



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR  
Ciências

# **Papel das Metalotioneínas I/II na Regulação do Estado de Activação da Microglia pelos Astrócitos**

**Diana Vanessa Cunha Rodrigues**

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

Orientador: Prof. Doutora Carla Fonseca  
Co-orientador: Prof. Doutora Graça Baltazar

**Covilhã, Outubro de 2011**



# Agradecimentos

Queria agradecer a todas as pessoas que me apoiaram, directa ou indirectamente, e que acreditaram sempre em mim. Sem essas pessoas não era possível a execução e conclusão deste trabalho.

À Prof. Doutora Carla Fonseca, pela sua enorme disponibilidade, compreensão, paciência, por todos os conselhos que se revelaram fundamentais na realização deste trabalho e principalmente pela orientação e ajuda nos momentos mais difíceis.

À Prof. Doutora Graça Baltazar, pelo apoio, pelos conselhos que se revelaram fundamentais em várias etapas na execução do trabalho laboratorial e pela motivação.

Aos meus colegas do Centro de Investigação em Ciências da Saúde (CICS), Susana e Paulo, pela disponibilidade, ajuda, amizade, pelo espírito de equipa e principalmente pelos momentos de descontração e alegria durante o trabalho laboratorial.

A todos os meus amigos, em especial à Joana, Andreia, Emanuel, Diana, Daniela, Pedro, Mara, Melissa e Gonçalo por estarem sempre a incentivar-me, pela força transmitida, pela amizade, carinho e paciência.

Aos meus pais pelo apoio incondicional, pelo incentivo, paciência e pela dedicação demonstrada ao longo de toda a minha vida. Sem eles não era possível a conclusão de mais uma etapa da minha vida.

Um agradecimento especial aos meus irmãos Sérgio e Paula, pelo constante apoio, incentivo e ajuda nos momentos mais difíceis.

À minha família, em especial à minha madrinha Céu, pelo apoio e carinho transmitido.



## Resumo

A doença de Parkinson é caracterizada pela perda selectiva de neurónios dopaminérgicos na *substantia nigra pars compacta*. A origem desta doença não é completamente compreendida e têm sido propostas diversas hipóteses em relação aos possíveis factores envolvidos na degeneração e perda dos neurónios dopaminérgicos nesta região. Entre elas, encontra-se a neuroinflamação, que é cada vez mais reconhecida como o principal factor na patogénese da doença de Parkinson. Inúmeras evidências têm sugerido que as células microgliais são a fonte predominante de inflamação que contribui para a neurodegeneração dopaminérgica. Os astrócitos desempenham funções importantes na manutenção da função normal do cérebro, podendo actuar como reguladores fisiológicos prevenindo as respostas microgliais inflamatórias excessivas. No entanto, pouco se sabe sobre a forma como os astrócitos modulam a activação microglial. Dada a relevância das interacções astrócitos-microglia na regulação da neuroinflamação, é importante identificar mediadores envolvidos neste processo, os quais podem actuar como agentes anti-inflamatórios naturais no cérebro. Neste trabalho, o principal objectivo foi o estudo do efeito da MT-I/II libertada pelos astrócitos na activação microglial induzida pelo agente inflamatório Zymosan A. Para a determinação do efeito da MT-I/II na actividade microglial, culturas primárias de microglia do mesencéfalo ventral foram previamente expostas, a meio condicionado de astrócitos (ou meio de cultura - controlo), e posteriormente tratadas com 0.5 µg/mL de Zymosan A. Verificou-se que a pré-incubação das células microgliais com o meio condicionado de astrócitos preveniu o aumento da actividade microglial induzida pelo Zymosan A, mantendo a actividade fagocítica bem como os níveis de produção de NO semelhantes aos níveis de controlo. Para avaliar a importância da MT-I/II libertada pelos astrócitos na prevenção da activação microglial induzida pelo Zymosan A, foi usado um anticorpo primário de forma a bloquear a acção da MT-I/II, presente no meio condicionado pelos astrócitos. Assim, este meio foi tratado com anti-MT-I/II e, adicionado às culturas de microglia posteriormente expostas a Zymosan A. Observou-se que o bloqueio da acção da MT-I/II previne completamente a activação microglial induzida pelo Zymosan A. A importância da MT-I/II na prevenção da activação microglial induzida pelo Zymosan A foi confirmada em experiências semelhantes mas utilizando anticorpo anti-MT-I/II desnaturado. De seguida avaliou-se o efeito da adição da MT-IIA na modulação da reactividade microglial. Os resultados mostraram que a MT-IIA previne eficazmente a activação microglial induzida pelo Zymosan A. O modo como estas metalotioneínas modulam a reactividade microglial e os receptores envolvidos não é ainda conhecido. Os receptores de metalotioneínas LRP1 e megalina são possíveis candidatos a testar. Assim, avaliou-se a expressão do receptor LRP1 pela microglia do mesencéfalo ventral por imunocitoquímica, verificando-se que o mesmo é expresso nestas células. Assim, trabalhos futuros deverão avaliar a sua contribuição para o efeito anti-inflamatório das MT-

I/II, em particular da MT-IIA. Em resumo, os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que as MT-I/II e, em particular a MT-IIA, libertadas pelos astrócitos, são capazes de modular as respostas inflamatórias microgliais. Estes resultados poderão contribuir para o desenvolvimento de uma possível terapia de prevenção da neuroinflamação, e indirectamente reduzir o desenvolvimento da Doença de Parkinson.

## Palavras-chave

Doença de Parkinson; Neuroinflamação; Microglia; Astrócitos; Metalotioneínas I/II; Metalotioneína-IIA.



# Abstract

Parkinson's disease is characterized by the progressive loss of dopaminergic neurons in the *substantia nigra pars compacta*. The origin of this disease is not completely understood and several hypotheses have been proposed regarding the possible factors involved in the degeneration and loss of dopaminergic neurons in this area. Among them, neuroinflammation, is increasingly recognized as a major factor in the pathogenesis of Parkinson's disease. Several evidences suggest that microglial cells are the predominant source of inflammation that contributes to dopaminergic neurodegeneration. Astrocytes have an important role in the maintenance of normal brain function and they could act as physiological regulators preventing excessive inflammatory microglial responses. However, little is known about how astrocytes may modulate microglial activation. Given the importance of microglia-astrocyte interactions in the regulation of neuroinflammation, it is important to identify mediators involved in this process, which could act as natural anti-inflammatory agents in the brain. In the present work, the main goal was to study the effect of MT-I/II released by astrocytes in microglial activation induced by the inflammatory agent Zymosan A. To determine the effect of MT-I/II on microglial activity, primary cultures of microglia obtained from the ventral midbrain were previously exposed, to media conditioned by astrocytes (or culture medium - control) and then treated with 0.5 µg/mL Zymosan A. It was found that astrocytes conditioned media were able to prevent an increase in microglial activity induced by Zymosan A, keeping the levels of phagocytic activity and production of NO similar to control levels. To evaluate the role of MT-I/II released by astrocytes in the prevention of microglial activation induced by Zymosan A, an primary antibody was used to block the action of MT-I/II. Thus, astrocytes conditioned media were treated with anti-MT-I/II and added to the microglial cultures, which were then exposed to Zymosan A. It was observed that MT-I/II is able to completely prevent microglial activation induced by Zymosan A. To confirm this, we proceeded to the denaturation of the antibody anti-MT-I/II prior to its addition to the media conditioned by astrocytes, and subsequent application to the microglial cultures. The results obtained corroborated with a role of MT-I/II in the modulation of microglial reactivity by astrocytes. We further evaluated the role of MT-IIA in this process by exogenously adding this protein to the microglial culture medium prior to Zymosan A treatment. We found that MT-IIA is able to prevent the Zymosan A-induced microglial activation. The mechanism by which metallothioneins modulate microglial reactivity as well as the receptors involved are still unknown. The LRP1 and megalin metallothionein receptors are good candidates to be tested. Therefore, the expression of LRP1 receptor by microglial cells was investigated by immunocytochemistry. The results showed that the LRP1 receptor is present in microglial cells obtained from the ventral midbrain. Hence, future work should focus on its role in mediating the anti-inflammatory effect of MT-I/II and, in particular, of MT-IIA. In summary,

the results obtained in this work show that astrocyte-derived MT-I/II and, specifically MT-IIA, are able to modulate microglia inflammatory responses. These results may contribute to the development of a potential therapy for preventing neuroinflammation, and indirectly reduce the development of Parkinson's Disease.

# Keywords

Parkinson's Disease; Neuroinflammation; Microglia; Astrocytes; Metallothionein-I/II;  
Metallothionein-IIA.



# Índice

Agradecimentos	iii
Resumo	v
Palavras-chave	vii
Abstract	ix
Keywords	xi
Índice	xiii
Lista de Figuras	xvi
Lista de Tabelas	xix
Lista de Acrónimos	xxi
<b>Capítulo 1 - Introdução</b>	<b>1</b>
1.1. Microglia	1
1.1.1. Factores expressos e libertados pela Microglia	4
1.2. Neuroinflamação e Doenças Neurodegenerativas	5
1.2.1. Doença de Parkinson	6
1.2.2. Modelos da etiologia da Doença de Parkinson	8
1.2.3. Microglia e a Doença de Parkinson	9
1.3. Astrócitos	11
1.3.1. Factores libertados pelos Astrócitos	12
1.3.2. Interacção Astrócitos-microglia	13
1.3.3. Metalotioneínas	14
<b>Capítulo 2 - Objectivos</b>	<b>18</b>
<b>Capítulo 3 - Materiais e Métodos</b>	<b>19</b>
3.1. Materiais	19
3.2. Culturas Mistas Gliais do Mesencéfalo Ventral	19
3.2.1. Culturas enriquecidas em microglia e astrócitos do mesencéfalo ventral	20
3.3. Estimulação da Microglia	22
3.4. Ensaio de viabilidade celular - MTT	22
3.5. Neutralização da acção da MT-I/II no MCA	23
3.6. Papel da MT-IIA na modulação da reactividade microglial	23
	xiii

3.7.	Determinação dos níveis de EROs	23
3.8.	Medição da produção de óxido nítrico (NO) pela microglia	24
3.9.	Avaliação da actividade fagocítica da microglia	24
3.10.	Imunocitoquímica	25
3.11.	Análise de dados e estatística	25
<b>Capítulo 4 - Resultados</b>		<b>26</b>
4.1.	Ensaio com o estímulo inflamatório LPS	26
4.1.1.	Medição da actividade fagocítica, dos níveis de EROs e produção de NO pela microglia na presença de LPS	26
4.2.	Ensaio com o estímulo inflamatório ZyA	28
4.2.1.	Avaliação dos níveis de EROs, produção de NO e actividade fagocítica pela microglia exposta ao estímulo inflamatório ZyA	28
4.3.	Efeito do MCA na actividade fagocítica e produção de NO pela microglia exposta ao estímulo inflamatório ZyA	30
4.4.	Avaliação do bloqueio da acção da MT I/II presente no MCA na activação microglial induzida por ZyA	32
4.5.	Importância da MT-IIA na prevenção da activação microglial induzida pelo ZyA	34
4.6.	Avaliação da viabilidade celular da microglia na presença do estímulo inflamatório ZyA	35
4.7.	Avaliação da expressão do receptor LRP1 na microglia	36
<b>Capítulo 5 - Discussão dos resultados</b>		<b>37</b>
<b>Capítulo 6 - Conclusão</b>		<b>44</b>
<b>Capítulo 7 - Perspectivas Futuras</b>		<b>45</b>
<b>Anexo I</b>		<b>46</b>
<b>Referências bibliográficas</b>		<b>47</b>



## Lista de Figuras

**Figura 1 - Imagem representativa da “plasticidade funcional” da microglia.** Uma lesão neuronal causa a activação da microglia através de sinais emitidos pela lesão. O grau de activação da microglia depende da gravidade das lesões (adaptado de Streit, et al., 1999). 2

**Figura 2 - Neuropatologia da Doença de Parkinson. Representação esquemática da via nigroestriatal normal (A) e na DP (B).** A imagem representa a despigmentação da SNpc devido à degeneração dos neurónios dopaminérgicos (adaptado de Dauer & Przedborski, 2003). 7

**Figura 3 - Representação da tripsinização da cultura glial mista do córtex cerebral, com separação dos astrócitos e da microglia.** A) Aspecto da cultura mista confluyente antes da tripsinização. B) Aspecto da cultura durante a tripsinização, com a camada de astrócitos a soltar-se. C) Aspecto da cultura após a tripsinização, só com a microglia aderente ao fundo da placa de cultura (Adaptado de: Saura, et al., 2003) 21

