa aquando da presença destes dois agentes [22, 37]. Na presença de NA existe uma ativação dos recetores α_1 -adrenérgicos, expressos nas CML, uma vez que a NA é agonista desses recetores [97]. Esta ligação entre a NA e os recetores anteriormente referidos promove o aumento da atividade da fosfolipase C (PLC), devido às proteínas Gq que estão acopladas aos recetores α_1 -adrenérgicos [97, 98]. A PLC promove a hidrólise do fosfatidilinositol bifosfato dando origem a IP₃ e diacilglicerol (DAG) [97, 98]. Estes atuam como segundos mensageiros promovendo a libertação de Ca²⁺ dos reservatórios intracelulares [97, 98]. Estes aumentos nos níveis de Ca²⁺ culminam na contração das CML [97]. No entanto, o efeito da NA nas artérias cerebrais não se resume apenas a uma ação vasoconstritora. Estudos indicam que as artérias cerebrais expressam também recetores adrenérgicos β_1 que, quando ativados, induzem relaxamento através de fenómenos associados aos canais de potássio [99]. Estes recetores estão acoplados a proteínas Gs responsáveis pela ativação da adenilato ciclase, controlando assim o vasorelaxamento [100]. Assim, os nossos dados corroboraram os trabalhos anteriormente mencionados, uma vez que, aquando da adição de NA, as CML expostas a meios condicionados por co-culturas N-G, sem incubação com AR e não sujeitas a ambiente isquémico, produziram uma resposta contráctil. Deste modo, os fatores libertados para o meio, por parte das co-culturas de neurónios e astrócitos, quando

sujeitos às condições referidas anteriormente, não comprometeram a expressão ou a atividade dos recetores adrenérgicos nas CML. Tais resultados vão ao encontro de outros previamente publicados por Mariana e colaboradores [22]. No que diz respeito às co-culturas N-G incubadas com AR e não sujeitas a ambiente isquémico, o meio de reperfusão condicionado pelas mesmas diminuiu ligeiramente a resposta contráctil das CML, existindo uma diminuição significativa na sua resposta ao agente contráctil aquando da incubação das co-culturas com as concentrações de 0,1 μM e 10 μM de AR. Assim, a incubação com AR aparenta diminuir a expressão, ou reduzir a atividade dos recetores α -adrenérgicos nas CML, conduzindo desta forma a uma redução na percentagem de contração das mesmas.

Posteriormente foi avaliada a resposta das CML ao mesmo agente contráctil, aquando da exposição destas células a meios condicionados por co-culturas N-G submetidas a ambiente isquémico. Tendo em consideração que essas culturas foram submetidas a 4 horas de OGD, seria espectável que existisse um aumento da resposta contráctil das CML, quando expostas aos meios condicionados pelas referidas co-culturas. Ao invés do esperado, a resposta contráctil destas células foi significativamente inferior, quando comparada com a resposta das mesmas após exposição a meios condicionados por co-culturas N-G não sujeitas a ambiente isquémico. Tais resultados contrariam dados publicados anteriormente, onde foi descrito que o ambiente isquémico promoveu a um aumento da resposta contráctil por parte das CML [22, 101]. Um estudo realizado por Monge e colaboradores demonstrou que a oclusão da ACM em caprinos, durante 120 minutos e posterior reperfusão por um período de 60 minutos, potenciou a resposta contráctil destas artérias à NA, através do aumento da expressão de recetores α -adrenérgicos, bem como do aumento da expressão de prostaciclina I₂ (PGI₂) [101]. Deste modo, tais diferenças sugerem que os fatores libertados pelas co-culturas de neurónios e astrócitos, quando sujeitos a isquemia e posterior reperfusão, aparentam regular negativamente a expressão de recetores α -adrenérgicos por parte das CML, diminuindo a sua resposta contráctil. No entanto é necessário ter em consideração as diferenças no que diz respeito aos tempos de exposição destas células a OGD e reperfusão. Assim, a avaliação da expressão destes recetores em CML expostas a meios condicionados por co-culturas N-G sujeitas e não sujeitas a OGD poderá ser elucidativa. Perante condições semelhantes, a incubação com AR das co-culturas N-G com as concentrações de 1 μM , 5 μM e 10 μM inibiu a resposta contráctil das CML após a adição de NA. A incubação das co-culturas de neurónios e astrócitos com AR aparentou promover a libertação de mediadores que condicionaram a atividade dos recetores α -adrenérgicos ou diminuíram consideravelmente a sua expressão. Tal facto, produziu, não só uma supressão da resposta