**Figura 4 - Avaliação dos níveis de EROS (A), da produção de NO (B) e actividade fagocítica (C) em culturas de microglia expostas a LPS (1 µg/mL).** Os dados apresentados são expressos em percentagem de controlo (NO e EROs) ou percentagem do número total de células (fagocitose) e representam a média de 3 experiências independentes para EROs e 2 experiências independentes para NO e fagocitose. 27

**Figura 5 - Produção de EROs pela microglia ao longo do tempo na presença de ZyA 0.5µg/mL.** Os dados apresentados são expressos em percentagem do controlo e representam a média de 4 experiências independentes, à excepção das 0,15 e 0,5 horas que só representam 1 experiência, todas realizadas em triplicado. 28

**Figura 6 - Avaliação da produção de NO pela microglia ao longo do tempo na presença de ZyA 0.5µg/mL.** Os dados apresentados são expressos em percentagem controlo e representam a média de 4 experiências independentes, à excepção das 0,15 e 0,5 horas que só representam 1 experiência, todas realizadas em triplicado. \*\*\*P <0.001 quando comparado com o controlo. 29

**Figura 7 - Avaliação da actividade fagocítica da microglia ao longo do tempo na presença de ZyA 0.5µg/mL.** Os dados apresentados são expressos em percentagem de células fagocíticas relativamente ao número total de células e representam a média de 1

experiência, à exceção das 24 horas e controlo que representam 3 experiências, todas realizadas em duplicado. \*\*\*P <0.001 quando comparado com o controlo. 29

**Figura 8 - Avaliação da produção de NO pela microglia exposta ao MCA ou DMEM (controlo), durante 24 horas, e posteriormente incubada com ZyA 0.5µg/mL durante 5 horas.** Os dados apresentados são expressos em percentagem do controlo e representam a média de 3 experiências independentes realizadas em triplicado. \*P <0.05 e \*\*P <0.01 quando comparado com o controlo, ###P <0.001 quando comparado com o ZyA. 30

**Figura 9 - Avaliação da actividade fagocítica pela microglia exposta a MCA ou DMEM (controlo) durante 24 horas, e posteriormente incubada com ZyA 0.5µg/mL durante 24 horas.** Os dados apresentados são expressos em percentagem de células fagocíticas relativamente ao número total de células e representam a média de 3 experiências realizadas em duplicado. \*\*\*P <0.001 quando comparado com o controlo, ###P <0.001 quando comparado com o ZyA. 31

**Figura 10 - Avaliação da contribuição da MT-I/II na prevenção, pelos astrócitos, da activação microglial induzida pelo ZyA 0.5 µg/mL.** Os dados apresentados são expressos em percentagem de células fagocíticas relativamente ao número total de células (A) e expressos em percentagem do controlo (B) e representam a média de 5 experiências realizadas em duplicado (A) e triplicado (B). \*P <0.05, \*\*P <0.01 e \*\*\*P <0.001 quando comparado com o controlo, ##P <0,01 e ###P <0.001 quando comparado com o ZyA, \*\*P <0.01 e \*\*\*P <0.001 quando comparado com o MCA e <sup>SSS</sup>P <0.001 quando comparado com a anti-MT+MCA+ZyA. 32

**Figura 11 - Avaliação do papel da MT-IIA na prevenção da activação microglial induzida pela concentração de ZyA 0.5 µg/mL.** A microglia foi incubada com DMEM, durante 24 horas, na ausência (controlo) e na presença de diferentes concentrações de MT-IIA (3,5; 50 e 100ng/mL) sendo posteriormente exposta a ZyA 0,5µg/mL por um período adicional de 24 horas (A) ou 5 horas (B). Os dados apresentados são expressos em percentagem de células fagocíticas relativamente ao número total de células (A) e em percentagem do controlo (B) e representam a média de 3 experiências realizadas independente em duplicado (A) e triplicado (B). \*\*\*P <0.001 e \*\*P <0.01 quando comparado com o controlo, ###P <0.001 e ##P <0.01 quando comparado com o ZyA e <sup>SSS</sup>P <0.001 quando comparado com a MT 3.5+ZyA. 34

**Figura 12 - Avaliação da viabilidade celular da microglia na ausência (controlo) e na presença de ZyA 0,5µg/mL, durante vários tempos de incubação, através do ensaio de MTT.** Os dados apresentados são expressos em percentagem do controlo e representam a média de uma experiência realizada em triplicado. 35

**Figura 13 - Avaliação da expressão do receptor LRP1 na microglia do mesencéfalo ventral.** Imagem de fluorescência representativa da cultura de microglia incubada previamente com anticorpo anti-LRP1. A imagem foi obtida através de um microscópio de fluorescência invertido Zeiss (Axiobserver Z1, Zeiss); ampliação 40x. 36

**Figura 14 - Avaliação da expressão da MT I/II na microglia.** Imagens de microscopia de fluorescência obtida no microscópio confocal, da cultura de microglia incubada previamente com o anticorpo Anti-MT-I/II (verde) e Hoescht (azul). 46

# Lista de Tabelas

Tabela 1- Optimização do tempo de incubação com ZyA e LPS para cada método utilizado. 22



# Lista de Acrónimos

COX2	Ciclo-Oxigenase 2
DA	Doença de Alzheimer
DCF	2',7'-Diclorofluoresceína (forma oxidada)
DCFDA	2,7'- Diacetato de Diclorofluoresceína
DCFH	2'-7'-Diclorofluoresceína (forma oxidável)
DH	Doença de Huntington
DMEM	Meio de Eagle Modificado por Dulbecco
DP	Doença de Parkinson
DPr	Doença da proteína do Prião
ELA	Esclerose Lateral Amiotrófica
EM	Esclerose Múltipla
EROs	Espécies Reactivas de Oxigénio
ERNs	Espécies Reactivas de Azoto
FBS	Soro Fetal Bovino
GFAP	Proteína Ácida Fibrilar Glial
GM-CSF	Factores estimuladores de colónia de macrófagos/granulócitos
HO-1	Heme Oxigenase-1
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular 1
IL	Interleucina
IFN- $\gamma$	Interferão- $\gamma$
iNOS	Isoforma indutível da sintase do NO
KO	Knockout
L-DOPA	L-3,4-dihidroxifenilalanina
LPS	Lipopolissacárido
LRP1	Receptor da família das lipoproteínas de baixa densidade
MCA	Meio Condicionado de Astrócitos
M-CSF	Factores estimuladores de colónia de macrófagos
MHC	Complexo Maior de Histocompatibilidade
MMP	Metaloproteinases da Matriz
MPP <sup>+</sup>	1-metil-4-fenilpiridínio
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
MT	Metalotioneína
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo de difeniltetrazolino
NADPH	Forma reduzida do dinucleótido de adenina nicotinamida fosfato
NED	N-1-naftiletilediamina dihidrocloro
NGF	Factor de crescimento neuronal

NO	Óxido Nítrico
NT-3	Neurotrofina-3
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Anião Superóxido
OHDA	Hidroxidopamina
ONOO-	Anião Peroxinitrito
PBS	Tampão fosfato salino
PBS-T	PBS com Tween-20
PDL	Poli-D-lisina
SN	<i>Substantia Nigra</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
SNpc	<i>Substantia Nigra Pars Compacta</i>
SP	Estreptomicina-Penicilina
TGF-β	Factor de crescimento transformador beta
TNF-α	Factor de necrose tumoral alfa
WT	Wild-type
ZyA	Zymosan A



# Capítulo 1 - Introdução

## 1.1. Microglia

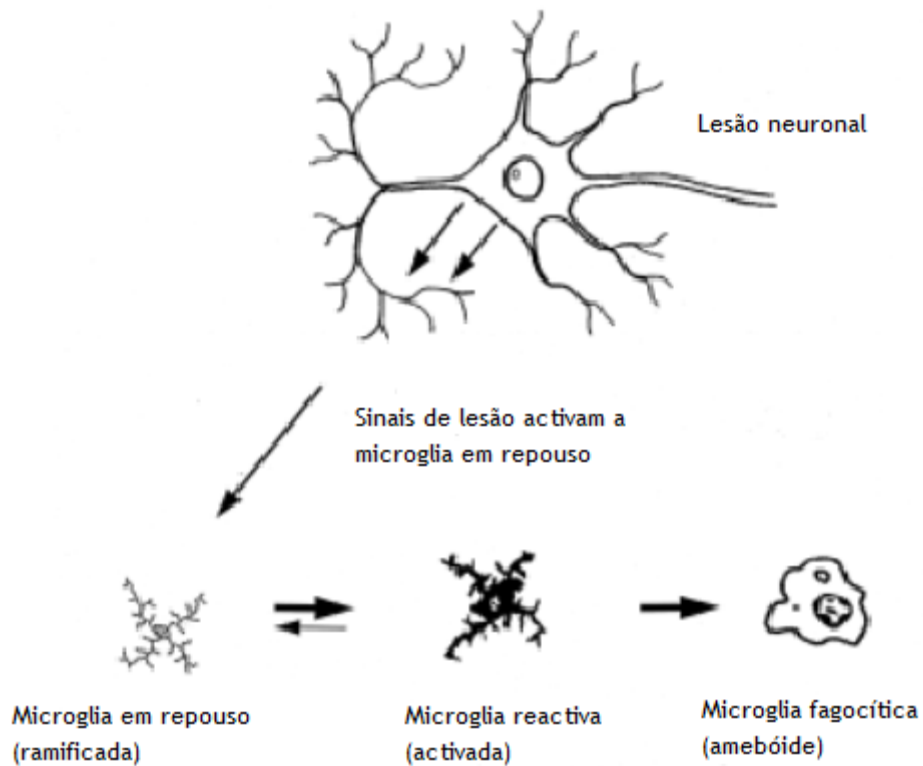
As microglias são as células imunes residentes no sistema nervoso central (SNC), constituem cerca de 10% de todas as células da glia e são derivadas de monócitos circulantes do sangue (Frank-Cannon, et al., 2009; Glass, et al., 2010). Estas células são designadas como os macrófagos residentes do tecido do SNC sendo o principal mediador da inflamação (Frank-Cannon, et al., 2009; Glass, et al., 2010; Takeuchi, 2010; Qian & Flood, 2008). Estas células vigiam constantemente o microambiente e produzem factores que influenciam os astrócitos circundantes (outro tipo de célula glial com funções de apoio) e os neurónios (Glass et al., 2010). Durante a remodelação e maturação do cérebro, a microglia diferencia-se como um componente integral celular do SNC e tem uma morfologia muito semelhante à de outras células do SNC, com muitas extensões citoplasmáticas irradiando a partir do corpo celular (Streit, et al., 2005) sendo uma das suas principais funções ajudar na eliminação de células consideradas tóxicas através da morte celular programada (Liu & Hong, 2003).

No cérebro normal, a microglia em repouso aparece distribuída desigualmente, sendo que a densidade de microglia é notavelmente maior na *substantia nigra* (SN) em comparação com outras áreas do mesencéfalo e regiões do cérebro como o hipocampo (Przedborska, 2004).

Acredita-se que a microglia está principalmente envolvida na remoção de restos celulares, na reparação dos tecidos e homeostase celular, com um programa de actividades de apoio e protecção, para salvaguardar os mecanismos de defesa inato, ou para ajudar nas reacções imunológicas específicas (Hanisch, 2002; Liu & Hong, 2003). Estas células também têm como funções a proliferação celular, migração, fagocitose, regulação de células apresentadoras de antígenos, regulação de receptores de superfície de células da imunidade inata (receptor complemento, e receptores Fc), e a secreção de mediadores pró-inflamatórios (Vilhardt, 2005; Rossum, et al., 2004; Takeuchi, 2010), compartilhando assim muitas das funções dos macrófagos (Eder, 1998).

Atraídos por factores quimiostáticos endógenos e exógenos, microglia tem a capacidade de migrar em direcção ao local da lesão ou infecção no SNC (Mastroeni, et al., 2009). Moléculas de complexo maior de histocompatibilidade (MHC) classe I e II são expressos pela microglia, embora em níveis baixos, e são activamente regulados pelo microambiente imuno-quiescente do SNC (Tambuyzer, et al., 2009).

Estudos recentes, classificaram a microglia em três classes para descrever o seu estado de activação: microglia em repouso, microglia activada, e microglia amebóide fagocítica (Kim & Vellis, 2005) como se pode verificar na figura 1.



**Figura 1** - Imagem representativa da “plasticidade funcional” da microglia. Uma lesão neuronal causa a activação da microglia através de sinais emitidos pela lesão. O grau de activação da microglia depende da gravidade das lesões (adaptado de Streit, et al., 1999).

Relativamente à figura 1, o termo plasticidade descreve os processos de transformação morfológica/fenotípica da microglia amebóide na forma ramificada durante o desenvolvimento. Além disso, as microglias em repouso ramificadas são capazes de se diferenciar na forma amebóide, um processo muitas vezes referido como “plasticidade funcional” (Tambuyzer, et al., 2009).

No cérebro normal saudável, microglia em repouso, tem uma morfologia ramificada composta por pequenos corpos celulares e numerosas ramificações (Przedborska, 2004) e exibe um fenótipo desactivado que está associado à vigilância imunológica, defesa do hospedeiro e produção de factores anti-inflamatórios e neurotróficos, libertando baixos níveis de factores de crescimento (Chung, et al., 2010; Glass, et al., 2010). Estas células em repouso, são extremamente sensíveis a qualquer forma de perturbação dentro do microambiente neuronal. Com algum grau de alteração patológica, rapidamente passam a uma forma activa (Whitton, 2007). A transformação da microglia de um estado de repouso para um estado

activo é caracterizado pela proliferação, por várias mudanças imunofenotípicas e morfológicas das células, com uma regulação do MHC, hipertrofia e transformação para uma morfologia amebóide (Kim & Vellis, 2005; Sullivan & Nolan, 2009; Orr, et al., 2002).

Sob condições de exposição do cérebro à infecção, a estímulos inflamatórios ou interacção com células derivadas de sangue, a microglia é activada, prolifera (Przedborska, 2004) e realiza várias funções da imunidade inata incluindo a indução de citotoxicidade e inflamação (Orr, et al., 2002), levando à formação de citocinas inflamatórias, como o factor de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e a interleucina (IL)-1 $\beta$ , o óxido nítrico (NO) e as espécies reactivas de oxigénio (EROs) (Kim, et al., 2000; Floden & Combs, 2007; Eder, 1998). Se a indução com o estímulo activador persistir, a morfologia funcional da microglia mantém-se com uma sobre-regulação elevada de moléculas de MHC-II, receptores complemento e glicoproteínas inflamatórias como CD40, B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86), que fornecem um estímulo potente para a activação de células imunitárias. Se o estímulo responsável pela activação da microglia desaparecer, esta pode diminuir gradualmente em número, perde os marcadores de activação e reverte para o estado de repouso (Orr, et al., 2002; Chung, et al., 2010; Fujita, et al., 1996). Se, no entanto, o estímulo patológico persistir, ocorre um aumento nos níveis dos marcadores de activação e moléculas de adesão celular e finalmente, há transformação da microglia em células fagocíticas (Orr, et al., 2002).

A microglia activada facilita diversas funções benéficas, incluindo a promoção da sobrevivência neuronal pela libertação de factores neurotróficos, eliminação de restos celulares e substâncias tóxicas (Takeuchi, 2010) e, na maioria dos casos, estas respostas são auto-limitadas, reparando a infecção ou o dano tecidual (Glass, et al., 2010). Além destas funções, a microglia activada pode ainda estar envolvida na reparação neuronal e neurogénese (Takeuchi, 2010).

Apesar de terem um papel crítico na defesa do hospedeiro através da remoção de patógenos invasores, ou pela secreção de factores neurotróficos, a microglia pode agravar os efeitos da inflamação e degeneração neuronal (Kim & Joh, 2006). A microgliose (acumulação de microglia activada) é uma característica patológica que tem sido observada em distúrbios neurológicos que incluem, trauma, isquémia, epilepsia, inflamação e doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer (DA), a doença de Parkinson (DP), a esclerose lateral amiotrófica (ELA), e a esclerose múltipla (EM) (Giulian, et al., 1993; Kim & Vellis, 2005; Takeuchi, 2010; Qian & Flood, 2008; Sullivan, & Nolan, 2009).

### 1.1.1. Factores expressos e libertados pela Microglia

Tem sido demonstrado que a activação da microglia, após 24 horas de exposição a um estímulo, leva a uma reactividade microglial elevada e, se o estímulo activo persistir, a microglia, de seguida, procede à aderência aos neurónios dirigida por quimiocinas, como a proteína quimioatráctiva de monócitos-1 e interferão que são expressas pelo próprios neurónios (Whitton, 2007).

A maioria dos factores produzidos pela microglia activada são factores pró-inflamatórios e neurotóxicos (Liu & Hong, 2003), conduzindo a um processo designado de “*burst* respiratório” (Qian & Flood, 2008). Este fenómeno é então caracterizado pela libertação de NO, EROs, peroxinitrito, superóxido, e peróxido de hidrogénio (Takeuchi, 2010; Qian & Flood, 2008). Várias outras moléculas também estão envolvidas quando a microglia é activada, como o ácido quinolínico, metaloproteinasas da matriz (MMP), ácido araquidónico, quimiocinas (proteína inflamatória dos macrófagos MIP-1 $\alpha$ , e interferão- $\gamma$ ), citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6), e excitotoxinas incluindo o glutamato (Mosley et al., 2006; Liu & Hong, 2003). Estes podem promover o estado inflamatório (Cannon et al., 2009). Juntos, esses mediadores químicos têm como função mediar uma resposta destrutiva do tecido, bem como regular a activação da resposta inflamatória e ainda regular células gliais e neuronais vizinhas do SNC no local da inflamação. Como resultado, essas moléculas inflamatórias são mediadores altamente eficazes da resposta inflamatória e, se não for controlada, pode agravar a inflamação e levar à lesão do tecido (Qian & Flood, 2008).

O NO é um possível mediador envolvido na activação microglial, devido à sua citotoxicidade em diversos tipos celulares (Yang, et al., 2007). Este reage com o anião superóxido ( $O_2^-$ ), para a produção de aniões peroxinitrito, ONOO $^-$ , altamente reactivos. Estes aniões, por sua vez, podem levar a modificações no ADN, bem como modificar covalentemente resíduos de tirosina que pode desencadear a apoptose celular ou necrose. Citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- $\alpha$  e IL-1, também podem desencadear toxicidade directa nos neurónios e podem potencializar uma resposta inflamatória em série, aumentando a produção de NO microglial (Hald, et al., 2007).

A microglia produz dois tipos de EROs, extracelular e intracelular. As EROs intracelulares agem como segundos mensageiros que são cruciais não só na função pró-inflamatória, mas também na homeostase celular, enquanto que EROs extracelulares são fortes factores neurotóxicos que induzem danos neuronais oxidativos (Takeuchi, 2010). Estes últimos, medeiam a activação da microglia induzida por vários estímulos inflamatórios, incluindo  $\beta$ -amilóide (A $\beta$ ), plasminogénio, gangliosídeos, IFN $\gamma$ , e LPS (Yang, et al., 2007).

Recentemente, foi descrito o papel anti-inflamatório e antioxidante da heme oxigenase-1 (HO-1) (Yang, et al., 2007). Todos os produtos da HO-1 suprimem a expressão da forma

indutível da sintase do NO (iNOS) induzida pelo IFN- $\gamma$  e/ou a produção de TNF- $\alpha$  na microglia. IL-4, IL-10, IL-13 e o factor de crescimento transformador-B (TGF-B) são as citocinas anti-inflamatórias mais caracterizadas, que são desencadeadas por vários estímulos inflamatórios. Por exemplo, o LPS e a trombina estimulam a produção de IL-4, IL-10 e IL-13 nos astrócitos e/ou microglia (Yang, et al., 2007). A apoptose de células inflamatórias activadas, incluindo microglia, é um importante mecanismo regulador da inflamação (Yang, et al., 2007).

## 1.2. Neuroinflamação e Doenças Neurodegenerativas

Inflamação é a primeira resposta do sistema imunitário do nosso corpo contra a infecção originada por agentes patogénicos, incluindo bactérias, parasitas e vírus (Lee, et al., 2006). A resposta inflamatória representa um programa biológico altamente regulado que, por um lado, deve permitir que os sistemas imunes inato e adaptativo consigam combater a divisão rápida de patógenos, e, por outro lado, envolve a produção de factores que são eles próprios capazes de induzir patologias significantes nos tecidos (Glass, et al., 2010).

A neuroinflamação é definida como um grupo de processos patológicos e condições que ocorrem no cérebro, que normalmente leva à morte neuronal e consequente perda de função. Em doenças neurodegenerativas, a inflamação pode ser desencadeada pela acumulação de proteínas agregadas ou com conformação anormal, por sinais ou moléculas libertadas por neurónios lesados ou através de desequilíbrios entre os processos pró e anti-inflamatórios (Wyss-Coray & Mucke, 2002). Numerosos estudos têm contribuído para se conhecer as possíveis causas etiológicas para as doenças neurodegenerativas. Muitos desses estudos sugerem semelhanças de diversos mecanismos entre estas doenças, incluindo formação de EROs, levando ao desenvolvimento de stress oxidativo e consequentemente inflamação (Williams, et al., 2011; Wyss-Coray & Mucke, 2002).

As doenças neurodegenerativas mais importantes, tais como a DA, a DP, a doença da proteína do Prião (DPr), a doença de Huntington (DH), e a ELA, são todas definidas pela perda progressiva de células neuronais específicas, pela actividade anormal dos componentes das proteínas, que patologicamente se acumulam no cérebro e pelo stress oxidativo (Bolognin, et al., 2009; Schulz, et al., 2000). A resposta neuroinflamatória inclui a activação de células da imunidade inata do SNC, microglia e astrócitos, resultando num fenótipo fagocitário e libertação de mediadores inflamatórios como citocinas e quimiocinas (Frank-Cannon, et al., 2009; Lee, et al., 2006).

A microglia e os astrócitos cuja função principal é a defesa do cérebro, são as primeiras células no SNC que respondem a lesões, e são fortemente activadas em doenças neurodegenerativas (Wyss-Coray & Mucke, 2002).

Há uma necessidade de adquirir uma melhor compreensão de ambos os factores etiológicos e patogénicos implicados nos processos neurodegenerativos, não só para prevenir as doenças, mas também para desenvolver estratégias terapêuticas visando travar a sua progressão (Przedborskia, 2004).

### 1.2.1. Doença de Parkinson

A DP foi descrita pela primeira vez em 1817 por James Parkinson. É a segunda doença neurodegenerativa mais comum, após a DA (Long-Smith, et al., 2009; Jomova, et al., 2010). Actualmente, cerca de 2% da população acima de 60 anos é afectada por esta patologia (Lin, et al., 2009).

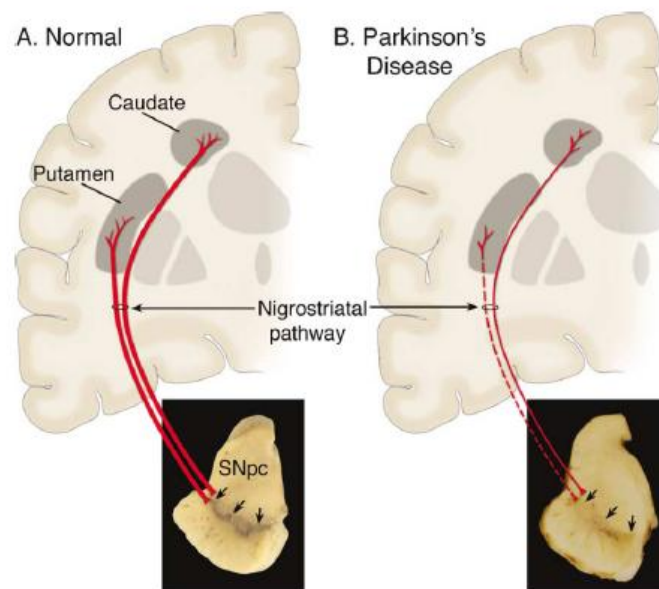
As características clínicas proeminentes são os sintomas motores (tremor, bradicinesia, rigidez e instabilidade postural) e sintomas não-motores (défice olfactivo, disfunção autonómica, depressão, défice cognitivo e distúrbios do sono). Assim como a DA, também a DP é uma proteínopatia, isto é, é caracterizada pela acumulação e agregação de  $\alpha$ -sinucleína, que consiste numa proteína pré-sináptica solúvel. As características neuropatológicas são: inclusões intracelulares contendo  $\alpha$ -sinucleína designadas de corpos de Lewy e neurites de Lewy e a degeneração progressiva dos neurónios na SN *pars compacta* (SNpc), uma pequena área de células dopaminérgicas localizada no mesencéfalo ventral, com consequente diminuição de dopamina no estriado (Glass, et al., 2010; Bolognin, et al., 2009; Frank-Cannon, et al., 2009; Jomova, et al., 2010; Mosley, et al., 2006; Przedborskia, 2004; Reynolds, et al., 2007; Chung, et al., 2010; Orr, et al., 2002; Whitton, 2007).