contráctil, como também um ligeiro relaxamento das CML. Deste modo, e tal como referido anteriormente, avaliação da expressão e atividade dos recetores envolvidos na ação da NA será um fator de análise importante para compreender de que forma a ação do AR altera a resposta das CML.

Como referido anteriormente, as CML são as principais reguladoras do fluxo sanguíneo. Assim, estas células apresentam a capacidade de contrair e relaxar, por forma a controlar eficazmente o tónus vascular [13]. Deste modo, após a avaliação da resposta contráctil, foi avaliada a capacidade das CML relaxarem quando expostas ao agente vasodilatador, SNP. O SNP é um dador de ON, sendo que o aumento da sua concentração intracelular promove a ativação da guanilato ciclase solúvel (sGC) e consequente aumento dos níveis de GMP cíclico (cGMP) [102, 103]. Este conduz, posteriormente, à diminuição da concentração de Ca^{2+} intracelular, através da ativação da ATPase no retículo sarcoplasmático, ou dos canais de potássio [104]. No que concerne à adição de SNP às CML, quando previamente expostas aos meios condicionados por co-culturas N-G sujeitas e não sujeitas a ambiente isquémico seguidas de reperfusão, os resultados evidenciaram que as mesmas permaneceram viáveis e responsivas, uma vez que, após exibirem uma resposta contráctil à NA, estas células foram capazes de relaxar, aquando da adição do agente vasodilatador. No entanto, ao invés da resposta descrita anteriormente, a incubação das co-culturas N-G com as diferentes concentrações de AR, alterou a resposta das CML, inibindo o efeito vasodilatador do SNP. Aquando da exposição das CML aos meios condicionados pelas co-culturas N-G, incubadas com AR e não sujeitas a ambiente isquémico, a libertação de fatores por parte destas co-culturas despoletou uma resposta contráctil das CML, após a adição do agente vasodilatador. No que diz respeito às co-culturas N-G incubadas com AR e posteriormente submetidas a OGD, os meios de reperfusão condicionados pelas co-culturas mencionadas anteriormente reduziram o perfil contráctil das CML, em resposta ao SNP, quando comparadas com o comportamento das mesmas após exposição aos meios condicionados por co-culturas incubadas com AR e não sujeitas a ambiente isquémico. No entanto, a incubação destas co-culturas com 5 μ M de AR, ao contrário das restantes, não desencadeou uma resposta contráctil nas CML. A adição de SNP a estas células não produziu efeito vasoativo sob as mesmas, tendo sido mantido o relaxamento produzido pela adição do agente contráctil. Estes resultados sugerem que a incubação com AR alterou a libertação de mediadores por parte das co-culturas de neurónios e astrócitos para o meio de cultura, condicionando a resposta das CML à ação do SNP, possivelmente através da inibição da ação do ON.

Diversos estudos reportam que a ação anti-inflamatória levada a cabo pelo AR desencadeia mecanismos que inibem a produção de ON quer diretamente [105], como

também indiretamente, através da ação de outros fatores induzidos pela ação desta molécula, nomeadamente em culturas de astrócitos [58, 59]. Deste modo, a avaliação dos níveis de cGMP e de fosfodiesterases nas CML, após exposição aos meios condicionados pelas co-culturas incubadas com AR, poderá ser elucidativa acerca de como o AR pode modular a resposta das CML ao SNP.

Em suma, estes dados indicam que a incubação com AR das co-culturas de neurónios e astrócitos submetidas a OGD durante 4 horas impediu a resposta contráctil das CML, na presença de um agente vasoconstritor, através dos fatores libertados para o meio pelas referidas co-culturas. Deste modo, a inibição do perfil contráctil das CML, possibilita a prevenção da interrupção do fluxo sanguíneo, minimizando a morte celular inerente à diminuição da perfusão sanguínea. A concentração de 5 μM de AR apresentou os resultados mais promissores, uma vez que as CML expostas aos meios condicionados pelas co-culturas N-G dilataram, quando na presença de um agente contráctil, mantendo de seguida o mesmo perfil, aquando da adição do agente vasodilatador. Assim, estes dados possibilitam deduzir que a utilização profilática de AR, nomeadamente numa concentração 5 μM , apresenta potenciais benefícios terapêuticos aquando da ocorrência de um AVC, através do controlo dos níveis de reperfusão.

6. Conclusão e Perspetivas Futuras

O AVC isquémico é uma das principais causas de morte e invalidez a nível global, pelo que existe uma necessidade emergente de minimizar os danos causados pela perfusão inadequada característica deste evento. Assim, é crucial entender os mecanismos associados a este tipo de lesão, bem como desenvolver novas opções preventivas e de tratamento que incidam sobre a UNV, uma vez que a correta regulação do FSC só é possível devido à ação coordenada das células da glia, das células vasculares e dos neurónios.

Este trabalho demonstrou que a uso profilático de AR, apresenta benefícios terapêuticos na prevenção de lesões decorrentes de um AVC isquémico. A utilização deste derivado da vitamina A modulou o secretoma de neurónios e astrócitos submetidos a ambiente isquémico, com a concentração de 5 μ L de AR a apresentar os resultados mais promissores, promovendo o relaxamento das CML quando expostas ao agente contráctil utilizado, mantendo o mesmo perfil após a adição do agente vasodilatador.

No entanto são necessários mais estudos para confirmar o potencial do AR na prevenção dos danos causados pela ocorrência de um evento isquémico. A análise da expressão dos recetores adrenérgicos, bem como da produção de sGC, através de *real-time PCR* ou *Western Blot*, poderá ser importante para elucidar de que forma o secretoma de neurónios e astrócitos, incubados com AR, altera o processo vasoativo das CML. Para um estudo mais completo seria também interessante analisar o efeito dos agentes vasoativos sobre as correntes mediadas pelos canais de cálcio e potássio, através da técnica de *Patch-Clamp*, com o intuito de corroborar os resultados obtidos neste trabalho. Além disso, a incubação de culturas de CE com AR e posterior avaliação do efeito vasoativo do seu secretoma em CML seria interessante, de forma a elucidar sobre como estas células, na presença de AR, condicionam a resposta vasoativa das CML.