A causa da DP permanece desconhecida, mas a disfunção mitocondrial, o stress oxidativo, os factores ambientais e a predisposição genética têm sido propostos como factores etiológicos. Destes factores destacam-se também, o envelhecimento, a exposição a pesticidas ambientais, um histórico de depressão, as infecções virais / bacterianas, os metais, as drogas antipsicóticas/antidepressivas, o uso habitual do tabaco ou a exposição ao fumo (Mazzio, et al., 2011; Bolognin, et al., 2009). Vários estudos epidemiológicos também demonstraram que a exposição a metais como Cu, Zn, Mn, Fe e Al pode estar associada com o aumento da incidência desta doença (Bolognin, et al., 2009). O stress oxidativo tem sido associado, tanto a uma fase inicial da doença como à sua progressão, mas várias descobertas sugerem que o processo neurodegenerativo começa pelos neurónios afectados por algum factor etiológico, resultando numa cascata de eventos que incluem a formação de EROs (Bolognin, et al., 2009). Outros factores importantes, que envolvem inflamação, acção tóxica do óxido nítrico,

defeitos na libertação de proteínas, e disfunção mitocondrial, contribuem para a etiologia da DP (Jomova, et al., 2010; Mosley, et al., 2006). Uma série de estudos tem confirmado a presença de mediadores inflamatórios, incluindo o TNF- $\alpha$ , a IL-1 $\beta$ , a IL-6, e o IFN- $\gamma$  no líquido cefalorraquidiano de pacientes com DP, assim como na SNpc em cérebros *post-mortem* de pacientes (Cannon, et al., 2009).

Uma linha de pesquisa propõe que a morte neuronal, incluindo a libertação de agregados de proteínas, induz a activação da microglia. Originalmente descrita como sendo uma doença caracterizada pela perda neuronal, a DP é agora reconhecida como tendo um componente inflamatório (Glass, et al., 2010).

Como se pode verificar na Figura 2, os corpos celulares dos neurónios nigroestriatais estão na SNpc, e projectam-se principalmente para o *caudado-putamen* (zona envolvida na regulação do movimento). A perda desses neurónios dopaminérgicos, que normalmente contêm quantidades notáveis de neuromelanina, é um diagnóstico neuropatológico importante para a despigmentação presente na SNpc, ocorrendo também uma intensa redução dos níveis de dopamina no estriado, como referido anteriormente (Dauer & Przedborski, 2003). Embora a perda de neurónios dopaminérgicos na SNpc seja a principal característica patológica da DP, a perda neuronal também ocorre no *locus coeruleus*, no núcleo basal de *Meynert*, e no estado mais avançado, a perda neuronal também ocorre no neocórtex (Braak et al., 2003).



**Figura 2** - Neuropatologia da Doença de Parkinson. Representação esquemática da via nigroestriatal normal (A) e na DP (B). A imagem representa a despigmentação da SNpc devido à degeneração dos neurónios dopaminérgicos (adaptado de Dauer & Przedborski, 2003).

Até ao momento, o tratamento mais eficaz para a DP continua a ser a administração oral de um precursor da dopamina, L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA), que, pela reposição de dopamina no cérebro, alivia quase todos os sintomas da DP (Przedborska, 2004). No entanto, a administração crónica de L-DOPA, muitas vezes causa efeitos colaterais motores e psiquiátricos, que podem ser tão debilitantes como a DP em si (Teismann & Schulz, 2004).

A reacção glial, que se encontra em pacientes com DP, bem como em modelos experimentais da DP, sugere que as células gliais (microglia e astrócitos) estão envolvidas na patogénese da doença (Teismann & Schulz, 2004; Qian & Flood, 2008).

### 1.2.2. Modelos da etiologia da Doença de Parkinson

Com base nas características neuropatológicas, diversas neurotoxinas tais como 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), 1-metil-4-fenilpiridínio (MPP<sup>+</sup>), 6-hidroxidopamina (6-OHDA), paraquato (4'-bipiridínio) e rotenona são actualmente utilizados para a indução de degeneração neuronal dopaminérgica nigroestriatal, em animais de laboratório. Nestes modelos animais da DP, assim como em pacientes, a activação glial derivada do stress oxidativo e moléculas inflamatórias, desempenham um papel importante na morte neuronal (Hald, et al., 2007; Chung, et al., 2010). Estes mecanismos envolvem a activação da microglia, astrócitos reactivos, barreira hemato-encefálica danificada e infiltração periférica de células do sistema imunológico (Chung et al., 2010).

O MPTP é uma neurotoxina que provoca sintomas permanentes na DP. O MPTP é metabolizado a MPP<sup>+</sup> por células gliais. Por sua vez o MPP<sup>+</sup> é captado pelos neurónios dopaminérgicos através do transportador de dopamina e induz stress oxidativo, levando a danos mitocondriais e morte neuronal (Glass, et al., 2010). A microglia, em resposta a estas toxinas, torna-se activada e pode contribuir para a disfunção neuronal e, eventualmente, acelerar a neurodegeneração (Frank-Cannon, et al., 2009).

O stress oxidativo é causado por um desequilíbrio entre a produção e a destruição de EROs e espécies reactivas de azoto (ERNs). No modelo de MPTP da DP, a oxidase da forma reduzida do dinucleótido de adenina nicotinamida fosfato (NADPH) e a iNOS são as principais fontes de produção de EROs/ERNs que medeiam a morte neuronal dopaminérgica na SN. A inflamação excessiva pode resultar na perda neuronal dopaminérgica durante a progressão da DP. Substâncias pró-inflamatórias, tais como a ciclo-oxigenase 2 (COX2) e citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , estão em quantidades elevadas nos cérebros post-mortem de pacientes com DP. Em conjunto, estes resultados indicam que o stress oxidativo derivado da activação da microglia e moléculas pró-inflamatórias é nocivo para os neurónios dopaminérgicos da SN (Chung, et al., 2010).

O papel da infecção bacteriana ou viral como factor inicial da DP em humanos não é conclusiva, mas a infusão intracraniana de lipopolissacárido bacteriano (LPS) é usado como um modelo alternativo para a indução da activação da microglia. A indução de inflamação pelo LPS pode também obter uma sinergia com mutações na  $\alpha$ -sinucleína e na proteína *Parkin* que estão associadas com a DP familiar para provocar a perda de tirosina-hidroxilase nos neurónios em modelos animais (Glass, et al., 2010).

Dados recentes indicam a importância dos agregados de  $\alpha$ -sinucleína extracelulares na DP. A  $\alpha$ -sinucleína extracelular é fagocitada por microglia, e formas agregadas, nitradas, e oxidadas de  $\alpha$ -sinucleína foram descritas como indutoras da activação da microglia. A internalização da  $\alpha$ -sinucleína pela microglia é seguida pela activação da NADPH oxidase e produção de EROs (Glass, et al., 2010).

### 1.2.3. Microglia e a Doença de Parkinson

Tem sido descrito que a activação da microglia resulta na perda de neurónios dopaminérgicos em pacientes com DP (Hald, et al., 2007), onde a activação da microglia na DP tem sido apoiada pela análise de cérebros *post-mortem* de indivíduos com a doença, que fornece clara evidência da activação da microglia na SN. (Qian & Flood, 2008; Rosenstiel, et al., 2001; Przedborskia, 2004).

Embora a microglia reactiva na DP possa ter como função inicial eliminar neurónios mortos ou degenerados, a evidência de um papel mais adverso na neuroinflamação e neurodegeneração emerge a partir de modelos animais (Mosley, et al., 2006), epidemiológicos e de cultura de células (McGeer, et al., 2008). Existem vários modelos de DP (MPTP, 6-OHDA, rotenona, paraquato e LPS) que apresentam respostas inflamatórias como evidenciado pela microglia reactiva e degeneração dos neurónios dopaminérgicos ao longo do eixo nigrostriatal (Mosley, et al., 2006).

Vários produtos de secreção tóxica microglial, que modulam a progressão da morte celular neuronal, são secretados ou sobre-regulados na DP, incluindo EROs, TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$  /  $\beta$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, iNOS, e leucotrienos (Teismann & Schulz, 2004; Reynolds, et al., 2007). A activação da microglia na SNpc de doentes de DP não é uma resposta inflamatória generalizada no cérebro, mas altamente localizada (Orr, et al., 2002). No entanto, a forma como a microglia é activada e como afecta a doença não é completamente conhecida, mas pensa-se que medeia a libertação de agregados de  $\alpha$ -sinucleína durante a degeneração dos neurónios dopaminérgicos na SNpc, resultando numa cascata inflamatória citotóxica (Reynolds, et al., 2007).

A activação da microglia na DP é mediada por, pelo menos, três proteínas libertadas pelos neurónios lesados: MMP-3,  $\alpha$ -sinucleína, e neuromelanina (Tambuyzer, et al., 2009). A secreção de MMP-3 por neurónios dopaminérgicos provoca uma produção elevada pela microglia de superóxido e TNF- $\alpha$ . A  $\alpha$ -sinucleína induz a produção e secreção de EROs. A neuromelanina, uma macromolécula insolúvel libertada por neurónios dopaminérgicos degenerados, serve como um antioxidante nos neurónios e tem propriedades neuroprotectoras e de ligação a metais, exercendo efeitos quimiostáticos e efeitos na indução da produção microglial de TNF- $\alpha$ , IL-6 e NO (Tambuyzer, et al., 2009; Hald, et al., 2007).

Uma característica dos neurónios dopaminérgicos da SN é o aumento de processos oxidativos intracelulares relacionados com a síntese de dopamina, tornando-as particularmente vulneráveis ao stress oxidativo. As toxinas na DP são descritas como indutores da degeneração neuronal que estão associados à microgliose reactiva, agravando a neurotoxicidade (Glass, et al., 2010). A microglia pode desempenhar um papel activo no aumento do stress oxidativo pela síntese de EROs e ERNs que influenciam directamente as células da SNpc, facto evidenciado em cérebros *post-mortem* de doentes de Parkinson (Liu & Hong, 2003). Há evidências consideráveis de que o NO pode ser essencial para a patogénese da DP, e o aumento da produção de NO pode ser atribuído à activação da microglia (Orr, et al., 2002). A  $\alpha$ -sinucleína extracelular é fagocitada pela microglia activada, resultando numa activação da NADPH oxidase, sendo esta a principal fonte de produção de EROs. A activação da NADPH oxidase e a produção de EROs é um mecanismo crucial para a activação da microglia após exposição a  $\alpha$ -sinucleína (Teismann & Schulz, 2004; Mosley, et al., 2006; Glass, et al., 2010). Os radicais livres são moléculas altamente reactivas ou espécies químicas que são formadas por transferência de electrões, e reagem para formar uma série de espécies reactivas, que se não forem neutralizadas levam ao stress oxidativo, inflamação e dano tecidual (Mosley, et al., 2006). As EROs podem reagir com proteínas, ADN ou ARN e alterar as suas funções ou induzir peroxidação lipídica, levando à eventual morte neuronal (Gao, et al., 2002).

A combinação de factores que são produzidos pela microglia activada e pelos astrócitos, podem promover a neurotoxicidade, sendo que estes últimos também podem ter um papel na neurodegeneração (Teismann & Schulz, 2004). No entanto, em termos de capacidade de induzir neurodegeneração na DP, os astrócitos podem desempenhar um papel menor do que a microglia (Gao, et al., 2002).

### 1.3. Astrócitos

Os astrócitos constituem cerca de 20-50% do volume do cérebro. Têm uma forma altamente fibrosa com prolongamentos finos e alongados e uma grande complexidade estrutural (Seth & Koul, 2008; Przedborskia, 2004) e raramente apresentam morfologia reactiva com corpo celular hipertrófico e prolongamentos curtos (Przedborskia, 2004), sendo activados em resposta a diversos estímulos (Chung, et al., 2010). Em condições fisiológicas, eles são responsáveis pelo fornecimento de energia na forma de carboidratos para os neurónios (Hald, et al., 2007).

Os astrócitos são células dinâmicas que mantêm a homeostase intacta no SNC, exercem influência trófica para orientar processos neuronais estabilizando as conexões sinápticas, influenciam a expressão fenotípica de proteínas endoteliais específicas e estabilizam a barreira hemato-encefálica através de interações com células endoteliais (Koehler, et al., 2006). Para além disto, os astrócitos mantêm um controlo rigoroso dos iões locais, como o  $K^+$ , e homeostase do pH, controlo do ambiente neuronal extracelular e fornecimento de substratos metabólicos e glicose. Os astrócitos também eliminam resíduos neuronais, incluindo não só subprodutos metabólicos mas também neurotransmissores libertados durante a transmissão sináptica, que são sequestrados por captação activa (Nedergaard, et al., 2003). Estas células expressam inúmeros receptores que lhes permitem responder a praticamente todos os compostos neuroactivos conhecidos, incluindo neurotransmissores, neuropéptidos, factores de crescimento, citocinas, pequenas moléculas e toxinas. Estes receptores permitem aos astrócitos não só participar no processamento de sinais, mas também funcionar como vigias (Hanisch, 2002).