Bibliografia

1. Muoio, V., P.B. Persson, and M.M. Sendeski, *The neurovascular unit - concept review*. Acta Physiol (Oxf), 2014. **210**(4): p. 790-8.
2. Mergenthaler, P., et al., *Sugar for the brain: the role of glucose in physiological and pathological brain function*. Trends Neurosci, 2013. **36**(10): p. 587-97.
3. Konan, L.M., V. Reddy, and F.B. Mesfin, *Neuroanatomy, Cerebral Blood Supply*, in *StatPearls*. 2021: Treasure Island (FL).
4. Rosner, J., V. Reddy, and F. Lui, *Neuroanatomy, Circle of Willis*, in *StatPearls*. 2021: Treasure Island (FL).
5. Hui, C., *Ischemic Stroke*, in *StatPearls*. 2021: Treasure Island (FL).
6. Nogles, T.E. and M.A. Galuska, *Middle Cerebral Artery Stroke*, in *StatPearls*. 2021: Treasure Island (FL).
7. Iadecola, C., *The Neurovascular Unit Coming of Age: A Journey through Neurovascular Coupling in Health and Disease*. Neuron, 2017. **96**(1): p. 17-42.
8. Shahan, C.P., et al., *Impact of circle of Willis anatomy in traumatic blunt cerebrovascular injury-related stroke*. Trauma Surg Acute Care Open, 2017. **2**(1): p. e000086.
9. Yu, X., C. Ji, and A. Shao, *Neurovascular Unit Dysfunction and Neurodegenerative Disorders*. Front Neurosci, 2020. **14**: p. 334.
10. Sweeney, M.D., S. Ayyadurai, and B.V. Zlokovic, *Pericytes of the neurovascular unit: key functions and signaling pathways*. Nat Neurosci, 2016. **19**(6): p. 771-83.
11. Kisler, K., et al., *Cerebral blood flow regulation and neurovascular dysfunction in Alzheimer disease*. Nat Rev Neurosci, 2017. **18**(7): p. 419-434.
12. Andreone, B.J., B. Lacoste, and C. Gu, *Neuronal and vascular interactions*. Annu Rev Neurosci, 2015. **38**: p. 25-46.
13. Quelhas, P., G. Baltazar, and E. Cairrao, *The Neurovascular Unit: Focus on the Regulation of Arterial Smooth Muscle Cells*. Curr Neurovasc Res, 2019. **16**(5): p. 502-515.
14. McConnell, H.L., et al., *The Translational Significance of the Neurovascular Unit*. J Biol Chem, 2017. **292**(3): p. 762-770.
15. Mishra, A., et al., *Astrocytes mediate neurovascular signaling to capillary pericytes but not to arterioles*. Nat Neurosci, 2016. **19**(12): p. 1619-1627.
16. Reiner, A. and J. Levitz, *Glutamatergic Signaling in the Central Nervous System: Ionotropic and Metabotropic Receptors in Concert*. Neuron, 2018. **98**(6): p. 1080-1098.

17. Goodwani, S., et al., *Metabotropic and ionotropic glutamate receptors as potential targets for the treatment of alcohol use disorder*. *Neurosci Biobehav Rev*, 2017. **77**: p. 14-31.
18. Liu, Z. and M. Chopp, *Astrocytes, therapeutic targets for neuroprotection and neurorestoration in ischemic stroke*. *Prog Neurobiol*, 2016. **144**: p. 103-20.
19. Durkee, C.A. and A. Araque, *Diversity and Specificity of Astrocyte-neuron Communication*. *Neuroscience*, 2019. **396**: p. 73-78.
20. Mahmoud, S., et al., *Astrocytes Maintain Glutamate Homeostasis in the CNS by Controlling the Balance between Glutamate Uptake and Release*. *Cells*, 2019. **8**(2).
21. Rimmele, T.S., et al., *Extracellular Potassium and Glutamate Interact To Modulate Mitochondria in Astrocytes*. *ACS Chem Neurosci*, 2018. **9**(8): p. 2009-2015.
22. Mariana, M., et al., *In Vitro Model for Ischemic Stroke: Functional Analysis of Vascular Smooth Muscle Cells*. *Cell Mol Neurobiol*, 2021.
23. Carmignoto, G. and M. Gomez-Gonzalo, *The contribution of astrocyte signalling to neurovascular coupling*. *Brain Res Rev*, 2010. **63**(1-2): p. 138-48.
24. Attwell, D., et al., *Glial and neuronal control of brain blood flow*. *Nature*, 2010. **468**(7321): p. 232-43.
25. Bonney, S., et al., *Diverse Functions of Retinoic Acid in Brain Vascular Development*. *J Neurosci*, 2016. **36**(29): p. 7786-801.
26. Keaney, J. and M. Campbell, *The dynamic blood-brain barrier*. *FEBS J*, 2015. **282**(21): p. 4067-79.
27. Langen, U.H., S. Ayloo, and C. Gu, *Development and Cell Biology of the Blood-Brain Barrier*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2019. **35**: p. 591-613.
28. Liebner, S., et al., *Functional morphology of the blood-brain barrier in health and disease*. *Acta Neuropathol*, 2018. **135**(3): p. 311-336.
29. Macdonald, J.A., N. Murugesan, and J.S. Pachter, *Endothelial cell heterogeneity of blood-brain barrier gene expression along the cerebral microvasculature*. *J Neurosci Res*, 2010. **88**(7): p. 1457-74.
30. Pawlikowski, B., J. Wragge, and J.A. Siegenthaler, *Retinoic acid signaling in vascular development*. *Genesis*, 2019. **57**(7-8): p. e23287.
31. Bonney, S., et al., *Retinoic Acid Regulates Endothelial beta-catenin Expression and Pericyte Numbers in the Developing Brain Vasculature*. *Front Cell Neurosci*, 2018. **12**: p. 476.
32. Kawamura, H., et al., *ATP: a vasoactive signal in the pericyte-containing microvasculature of the rat retina*. *J Physiol*, 2003. **551**(Pt 3): p. 787-99.