Dado o seu importante papel no estabelecimento e na manutenção da homeostase do SNC, deve ser esperada uma resposta adaptativa pelos astrócitos à lesão tecidual. De facto, quando a homeostase do cérebro ou da medula espinhal é interrompida, a actividade metabólica dos astrócitos aumenta, bem como a produção de factores tróficos e de crescimento que melhoram a sobrevivência dos neurónios adjacentes e glia, e coordenam a remodelação do tecido (Liberto, et al., 2004); assim adquirem uma maior capacidade para proteger outras células cerebrais da diminuição de energia, radicais livres tóxicos, amónia, metais e sobrecarga de cálcio (Liberto, et al., 2004).

Uma das reacções celulares mais amplamente documentada nos danos do sistema nervoso é a proliferação e hipertrofia de astrócitos (Orr, et al., 2002). Os astrócitos reactivos hipertróficos são classicamente identificados pela expressão específica da proteína ácida fibrilar glial (GFAP) no SNC (Seth & Koul, 2008). Esta especificidade da GFAP foi um grande avanço no estudo de astrócitos (Montgomery, 1994).

Após a lesão, os astrócitos activados, através de citocinas, promovem a reparação das barreiras essenciais e restabelecimento da homeostase iónica do SNC. Estes astrócitos “reactivos” podem, por outro lado, exacerbar a lesão tecidual e libertar citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- $\alpha$ , que pode inibir o crescimento de neurites e eliminar oligodendrócitos. Além do TNF- $\alpha$ , os astrócitos podem também produzir e libertar metabolitos do ácido araquidónico, NO e EROs que podem afectar negativamente a sobrevivência das células após a lesão (Liberto, et al., 2004). Assim, os astrócitos podem também desempenhar um papel importante no processo patogénico da neurodegeneração. A astrogliose reactiva (hipertrofia) é frequentemente observada nas regiões lesionadas nos cérebros de pacientes com DA e DP (Dong, 2001).

Embora a presença de astrócitos reactivos na SNpc de pacientes com DP esteja envolvida na progressão da DP, o papel dos astrócitos reactivos no desenvolvimento de DP ainda é desconhecido e controverso (Maragakis & Rothstein, 2006).

### **1.3.1. Factores libertados pelos Astrócitos**

Numa ampla gama de distúrbios neurológicos como a DP, DA, traumas ou danos cerebrais, os astrócitos sofrem uma transição notável a partir de um estado de repouso para um estado, referido como “reactivo”, no qual, eles têm alguma semelhança com as células do sistema imunológico (Hald, et al., 2007). No estado reactivo, os astrócitos libertam uma grande variedade de factores neurotróficos que podem promover a sobrevivência neuronal, mas também factores pró-inflamatórios e neurotóxicos, como EROs e ERNs. E também expressam MHC classe II, fazendo com que os astrócitos, sejam células apresentadoras de antigénios, capazes de conduzir processos inflamatórios no SNC (Hald, et al., 2007). Também ocorre o aumento da expressão de GFAP (Dong, 2001).

Estudos *in vivo* e *in vitro*, demonstram que os astrócitos podem ser induzidos a expressar e/ou secretar certas moléculas que contribuem para facilitar as reacções imunes (revisito por Montgomery, 1994). Estes incluem, produção de citocinas pró- ou anti-inflamatórias e quimiocinas como o TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, produção de factores de crescimento, produção de glicose e outros metabolitos energéticos, e libertação ou eliminação de EROs e NO (Myer, et al., 2006; Hald, et al., 2007).

Os astrócitos produzem factores que podem ser importantes na reacção inflamatória que ocorre na SN na DP. A  $\alpha$ -sinucleína é capaz tanto de activar microglia como estimular os astrócitos para produzir a IL-6, a molécula de adesão intercelular (ICAM)-1 e uma série de factores neurotróficos para os neurónios dopaminérgicos (McGeer, et al., 2008). A libertação de glutathiona representa uma via pela qual os astrócitos podem ser considerados neuroprotectores em modelos de DP. A elevada produção de NO, e o aumento da libertação

de glutationa pelos astrócitos pode aumentar a sua disponibilidade para os neurónios, tornando-os menos susceptíveis a ERNs (Maragakis & Rothstein, 2006).

Para além das citocinas, os astrócitos expressam as isoformas I e II da MT, proteínas que exercem acções neuroprotectoras no SNC (Mirza, et al., 2000).

### **1.3.2. Interacção Astrócitos-microglia**

Muitos estudos examinaram a inflamação cerebral em culturas separadas de microglia e astrócitos. No entanto, a inflamação do cérebro é o resultado final da sinalização integrada de todas as células do cérebro. Portanto, é importante estudar a possibilidade de interacções entre astrócitos e microglia examinando se os astrócitos podem modular a resposta inflamatória da microglia (Yang, et al., 2006). Embora a inflamação não represente um factor inicial na doença neurodegenerativa, existem modelos animais que sustentam respostas inflamatórias envolvendo microglia e astrócitos, contribuindo assim para a progressão da neurodegeneração (Glass, et al., 2010).

A microglia e os astrócitos podem ser activados, produzindo uma variedade de mediadores inflamatórios, tais como o TNF- $\alpha$ , a IL-1 $\beta$  e o IFN- $\gamma$ , assumindo então funções fagocitárias (Przedborskia, 2004). Alguns especialistas sugerem que as células de microglia são responsáveis por uma fagocitose mais generalizada envolvendo a activação da cascata do complemento, enquanto que os astrócitos estão envolvidos em processos fagocíticos circunscritos, tais como a remoção de sinapses individuais (Przedborskia, 2004). As interacções que ocorrem entre astrócitos reactivos e microglia reactiva após lesão no SNC são complexas e em grande parte inexploradas. Sabe-se, no entanto, que as citocinas e factores de crescimento são importantes mediadores da comunicação inter-glial (Streit, et al., 1999).

Quando as microglia são cultivadas em monocamadas de astrócitos, estas tornam-se ramificadas e demonstram uma semelhança morfológica com a microglia em repouso no SNC normal (revisto por Fujita, et al., 1996). Assim, a presença de astrócitos na cultura de microglia influencia a sua morfologia. A proliferação microglial pode ser regulada através de factores estimuladores de colónia de macrófagos (M-CSF) e macrófagos/granulócitos (GM-CSF), que são libertados pelos astrócitos (revisto por Fujita, et al., 1996). Os astrócitos parecem regular a produção de NO microglial através de um mecanismo envolvendo a activação de TGF- $\beta$  pelo tecido astrogliar. Tem sido descrito que derivados microgliais, como a IL-1, regulam a proliferação de astrócitos, e a microglia pode expressar moléculas de matriz extracelular, tais como a laminina, cuja expressão pode ser controlada pelos astrócitos (revisto por Streit, et al., 1999).

A microglia, com a estimulação, pode libertar várias citocinas, juntamente com os astrócitos, e liberta factores tróficos como o factor básico de crescimento de fibroblastos, factor de crescimento neuronal (NGF), neurotrofina-3 (NT-3), factor neurotrófico ciliar e S100B, promovendo a neuroplasticidade. Os astrócitos parecem desempenhar um importante papel regulador nos processos de diferenciação da microglia e desactivação, sendo capazes de suprimir a fagocitose microglial e a produção da citocina pró-inflamatória IL-12 e iNOS (Hansson & Ronnback, 2003; Min, et al., 2006).

O meio condicionado por astrócitos (MCA), que é um meio que contém factores solúveis libertados pelos astrócitos, induz a ramificação da microglia e reduz a libertação de EROs por estas células (Min, et al., 2006). A microglia fagocítica pode também produzir factores (citocinas, metaloproteinases) que interferem com a ramificação dos astrócitos (Kalla, et al., 2003; Perry, et al., 1995). Os efeitos do MCA, que pode conter M-CSF e GM-CSF, sobre a ramificação da microglia tem sido objecto de debate considerável (Fujita, et al., 1996).

Várias evidências sobre os papéis de protecção e de agentes patogénicos, da microglia e dos astrócitos, e sobre a activação de vias de inflamação comuns nessas células em várias doenças neurodegenerativas suporta o conceito de que as células gliais induzem a inflamação. Embora a inibição da neuroinflamação não possa alterar a causa subjacente da doença, pode reduzir a produção de factores que contribuem para a neurotoxicidade, resultando em benefício clínico (Winner, et al., 2010).

### **1.3.3. Metalotioneínas**

As metalotioneínas (MTs) são uma família de proteínas intracelulares, de baixo peso molecular (6-7 kDa), com elevado teor de metais, nomeadamente Zn, Cu ou Cd, com 18-23 resíduos de cisteína altamente conservados e sem aminoácidos aromáticos ou histidina (Refaey, et al., 1997; Ebadi, et al., 2005; Hozumi, et al., 2004; Stankovic, et al., 2007). Estas proteínas têm características estruturais únicas, com fortes capacidades de ligação a iões metálicos (Vasák & Hasler, 2000; Gauthier, et al., 2008). Estas proteínas também desempenham um papel fundamental na homeostase de iões metálicos ( $Zn^{2+}$  e  $Cu^{2+}$ ), têm a capacidade de participar directamente nas reacções redox (Gauthier, et al., 2008), têm propriedades anti-oxidantes e regulam a biosíntese e actividade de proteínas de ligação a zinco, tais como factores de transcrição dependentes de zinco, protegendo contra EROs (devido aos grupos sulfidrílo) (Hozumi, et al., 2004; Gauthier, et al., 2008). São expressas constitutivamente em vários tipos de tecido, e embora o fígado e rins contenham as maiores quantidades de MTs, existem níveis significativos em muitas áreas do sistema nervoso, incluindo glia, astrócitos (principalmente astrócitos reactivos) e neurónios (Chung, et al., 2003; Gauthier, et al., 2008).

A conformação tridimensional da MT resulta numa molécula com dois clusters de metal tiolato residente em dois domínios distintos globulares, o domínio- $\alpha$  (C-terminal) e o domínio- $\beta$  (N-terminal) ligadas por uma pequena região de transição (Nielsen, et al., 2007).

AS MTs de mamíferos constituem uma superfamília de proteínas que pertencem à classe I, das quais quatro isoformas (MT-I, II, III e IV) foram identificadas até agora (Nielsen, et al., 2007). Todas elas são codificadas por uma família de genes localizados no cromossoma humano 16q13 (Nielsen, et al., 2007).

As isoformas da MT-I e da MT-II, como partilham uma grande homologia de sequências de aminoácidos e nucleótidos, e perfis de expressão similares, são funcionalmente consideradas como uma única isoforma denominada de MT-I/II (Hozumi, et al., 2004; Penkowa, 2006). As MT-I/II são co-expressas na maioria dos tecidos, incluindo o SNC, enquanto a MT-III é principalmente limitada ao SNC e a MT-IV ao epitélio escamoso estratificado (Gauthier, et al., 2008). As MT-I/II são induzidas por estímulos diversos e agentes patogénicos, mas o mais importante é que a sua indução por metais está intimamente ligada ao metabolismo fisiológico do zinco e protecção contra o efeito tóxico após a exposição a metais pesados (Stankovic, et al., 2007). A natureza destes indutores e agentes patogénicos e a abundância relativa de MT-I/II em astrócitos, que estão intrinsecamente associados aos neurónios, sugerem que estas isoformas têm como função principal a protecção do sistema nervoso contra intermediários oxidativos que surgem durante a infecção, stress ou inflamação (Coyle, et al., 2002).

As MT-I/II são induzidas por metais essenciais e pesados (Zn, Cu, Cd, Hg), glicocorticóides e catecolaminas, EROs, stress oxidativo e LPS. Citocinas pró-inflamatórias, como a IL-3, IL-6, TNF- $\alpha$ , M-CSF, IFN- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , também têm sido sugeridas como reguladores da MT-I/II. Em contraste, as isoformas MT-III e MT-IV são relativamente insensíveis a estes indutores (revisto por Vasák & Hasler, 2000). Assim, as MT-I/II ligam e libertam iões metálicos essenciais, tais como Zn<sup>2+</sup> e Cu<sup>2+</sup> e também metais pesados como Cd, Pb e Hg, que em quantidades excessivas são altamente tóxicos no SNC. Agindo como dadoras e como receptoras de Zn e Cu, as MT-I/II podem controlar proteínas dependentes de Zn e Cu, enzimas e factores de transcrição nas células (Penkowa, 2006).

Nenhum factor único regula a síntese de MT na inflamação, mas sim uma inter-relação complexa existente entre factores que, em combinação e em diferentes tecidos, agem sinergicamente na transcrição do gene da MT (Coyle, et al., 2002).

A MT é capaz de reduzir a inflamação associada a lesão do SNC, levando à sua recuperação. Estudos recentes descrevem que a MT-IIA humana tem a capacidade anteriormente insuspeita de melhorar a recuperação neuronal após uma lesão por acção directa sobre os neurónios. Este dado sugere que a MT promove a recuperação neuronal através da diminuição da

resposta inflamatória associada com a lesão e da promoção directa da recuperação neuronal (Chung et al., 2003).