33. Wang, G., et al., *Origin and differentiation of vascular smooth muscle cells*. J Physiol, 2015. **593**(14): p. 3013-30.
34. Smyth, L.C.D., et al., *Markers for human brain pericytes and smooth muscle cells*. J Chem Neuroanat, 2018. **92**: p. 48-60.
35. Rensen, S.S., P.A. Doevendans, and G.J. van Eys, *Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity*. Neth Heart J, 2007. **15**(3): p. 100-8.
36. Nishida, M., et al., *Canonical Transient Receptor Potential Channels and Vascular Smooth Muscle Cell Plasticity*. J Lipid Atheroscler, 2020. **9**(1): p. 124-139.
37. Quelhas, P., G. Baltazar, and E. Cairrao, *Characterization of culture from smooth muscle cells isolated from rat middle cerebral arteries*. Tissue Cell, 2020. **66**: p. 101400.
38. Webb, R.C., *Smooth muscle contraction and relaxation*. Adv Physiol Educ, 2003. **27**(1-4): p. 201-6.
39. Gonzalez-Fernandez, E., et al., *20-HETE Enzymes and Receptors in the Neurovascular Unit: Implications in Cerebrovascular Disease*. Front Neurol, 2020. **11**: p. 983.
40. Thurgur, H. and E. Pinteaux, *Microglia in the Neurovascular Unit: Blood-Brain Barrier-microglia Interactions After Central Nervous System Disorders*. Neuroscience, 2019. **405**: p. 55-67.
41. Colonna, M. and O. Butovsky, *Microglia Function in the Central Nervous System During Health and Neurodegeneration*. Annu Rev Immunol, 2017. **35**: p. 441-468.
42. Tang, Y. and W. Le, *Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases*. Mol Neurobiol, 2016. **53**(2): p. 1181-1194.
43. Bradl, M. and H. Lassmann, *Oligodendrocytes: biology and pathology*. Acta Neuropathol, 2010. **119**(1): p. 37-53.
44. Kuhn, S., et al., *Oligodendrocytes in Development, Myelin Generation and Beyond*. Cells, 2019. **8**(11).
45. Hamanaka, G., et al., *White-matter repair: Interaction between oligodendrocytes and the neurovascular unit*. Brain Circ, 2018. **4**(3): p. 118-123.
46. Simons, M. and K.A. Nave, *Oligodendrocytes: Myelination and Axonal Support*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2015. **8**(1): p. a020479.
47. Freeman, S.A., et al., *Mechanisms of sodium channel clustering and its influence on axonal impulse conduction*. Cell Mol Life Sci, 2016. **73**(4): p. 723-35.

48. Saab, A.S., I.D. Tzvetanova, and K.A. Nave, *The role of myelin and oligodendrocytes in axonal energy metabolism*. *Curr Opin Neurobiol*, 2013. **23**(6): p. 1065-72.
49. Ghyselinck, N.B. and G. Duester, *Retinoic acid signaling pathways*. *Development*, 2019. **146**(13).
50. Polcz, M.E. and A. Barbul, *The Role of Vitamin A in Wound Healing*. *Nutr Clin Pract*, 2019. **34**(5): p. 695-700.
51. Maden, M., *Retinoic acid in the development, regeneration and maintenance of the nervous system*. *Nat Rev Neurosci*, 2007. **8**(10): p. 755-65.
52. van Neerven, S., E. Kampmann, and J. Mey, *RAR/RXR and PPAR/RXR signaling in neurological and psychiatric diseases*. *Prog Neurobiol*, 2008. **85**(4): p. 433-51.
53. Xu, J., et al., *Retinoic acid promotes neural conversion of mouse embryonic stem cells in adherent monoculture*. *Mol Biol Rep*, 2012. **39**(2): p. 789-95.
54. Verani, R., et al., *Expression of the Wnt inhibitor Dickkopf-1 is required for the induction of neural markers in mouse embryonic stem cells differentiating in response to retinoic acid*. *J Neurochem*, 2007. **100**(1): p. 242-50.
55. Chan, T.J., et al., *Retinoic acid mediates the expression of glutamate transporter-1 in rat astrocytes through genomic RXR action and non-genomic protein kinase C signaling pathway*. *J Neurochem*, 2012. **121**(4): p. 537-50.
56. Michinaga, S. and Y. Koyama, *Dual Roles of Astrocyte-Derived Factors in Regulation of Blood-Brain Barrier Function after Brain Damage*. *Int J Mol Sci*, 2019. **20**(3).
57. Zhao, J., et al., *Retinoic acid isomers facilitate apolipoprotein E production and lipidation in astrocytes through the retinoid X receptor/retinoic acid receptor pathway*. *J Biol Chem*, 2014. **289**(16): p. 11282-11292.
58. van Neerven, S., et al., *Inflammatory chemokine release of astrocytes in vitro is reduced by all-trans retinoic acid*. *J Neurochem*, 2010. **114**(5): p. 1511-26.
59. Kampmann, E., et al., *Anti-inflammatory effect of retinoic acid on prostaglandin synthesis in cultured cortical astrocytes*. *J Neurochem*, 2008. **106**(1): p. 320-32.
60. Marina, N., et al., *Astrocytes and Brain Hypoxia*. *Adv Exp Med Biol*, 2016. **903**: p. 201-7.
61. Rhee, E.J., S. Nallamshetty, and J. Plutzky, *Retinoid metabolism and its effects on the vasculature*. *Biochim Biophys Acta*, 2012. **1821**(1): p. 230-40.
62. Zhang, J., et al., *All-Trans-Retinoic Acid Suppresses Neointimal Hyperplasia and Inhibits Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation and Migration via Activation of AMPK Signaling Pathway*. *Front Pharmacol*, 2019. **10**: p. 485.