As EROs geradas durante a resposta inflamatória podem induzir a MT através de múltiplas vias, incluindo a estimulação directa de um elemento de resposta antioxidante e elementos de resposta a metais específicos na região promotora, bem como por eventos associados a várias vias de segundos mensageiros envolvendo cinases de proteínas (revisto por Coyle, et al., 2002).

Inibidores da produção de NO diminuem a indução de MT por LPS em culturas primárias de células de ratos (astrócitos e neurónios); este efeito também foi demonstrado *in vivo*, onde a supressão de NO atenuou a sobre-regulação da MT-I/II relacionada com o stress no cérebro de ratos, implicando um papel do NO na indução da MT (Molinero, et al., 1998). Neste contexto, a MT tem sido considerada uma proteína de fase aguda ou de stress, e um dos exemplos experimentais mais marcantes da sua expressão é visto em resposta à injeção de LPS, mediada através de citocinas (principalmente IL-6) (revisto por Coyle, et al., 2002).

Recentemente, estudos indicam que a MT confere um efeito protector após uma lesão cerebral (Chung et al., 2003). Pode-se verificar aumentos de MT-I/II na astroglia em doenças neurodegenerativas, como a DA, a DP, a doença de Pick, a ELA e a EM (Penkowa, 2006).

Mudanças no metabolismo de  $Zn^{2+}$  que ocorrem durante o stress oxidativo podem ser importantes nestas doenças neurodegenerativas em que o stress oxidativo está implicado (Gauthier, Et al., 2008) e em modelos animais dessas doenças, por exemplo, o modelo de MPTP da DP (Stankovic, et al., 2007). É então evidente que as MT-I/II têm acções neurotróficas e protectoras melhorando a sobrevivência neuronal, promovendo a remodelação do tecido cerebral e sua reparação. Apesar dos mecanismos moleculares precisos das acções da MT-I/II ainda não serem claros, alguns factores e processos intracelulares são conhecidos por serem alterados ou regulados por MT-I/II, e estes incluem: homeostase de metais, eliminação de EROs, e inibição de mecanismos pró-apoptóticos como caspases e p53 (Nielsen, et al., 2007).

No caso da DP, as MTs I/II podem desempenhar um importante papel através da sua indução por citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1, a IL-6 e o IFN- $\gamma$ , que são libertadas pela microglia activada. O aumento da expressão de MTs I/II em astrócitos pode ser proveniente da indução por IL-1 libertada pela microglia activada, radicais livres, metais libertados a partir de células em degeneração ou proteínas plasmáticas que entram no cérebro devido à ruptura da barreira hemato-encefálica. Além disso, as MTs I/II estão envolvidas na prevenção do stress oxidativo e protecção contra danos no ADN, o que pode sugerir o porquê da elevada expressão astrocitária de MTs I/II. (Mirza, et al., 2000)

Em conclusão, as MT-I/II podem proteger o cérebro da degeneração e morte celular, enquanto ocorre uma melhoria na reparação neuronal e na recuperação funcional. Para este efeito, o seu potencial na prevenção da degeneração de neurónios no cérebro sugere um papel importante das MT-I/II na futura gestão de doenças neurológicas (Nielsen, et al., 2007). O interesse nas MT-I/II está a aumentar devido ao seu possível papel na sobrevivência celular, e particularmente no cérebro, podendo constituir novos agentes terapêuticos a serem utilizados no tratamento das doenças neurodegenerativas (Nielsen, et al., 2007).

## Capítulo 2 - Objectivos

A neuroinflamação está associada a um aumento na proliferação e activação da microglia, e tem sido proposta como um factor importante na patogénese da DP. Vários estudos têm sugerido o envolvimento dos astrócitos na prevenção das respostas inflamatórias exageradas mediadas pela microglia. No entanto, pouco se sabe acerca do modo como os astrócitos modulam a activação microglial. Dada a importância das interacções astrócitos-microglia na regulação da inflamação cerebral torna-se importante identificar os mediadores solúveis libertados pelos astrócitos envolvidos neste processo, que poderão actuar como agentes anti-inflamatórios naturais no cérebro. Estudos prévios do nosso grupo mostraram que mediadores solúveis de baixo peso molecular (<10 kDa), libertados pelos astrócitos mesencefálicos, são capazes de prevenir a activação da microglia induzida pelo agente inflamatório Zymosan A (ZyA). Dentre esses mediadores, as MTs (6-7 kDa) são possíveis candidatos a testar, visto serem expressas pelos astrócitos e exercerem um efeito neuroprotector no SNC. Assim, pretende-se com este trabalho investigar o papel das MT-I/II e, em particular, da MT-IIA, libertadas pelos astrócitos mesencefálicos, na regulação do estado de activação da microglia através da análise da actividade fagocítica e da produção de NO e de EROs pela microglia após exposição aos agentes inflamatórios LPS e ZyA.

## Capítulo 3 - Materiais e Métodos

### 3.1. Materiais

As placas de cultura foram obtidas da Nunc e da Orange. Os frascos de 75cm<sup>2</sup> foram obtidos da Orange e da BD Falcon. O anticorpo monoclonal anti-Metalotioneína-I/II de ratinho e o meio de montagem foram obtidos da Dako. A proteína Zn7-Metalotioneína-IIA de coelho foi obtida da Bestenbalt. O anticorpo primário anti-GFAP de galinha foi obtido da Chemicon. Quanto aos anticorpos secundários Alexa Fluor® 546 (cabra anti-ratinho) e o Alexa Fluor® 488 (cabra anti-galinha) foram obtidos da Invitrogen. O soro fetal bovino (FBS) foi obtido da Biocrom AG. O Hoescht e a sonda 2,7'-diacetato de diclorofluoresceína (DCFDA) foram obtidos da Invitrogen. O meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) com elevada concentração de glucose, a streptomomicina-penicilina (SP), a poli-D-lisina (PDL), o ZyA, o N-1-naftiletilenodiamina dihidroclorato (NED), a sulfanilamida, o LPS, a tripsina e o anticorpo anti-LRP1 (C-terminal) de coelho foram obtidos da Sigma Aldrich. As microesferas de poliestireno fluorescentes foram obtidas da Molecular Probes. O nitrato de sódio foi obtido da Pronalab.

### 3.2. Culturas Mistas Gliais do Mesencéfalo Ventral

As culturas mistas gliais do mesencéfalo ventral foram preparadas como descrito previamente por Burke et al (1998), com algumas modificações.

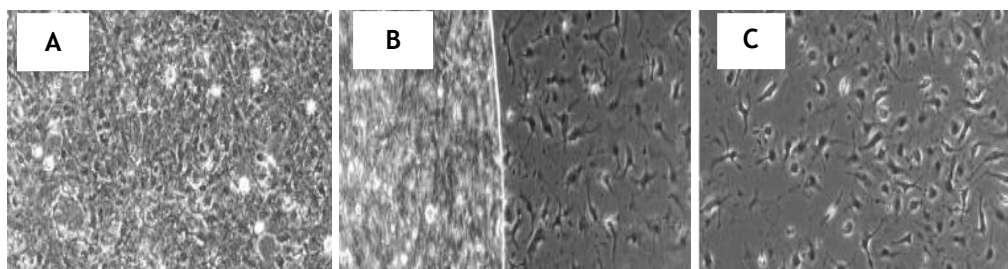
Os animais foram manipulados de acordo com os requisitos éticos nacionais para a investigação animal, e de acordo com a Convenção Europeia para a Protecção de Animais Vertebrados Usados para Fins Experimentais e Outros Fins Científicos. Foram preparadas culturas de células da glia do mesencéfalo ventral a partir dos cérebros de ratos Wistar recém-nascidos com 2-4 dias. Os cérebros foram dissecados, e após a obtenção do mesencéfalo ventral retiraram-se as meninges cuidadosamente, colocando-se o tecido em tampão fosfato salino frio (PBS: NaCl 140mM, KCl 2,7mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5mM e Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8,1 mM, pH 7,4). O tecido foi colocado numa solução de digestão enzimática, a 37 ° C, durante 4 minutos sobre oxigenação e agitação contínua. Esta solução de digestão enzimática contém: água de cisteína (CaCl<sub>2</sub> 1,9mM, Cisteína 1,3mM em H<sub>2</sub>O miliQ, concentração final na solução de digestão enzimática de 1mM), papaína (20 unidades/mL), solução H&B (concentrações finais: NaCl 116mM, KCl 5,4mM, NaHCO<sub>3</sub> 26mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O 12mM, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 1mM, EDTA 0,5mM e glicose 25mM, pH 7,3) e 0,001% de vermelho de fenol. A solução foi esterilizada por filtração para um tubo de falcon (5mL por tubo) e colocada sobre oxigenação e agitação

contínua, pelo menos durante 20 minutos antes da dissecação. Após a dissecação dos cérebros e a obtenção do tecido, colocou-se este na solução de digestão enzimática. Após a digestão, o tecido foi removido para um tubo estéril. Efectuaram-se 2 a 3 lavagens com DMEM completo (DMEM suplementado com 10% de FBS, 100 unidades/mL penicilina e 100 µg/mL estreptomicina) aquecido, para remover os restos da solução de digestão enzimática. O tecido foi dissociado mecanicamente por ressuspensão com uma pipeta estéril seguido de 5-10 passagens sequenciais através de pontas estéreis com orifícios de tamanho 20G, 21G e 25G. Por fim, o tecido foi centrifugado à temperatura ambiente durante 3 minutos a 405 x g (3K18C Bioblock Scientific; Sigma Laboratory Centrifuges). Após a centrifugação removeu-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o pellet em 10mL de DMEM completo. Fez-se uma diluição de 1:1 da suspensão celular com azul de tripano 0,4% em NaCl 0,9%. A utilização desta solução baseia-se no princípio de que células viáveis apresentam membranas intactas, que evitam a entrada do corante, enquanto membranas de células mortas metabolicamente inactivas (não viáveis) não conseguem evitar a penetração do corante na célula. A partir dessa diluição contaram-se as células viáveis (não coradas) ao microscópio óptico utilizando uma câmara de Neubauer. Com a diluição adequada, as células foram cultivadas em placas de 12, 24 e 48 poços numa densidade de  $0,023 \times 10^6$  células/cm<sup>2</sup>. As placas de 48 poços com lamelas foram previamente revestidas com PDL. As culturas foram mantidas a 37 ° C numa atmosfera de 95% de ar e 5% de CO<sub>2</sub>. Mudou-se o meio a cada 7 dias. Após 20-21 dias em cultura, procedeu-se à tripsinização para separação da microglia dos astrócitos (ver secção 3.2.1).

### **3.2.1. Culturas enriquecidas em microglia e astrócitos do mesencéfalo ventral**

As culturas de microglia do mesencéfalo ventral foram preparadas como descrito previamente por, Saura et al 2003, com algumas modificações.

A microglia foi obtida por tripsinização da cultura mista confluyente do mesencéfalo ventral, após 20-21 dias em cultura. A cultura mista foi incubada com solução de tripsina diluída 1:3 em DMEM incompleto (sem FBS e sem SP) por 40-60 minutos a 37°C, e após se verificar que a camada de astrócitos se soltou (Figura 3), recolheu-se o meio contendo os astrócitos, e procedeu-se às lavagens (2-3) da cultura de microglia com DMEM completo para remover restos de tripsina. Após as lavagens, incubou-se a microglia com meio condicionado obtido da cultura mista (meio de 7 dias de cultura), a 37°C numa atmosfera humidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar durante 5 dias até às experiências.



**Figura 3 - Representação da tripsinização da cultura glial mista do córtex cerebral, com separação dos astrócitos e da microglia.** A) Aspecto da cultura mista confluyente antes da tripsinização. B) Aspecto da cultura durante a tripsinização, com a camada de astrócitos a soltar-se. C) Aspecto da cultura após a tripsinização, só com a microglia aderente ao fundo da placa de cultura (Adaptado de: Saura, et al., 2003).

A cultura de astrócitos foi obtida através da recolha do meio contendo os astrócitos resultantes da tripsinização. Este foi centrifugado durante 3 minutos a 405 x g e, após a remoção do sobrenadante, o sedimento resultante foi ressuscitado em 12mL de DMEM completo tendo-se procedido à dissociação mecânica por ressuspensão através de 5-10 passagens sequenciais através de pontas estéreis com orifícios de tamanho 20G, 21G e 25G. Os astrócitos foram então, cultivados em frascos de 75 cm<sup>2</sup>. Devido à dificuldade na contagem dos astrócitos, pois encontram-se muito agregados, efectuou-se uma proporção de 2 placas de 12 wells cada, para 1 frasco de 75 cm<sup>2</sup> para a cultura dos astrócitos. Estes foram, então, mantidos em DMEM completo, a 37°C numa atmosfera humidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar. Quando atingiram a confluência (após 7 dias aproximadamente), aspirou-se o meio todo do frasco, sendo substituído por 10 mL de DMEM completo. As células foram mantidas na incubadora e após 24 horas o MCA foi recolhido, aliquotado em tubos eppendorfs e armazenado a -80°C até ser usado.

### 3.3. Estimulação da Microglia

Cinco dias após a tripsinização, as microglias foram expostas a DMEM (controlo) ou MCA durante 24 horas. As células foram posteriormente incubadas com ZyA 0,5µg/mL ou LPS 1µg/mL durante diferentes tempos conforme indicado na tabela 1. Estas incubações a diferentes tempos tiveram como objectivo determinar qual o melhor tempo de incubação com os estímulos para observação de actividade fagocítica e produção de NO e EROs máximas.

Tabela 1- Optimização do tempo de incubação com ZyA e LPS para cada método utilizado.

Estímulos	Tempo de incubação (horas)	Método
ZyA 0,5µg/mL	0,15,0,5,1,3,5,7,23	NO
	1,2,4,6,8,24	EROs
	1,6,24	Fagocitose
LPS 1 µg/mL	1,3,5,7	NO
	1,2,4,6,8	EROs
	1,6,24	Fagocitose

### 3.4. Ensaio de viabilidade celular - MTT

A viabilidade celular foi avaliada em culturas de microglia expostas a ZyA 0.5 µg/mL durante 1, 3, 5, 7 e 23 horas através do ensaio de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo de difeniltetrazolino (MTT). O MTT é um corante salino de tetrazólio (amarelo pálido) que é clivado por desidrogenases intracelulares de células metabolicamente activas para formar cristais de formazan de cor púrpura. A quantidade de produto formazan produzido é proporcional ao número de células metabolicamente viáveis e activas. O meio de cultura das células foi aspirado e adicionou-se solução de MTT dissolvido em meio de Krebs aquecido (0,5mg/mL) na placa de 24 poços (200µL por poço), e incubou-se durante 1,5 h a 37°C numa atmosfera humidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar. Após o tempo de incubação, o meio foi removido cuidadosamente, e adicionou-se HCl 0,04M em isopropanol absoluto para dissolver os cristais de formazan. A placa foi coberta com papel alumínio, pois o MTT é sensível à luz, e as células foram agitadas num agitador orbital durante 10 a 15 minutos para dissolver o precipitado formado. A determinação colorimétrica das reduções de MTT foi realizada num leitor de microplacas de ELISA (Anthos 2020) a 570 nm com um filtro de referência de 620 nm.

### **3.5. Neutralização da acção da MT-I/II no MCA**

Para a análise da função desempenhada pela MT-I/II na modulação da actividade fagocítica da microglia e produção de NO procedeu-se à adição do anticorpo anti-MT-I/II de ratinho ao MCA ou DMEM, numa proporção de 1:1000, seguida de um período de incubação de 15 minutos à temperatura ambiente, para permitir a ligação do anticorpo às respectivas proteínas e, deste modo, bloquear a acção das MT-I/II nos meios. O MCA ou DMEM contendo o anticorpo anti-MT-I/II foi depois adicionado às culturas de microglia. Para verificar o efeito da ausência de actividade do anticorpo anti-MT I/II procedeu-se à adição deste a PBS (95µl de PBS+5µl de anti-MT-I/II), e desnaturou-se a 100°C durante 5 minutos. O anticorpo anti-MT I/II então desnaturado adicionou-se ao MCA (diluição de 1:1000) e incubou-se durante 15 minutos à temperatura ambiente, sendo depois adicionado às culturas de microglia.

### **3.6. Papel da MT-IIA na modulação da reactividade microglial**

De modo a avaliar o papel da MT-IIA na prevenção da activação microglial procedeu-se à adição exógena desta proteína à cultura de microglia 24 horas antes da estimulação com o ZyA 0.5 µg/mL. As concentrações finais de MT-IIA testadas foram as seguintes: 3.5, 50 e 100 ng/mL.

Nota: A solução stock de MT-IIA foi preparada em Tris 10mM, pH 7.4, previamente borbulhada em azoto (pois a MT é facilmente oxidável), numa concentração de 1 mg/mL, sendo posteriormente armazenada a -80°C em alíquotas de 250 µL.

### **3.7. Determinação dos níveis de EROs**

A formação de EROs nas células foi determinada usando a sonda DCFDA (2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato). Este ensaio baseia-se na adição da sonda não-fluorescente DCFDA que permeia a membrana celular de forma passiva, sendo depois desacetilado por esterases formando-se o substrato oxidável 2',-7'-diclorofluoresceína (DCFH) não fluorescente. DCFH reage com as EROs geradas para formar o composto fluorescente 2',7'-diclorofluoresceína (DCF). Uma hora antes de terminar o tempo de incubação com ZyA ou LPS (ver tabela 1), incubaram-se as microglias com DCFDA 10µM durante 1hora a 37°C. Finalmente, a intensidade de fluorescência emitida a 530 nm foi medida fixando o comprimento de onda de excitação a 485 nm, usando um espectrofluorímetro (FluroMax®-4; Horiba Jobin-Yvon).

### **3.8. Medição da produção de óxido nítrico (NO) pela microglia**

A produção de NO foi determinada medindo a quantidade total de nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) (incluindo o nitrato que é convertido em nitrito pelo reagente de Griess), um dos produtos finais da oxidação do NO, libertado para o meio de cultura após incubação com ZyA (0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ou LPS (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Este ensaio baseia-se numa reacção de diazotação que foi descrita originalmente por Griess em 1879, e é baseado na reacção química entre a sulfanilamida (1% sulfanilamida em 5% ácido fosfórico) e o nitrito. O composto resultante reage depois com o NED (0.1% NED em água) formando-se um produto azotado de coloração rosada quantificável por espectrofotometria. Os meios de incubação (50  $\mu\text{l}$ ) contendo o NO formado, foram recolhidos e transferidos para uma placa de 96 poços. A sulfanilamida e o NED competem pelo nitrito na reacção de Griess, e uma maior sensibilidade é alcançada quando as duas soluções são adicionadas em sequência. Então, adicionou-se primeiro a solução de sulfanilamida (50  $\mu\text{l}$ ), incubou-se durante 5-10 minutos, e depois adicionou-se a solução de NED (50  $\mu\text{l}$ ), à temperatura ambiente e protegido da luz. A absorvância foi medida num leitor de placas (Diagnostics Pasteur) a 540 nm.

### **3.9. Avaliação da actividade fagocítica da microglia**

Culturas controlo (expostas a DMEM ou MCA, na ausência de ZyA) e culturas expostas a MCA ou DMEM (durante 24h) e ZyA (por um período adicional de 24h) foram incubadas por 30 minutos (na última meia hora do período de incubação com ZyA), com 0,01% de microesferas de poliestireno fluorescentes (1  $\mu\text{m}$  de diâmetro), e depois lavadas com DMEM completo para remover o excesso de microesferas que não foram encapsuladas. Finalmente, as células foram fixadas em paraformaldeído a 4% (dissolvido em PBS) durante 10 minutos. Depois procedeu-se à marcação dos núcleos com o corante fluorescente Hoescht. Para isso, efectuou-se a permeabilização das células com PBS contendo 1% Triton X-100 durante 5 minutos e de seguida incubou-se com Hoescht (dissolvido em PBS contendo 0,1% Tween-20, à frente designado de PBS-T) a uma concentração final de 2  $\mu\text{M}$  durante 10 minutos. Após esta incubação seguiram-se 3 lavagens com PBS-T. As lamelas com as células foram montadas em lâminas com meio de montagem. Para a quantificação de células fagocíticas, mais de 30 campos diferentes por lamela foram analisados num microscópio de fluorescência invertido Zeiss (Axiobserver Z1, Zeiss) com uma ampliação de 63x. Procedeu-se à contagem das células fagocíticas, que incorporaram as microesferas fluorescentes, e à contagem do número total de células marcadas com Hoescht. O número de células fagocíticas foi apresentado como percentagem do número total de células.

### 3.10. Imunocitoquímica

As microglias foram fixadas em 4% paraformaldeído (dissolvido em PBS) durante 10 minutos e permeabilizadas com 1% Triton X-100 em PBS durante 5 minutos à temperatura ambiente. De seguida, efectuou-se o bloqueio através da incubação com 20% FBS em PBS-T durante 1 hora à temperatura ambiente. Depois da lavagem com PBS-T as células foram então incubadas durante 1 hora, à temperatura ambiente, com os seguintes anticorpos primários: anti-MT-I/II de rato (1:1000) e anti-LRP1 de coelho (1:500) previamente diluídos em PBS-T contendo 1% FBS. Após 6 lavagens sequenciais com PBS-T, para remover o excesso de anticorpo primário, as células foram incubadas durante 1 hora com os anticorpos secundários Alexa Fluor® 546, cabra anti-rato (1:1000), e o Alexa Fluor® 488, cabra anti-coelho (1:200), previamente diluídos em PBS-T contendo 1% FBS. Após 6 lavagens sequenciais com PBS-T, incubaram-se as células com Hoescht (dissolvido em PBS-T) a uma concentração final de 2  $\mu$ M durante 10 minutos. Após esta incubação seguiram-se 3 lavagens com PBS-T. As lamelas com as células foram então montadas em lâminas com meio de montagem. As células foram observadas no microscópio confocal no filtro 594 (Axiobserver Z1, Zeiss) para a marcação para MT-I/II ou no microscópio de fluorescência invertido Zeiss (Axiobserver Z1, Zeiss) para a marcação para LRP1.

### 3.11. Análise de dados e estatística

Os dados foram apresentados como percentagem relativamente aos valores em condições controlo e representam a média  $\pm$  o erro padrão da média (S.E.M) de pelo menos três experiências independentes, realizadas em triplicado (salvo algumas excepções indicadas na legenda das figuras). No caso da avaliação da fagocitose, os dados foram apresentados como percentagem de células fagocíticas relativamente ao número total de células, e representam a média  $\pm$  o erro padrão da média (S.E.M) de, pelo menos, três experiências independentes, realizadas em duplicado (salvo algumas excepções indicadas na legenda das figuras). A análise dos dados foi realizada utilizando-se o GraphPad Prism versão 3.0 e 5.0 para Windows, GraphPad Software, San Diego Califórnia, USA. A análise estatística foi efectuada usando o teste one-way ANOVA seguida pelo teste Bonferroni's Multiple Comparison. Os valores de  $P < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

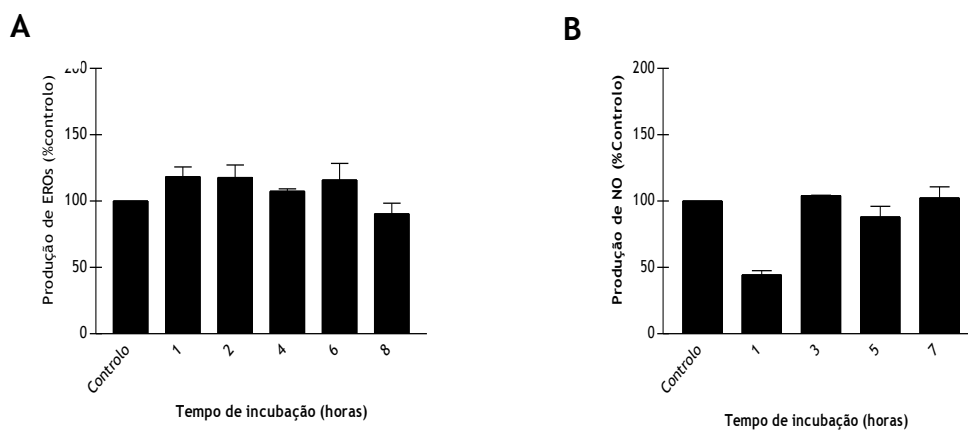
# Capítulo 4 - Resultados

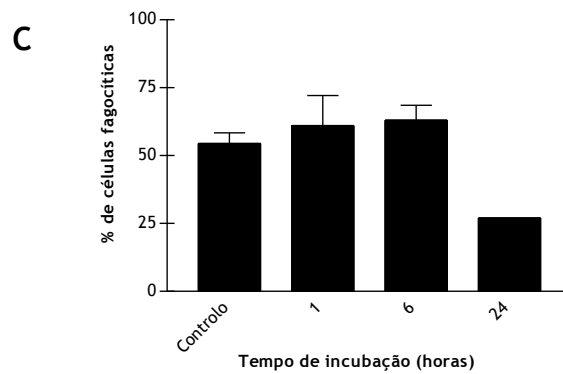
## 4.1. Ensaio com o estímulo inflamatório LPS

O LPS é o principal componente da membrana externa das bactérias Gram-negativas e um potente activador da microglia (Nakamura, et al., 1999). Assim, pretendeu-se otimizar o tempo de incubação com LPS 1µg/mL para medição dos níveis de EROs, produção de NO, e avaliação da actividade fagocítica da microglia.