63. Watanabe, A., *Combined effect of retinoic acid and basic FGF on PAI-1 gene expression in vascular smooth muscle cells*. Cardiovascular Research, 2001. **51**(1): p. 151-159.
64. Neuville, P., et al., *Retinoic acid regulates arterial smooth muscle cell proliferation and phenotypic features in vivo and in vitro through an RARalpha-dependent signaling pathway*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999. **19**(6): p. 1430-6.
65. Li, Z., et al., *Acetylshikonin attenuates angiotensin II-induced proliferation and motility of human brain smooth muscle cells by inhibiting Wnt/beta-catenin signaling*. Hum Cell, 2018. **31**(3): p. 242-250.
66. Liu, L.R., et al., *Interaction of Microglia and Astrocytes in the Neurovascular Unit*. Front Immunol, 2020. **11**: p. 1024.
67. Kim, J.Y., T.H. Kim, and S.S. Kim, *Anti-inflammatory effect of a human prothrombin fragment-2-derived peptide, NSA9, in EOC2 microglia*. Biochem Biophys Res Commun, 2008. **368**(3): p. 779-85.
68. Xu, J. and P.D. Drew, *9-Cis-retinoic acid suppresses inflammatory responses of microglia and astrocytes*. J Neuroimmunol, 2006. **171**(1-2): p. 135-44.
69. Machado-Pereira, M., et al., *Anti-Inflammatory Strategy for M2 Microglial Polarization Using Retinoic Acid-Loaded Nanoparticles*. Mediators Inflamm, 2017. **2017**: p. 6742427.
70. Carradori, D., et al., *Retinoic acid-loaded NFL-lipid nanocapsules promote oligodendrogenesis in focal white matter lesion*. Biomaterials, 2020. **230**: p. 119653.
71. Morrison, V.E., V.N. Smith, and J.K. Huang, *Retinoic Acid Is Required for Oligodendrocyte Precursor Cell Production and Differentiation in the Postnatal Mouse Corpus Callosum*. eNeuro, 2020. **7**(1).
72. Huang, J.K., et al., *Retinoid X receptor gamma signaling accelerates CNS remyelination*. Nat Neurosci, 2011. **14**(1): p. 45-53.
73. Mirzaie, J., et al., *Protective impacts of erythropoietin on myelination of oligodendrocytes and schwann cells in CNS and PNS following cuprizone-induced multiple sclerosis- histology, molecular, and functional studies*. J Chem Neuroanat, 2020. **104**: p. 101750.
74. Kuriakose, D. and Z. Xiao, *Pathophysiology and Treatment of Stroke: Present Status and Future Perspectives*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(20).
75. Machado-Pereira, M., et al., *Challenging the great vascular wall: Can we envision a simple yet comprehensive therapy for stroke?* J Tissue Eng Regen Med, 2018. **12**(1): p. e350-e354.

76. Grysiewicz, R.A., K. Thomas, and D.K. Pandey, *Epidemiology of ischemic and hemorrhagic stroke: incidence, prevalence, mortality, and risk factors*. *Neurol Clin*, 2008. **26**(4): p. 871-95, vii.
77. Barbosa, E., et al., *A systematic review of the cost-effectiveness of emergency interventions for stroke in low- and middle-income countries*. *Afr J Emerg Med*, 2020. **10**(Suppl 1): p. S90-S94.
78. Caprio, F.Z. and F.A. Sorond, *Cerebrovascular Disease: Primary and Secondary Stroke Prevention*. *Med Clin North Am*, 2019. **103**(2): p. 295-308.
79. Maida, C.D., et al., *Neuroinflammatory Mechanisms in Ischemic Stroke: Focus on Cardioembolic Stroke, Background, and Therapeutic Approaches*. *Int J Mol Sci*, 2020. **21**(18).
80. Sacchetti, D.C., K.L. Furie, and S. Yaghi, *Cardioembolic Stroke: Mechanisms and Therapeutics*. *Semin Neurol*, 2017. **37**(3): p. 326-338.
81. Arboix, A. and J.L. Martí-Vilalta, *Lacunar stroke*. *Expert Rev Neurother*, 2009. **9**(2): p. 179-96.
82. Coutts, S.B., *Diagnosis and Management of Transient Ischemic Attack*. *Continuum (Minneapolis, Minn)*, 2017. **23**(1, Cerebrovascular Disease): p. 82-92.
83. Cereda, C.W. and J.M. Olivot, *Emergency Department (ED) Triage for Transient Ischemic Attack (TIA)*. *Curr Atheroscler Rep*, 2018. **20**(11): p. 56.
84. Correa-Paz, C., et al., *New Approaches in Nanomedicine for Ischemic Stroke*. *Pharmaceutics*, 2021. **13**(5).
85. Unnithan, A.K.A. and P. Mehta, *Hemorrhagic Stroke*, in *StatPearls*. 2021: Treasure Island (FL).
86. Roque, C. and G. Baltazar, *Impact of Astrocytes on the Injury Induced by In Vitro Ischemia*. *Cell Mol Neurobiol*, 2017. **37**(8): p. 1521-1528.
87. Mariana, M., et al., *Mifepristone is a Vasodilator Due to the Inhibition of Smooth Muscle Cells L-Type Ca²⁺ Channels*. *Reprod Sci*, 2016. **23**(6): p. 723-30.
88. Wang, Q., et al., *Effect of stem cell-based therapy for ischemic stroke treatment: A meta-analysis*. *Clin Neurol Neurosurg*, 2016. **146**: p. 1-11.
89. Zerna, C., J. Hegedus, and M.D. Hill, *Evolving Treatments for Acute Ischemic Stroke*. *Circ Res*, 2016. **118**(9): p. 1425-42.
90. Goyal, D. and R. Goyal, *Developmental Maturation and Alpha-1 Adrenergic Receptors-Mediated Gene Expression Changes in Ovine Middle Cerebral Arteries*. *Sci Rep*, 2018. **8**(1): p. 1772.
91. Sommer, C.J., *Ischemic stroke: experimental models and reality*. *Acta Neuropathol*, 2017. **133**(2): p. 245-261.

92. Yang, C., et al., *Neuroinflammatory mechanisms of blood-brain barrier damage in ischemic stroke*. Am J Physiol Cell Physiol, 2019. **316**(2): p. C135-C153.
93. Kim, J.H., et al., *All-trans-retinoic acid rescues neurons after global ischemia by attenuating neuroinflammatory reactions*. Neurochem Res, 2013. **38**(12): p. 2604-15.
94. Wang, Y., et al., *Relaxant effect of all-trans-retinoic acid via NO-sGC-cGMP pathway and calcium-activated potassium channels in rat mesenteric artery*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2013. **304**(1): p. H51-7.
95. Gao, C., et al., *Monocarboxylate transporter-dependent mechanism confers resistance to oxygen- and glucose-deprivation injury in astrocyte-neuron co-cultures*. Neurosci Lett, 2015. **594**: p. 99-104.
96. Cairrao, E., et al., *Isolation and culture of human umbilical artery smooth muscle cells expressing functional calcium channels*. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2009. **45**(3-4): p. 175-84.
97. Purkayastha, S. and P.B. Raven, *The functional role of the alpha-1 adrenergic receptors in cerebral blood flow regulation*. Indian J Pharmacol, 2011. **43**(5): p. 502-6.
98. Falkenburger, B.H., E.J. Dickson, and B. Hille, *Quantitative properties and receptor reserve of the DAG and PKC branch of G(q)-coupled receptor signaling*. J Gen Physiol, 2013. **141**(5): p. 537-55.
99. Moore, C.L., et al., *Beta1-adrenergic receptor-mediated dilation of rat cerebral artery requires Shaker-type KV1 channels on PSD95 scaffold*. J Cereb Blood Flow Metab, 2015. **35**(9): p. 1537-46.
100. Longo, L.D. and R. Goyal, *Cerebral artery signal transduction mechanisms: developmental changes in dynamics and Ca²⁺ sensitivity*. Curr Vasc Pharmacol, 2013. **11**(5): p. 655-711.
101. Monge, L., et al., *Role of alpha-adrenoceptors and prostacyclin in the enhanced adrenergic reactivity of goat cerebral arteries after ischemia-reperfusion*. Brain Res, 2010. **1346**: p. 121-31.
102. Tewari, V.K., et al., *Intracarotid Sodium Nitroprusside on Fifth Post Ischemic Stroke Day in Middle Cerebral Artery Occlusion Rat Model*. J Clin Diagn Res, 2017. **11**(8): p. AF01-AF04.
103. Yao, X., et al., *Nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate inducers sodium nitroprusside and L-arginine inhibit the proliferation of gastric cancer cells via the activation of type II cyclic guanosine monophosphate-dependent protein kinase*. Oncol Lett, 2015. **10**(1): p. 479-484.

104. Cogolludo, A.L., et al., *Mechanisms involved in SNP-induced relaxation and $[Ca^{+}]_i$ reduction in piglet pulmonary and systemic arteries*. Br J Pharmacol, 2001. **132**(4): p. 959-67.
105. Hirokawa, K., et al., *Inhibition of nitric oxide synthesis in vascular smooth muscle by retinoids*. Br J Pharmacol, 1994. **113**(4): p. 1448-54.