### 4.1.1. Medição da actividade fagocítica, dos níveis de EROs e produção de NO pela microglia na presença de LPS

A fim de otimizar o tempo necessário para se observar um efeito máximo do estímulo inflamatório LPS, na microglia ao nível da actividade fagocítica e produção de EROs e NO, procedeu-se à incubação destas células com 1µg/mL de LPS durante diferentes períodos de tempo (Figura 4). Os tempos testados foram os seguintes: 1,3,5,7 horas para a medição da produção de NO; 1,2,4,6,8 horas para a produção de EROs; 1,6,24 horas para a medição da actividade fagocítica (tabela 1).





**Figura 4 - Avaliação dos níveis de EROS (A), da produção de NO (B) e actividade fagocítica (C) em culturas de microglia expostas a LPS (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).** Os dados apresentados são expressos em percentagem de controlo (NO e EROS) ou percentagem do número total de células (fagocitose) e representam a média de 3 experiências independentes para EROS e 2 experiências independentes para NO e fagocitose.

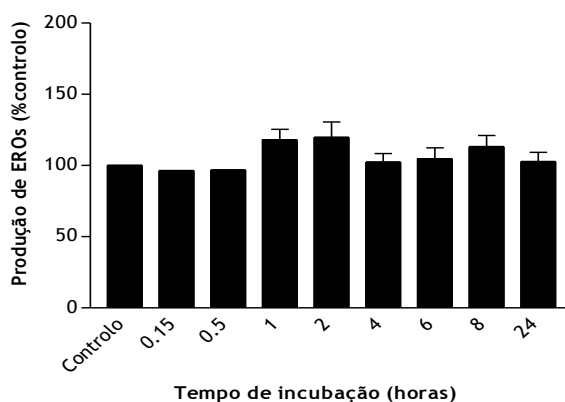
Nos ensaios de medição dos níveis de EROS (Figura 4, A), medição da produção de NO (Figura 4, B), e a actividade fagocítica (Figura 4, C) não se verificaram aumentos significativos na produção de EROS e NO relativamente ao controlo, nem na percentagem de células fagocíticas (relativamente ao número total de células), para nenhum dos tempos de incubação testados.

## 4.2. Ensaio com o estímulo inflamatório ZyA

O ZyA é uma substância derivada da parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Le Cabec, et al., 2000) e é um agente inflamatório capaz de activar a microglia. Tem sido demonstrado em estudos prévios que o ZyA estimula a produção de vários agentes pró-inflamatórios por estas células (Volman, et al., 2005). Assim, pretendeu-se otimizar o tempo de incubação com o estímulo para a concentração de 0,5 µg/mL a nível da produção de NO, EROs e avaliação da actividade fagocítica da microglia.

### 4.2.1. Avaliação dos níveis de EROs, produção de NO e actividade fagocítica pela microglia exposta ao estímulo inflamatório ZyA

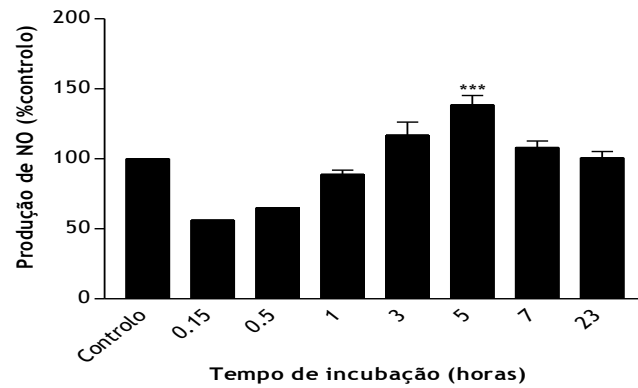
A fim de otimizar o tempo de incubação com ZyA para se observar um efeito máximo ao nível da produção de EROs, NO e da actividade fagocítica da microglia, procedeu-se à incubação destas células com ZyA 0,5 µg/mL durante tempos diferentes. Os tempos testados foram os seguintes: 0.15,0.5,1,3,5,7,23 horas para a medição da produção de NO; 1,2,4,6,8,24 horas para medição dos níveis de EROs; 1,6,24 horas para a medição da actividade fagocítica, tal como anteriormente referido na tabela 1. Os resultados encontram-se representados nas figuras 5, 6 e 7.



**Figura 5 - Produção de EROs pela microglia ao longo do tempo na presença de ZyA 0.5µg/mL.** Os dados apresentados são expressos em percentagem do controlo e representam a média de 4 experiências independentes, à excepção das 0,15 e 0,5 horas que só representam 1 experiência, todas realizadas em triplicado.

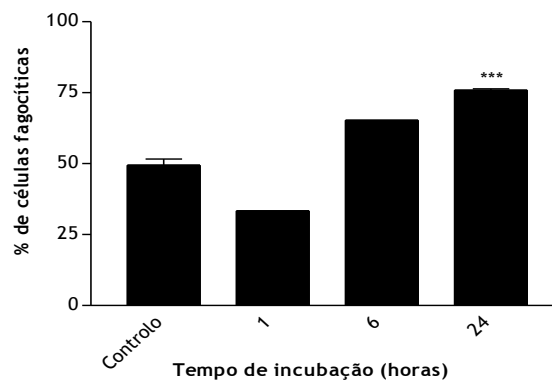
Como se pode ver na figura 5, não se observaram aumentos estatísticos significativos nos níveis microgliais de EROs com o agente pró-inflamatório ZyA 0.5µg/mL, comparando com as culturas controlo, para todos os tempos de incubação utilizados. Apenas se verificou uma

pequena percentagem de aumentos de EROs entre a 1-2horas de estímulo ( $118.1 \pm 7.4\%$  para a 1hora e  $119.8 \pm 10.7\%$  para as 2horas), relativamente ao controlo, mas sem significado estatístico.



**Figura 6 - Avaliação da produção de NO pela microglia ao longo do tempo na presença de ZyA 0.5µg/mL.** Os dados apresentados são expressos em percentagem controlo e representam a média de 4 experiências independentes, à excepção das 0,15 e 0,5 horas que só representam 1 experiência, todas realizadas em triplicado. \*\*\* P <0.001 quando comparado com o controlo.

Relativamente à figura 6, verificou-se um aumento significativo na produção microglial de NO na presença de ZyA 0.5 µg/mL às 5 horas de incubação ( $138,6 \pm 6,7\%$  relativamente ao controlo). Através destes resultados, verificou-se que o melhor tempo de incubação com ZyA para estudar efeitos ao nível da produção de NO, seria às 5horas.

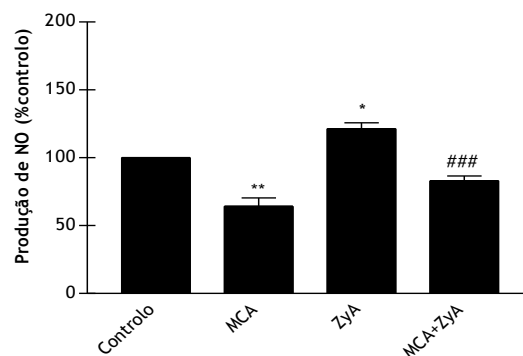


**Figura 7 - Avaliação da actividade fagocítica da microglia ao longo do tempo na presença de ZyA 0.5µg/mL.** Os dados apresentados são expressos em percentagem de células fagocíticas relativamente ao número total de células e representam a média de 1 experiência, à excepção das 24 horas e controlo que representam 3 experiências, todas realizadas em duplicado. \*\*\*P <0.001 quando comparado com o controlo.

Relativamente à figura 7, verificou-se que, após incubação da microglia com uma concentração de ZyA 0.5 µg/mL durante 24 horas houve um aumento significativo da actividade fagocítica microglial (49,4±2,2% e 75,9±0,5% de células fagocíticas, relativamente ao número total de células, para as condições controlo e 24 horas de estímulo com ZyA, respectivamente). Assim, com estes resultados, concluiu-se que o melhor tempo de incubação com ZyA para avaliar a actividade fagocítica da microglia, seria às 24 horas.

### 4.3. Efeito do MCA na actividade fagocítica e produção de NO pela microglia exposta ao estímulo inflamatório ZyA

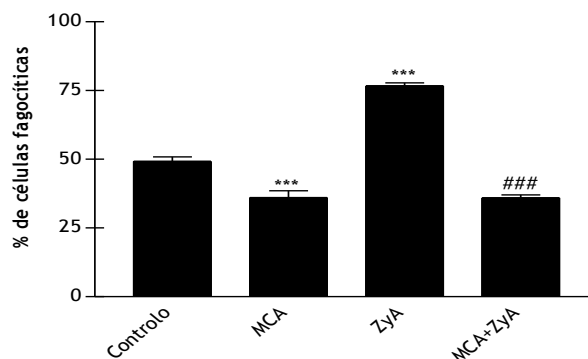
A fim de avaliar o efeito do MCA na actividade fagocítica e na produção de NO pela microglia, exposta a ZyA, as microglias do mesencéfalo ventral foram incubadas com MCA ou DMEM (controlo) durante 24 horas, e posteriormente tratadas com ZyA 0.5µg/mL durante um período adicional de 24 horas (actividade fagocítica) e 5 horas (NO). Os resultados obtidos encontram-se representados nas figuras 8 e 9.



**Figura 8 - Avaliação da produção de NO pela microglia exposta ao MCA ou DMEM (controlo), durante 24 horas, e posteriormente incubada com ZyA 0.5µg/mL durante 5 horas.** Os dados apresentados são expressos em percentagem do controlo e representam a média de 3 experiências independentes realizadas em triplicado. \*P <0.05 e \*\*P <0.01 quando comparado com o controlo, ###P <0.001 quando comparado com o ZyA.

Relativamente à figura 8, verificou-se que, o tratamento com ZyA 0.5 µg/mL aumentou a produção de NO pela microglia (121.4±4.3% de produção de NO relativamente à situação controlo, para a condição ZyA). As células da microglia foram pré-incubadas com MCA durante 24 horas antes do tratamento com o ZyA. O tratamento com MCA preveniu o aumento da

produção de NO induzida pelo ZyA, verificando-se uma diminuição relativamente ao controlo (64.3±6.1%, 83.0±3.7%, produção de NO relativamente ao controlo, para as condições MCA e MCA+ZyA, respectivamente). Estes resultados sugerem que factores solúveis libertados pelos astrócitos podem prevenir a produção de NO pela microglia, induzida por ZyA.



**Figura 9 - Avaliação da actividade fagocítica pela microglia exposta a MCA ou DMEM (controlo) durante 24 horas, e posteriormente incubada com ZyA 0.5µg/mL durante 24 horas. Os dados apresentados são expressos em percentagem de células fagocíticas relativamente ao número total de células e representam a média de 3 experiências realizadas em duplicado. \*\*\*P <0.001 quando comparado com o controlo, ###P <0.001 quando comparado com o ZyA.**

Relativamente à figura 9, verificou-se que, o tratamento com ZyA aumentou a actividade fagocítica, relativamente ao controlo (49,2±1,7%, 76,7±1,1% de células fagocíticas, relativamente ao número total de células, para a condição controlo e ZyA, respectivamente). A pré-incubação da microglia com MCA durante 24 horas antes do tratamento com o ZyA preveniu o aumento da actividade fagocítica induzida pelo ZyA, verificando-se uma diminuição relativamente ao controlo (36,1±2,5%, 35,9±1,0% de células fagocíticas, relativamente ao número total de células, para as condições MCA e MCA+ZyA, respectivamente). Estes resultados sugerem que os factores solúveis libertados pelos astrócitos previnem completamente o aumento da actividade fagocítica microglial induzida pelo ZyA.

#### 4.4. Avaliação do bloqueio da acção da MT I/II presente no MCA na activação microglial induzida por ZyA

De modo a avaliar o papel desempenhado pela MT-I/II expressa pelos astrócitos mesencefálicos (Gauthier, et al, 2008) na prevenção da activação microglial pelo MCA, foi adicionado a este meio o anticorpo anti-MT-I/II, de modo a neutralizar a acção das MT-I/II, através da ligação do anticorpo às respectivas proteínas. O MCA contendo anti-MT-I/II, foi adicionado às culturas de microglia 24 horas antes da estimulação com o ZyA. Após a estimulação com o ZyA 0.5 µg/mL durante 5 horas e 24 horas, procedeu-se à medição da produção de NO e medição da actividade fagocítica, respectivamente (Figura 10).

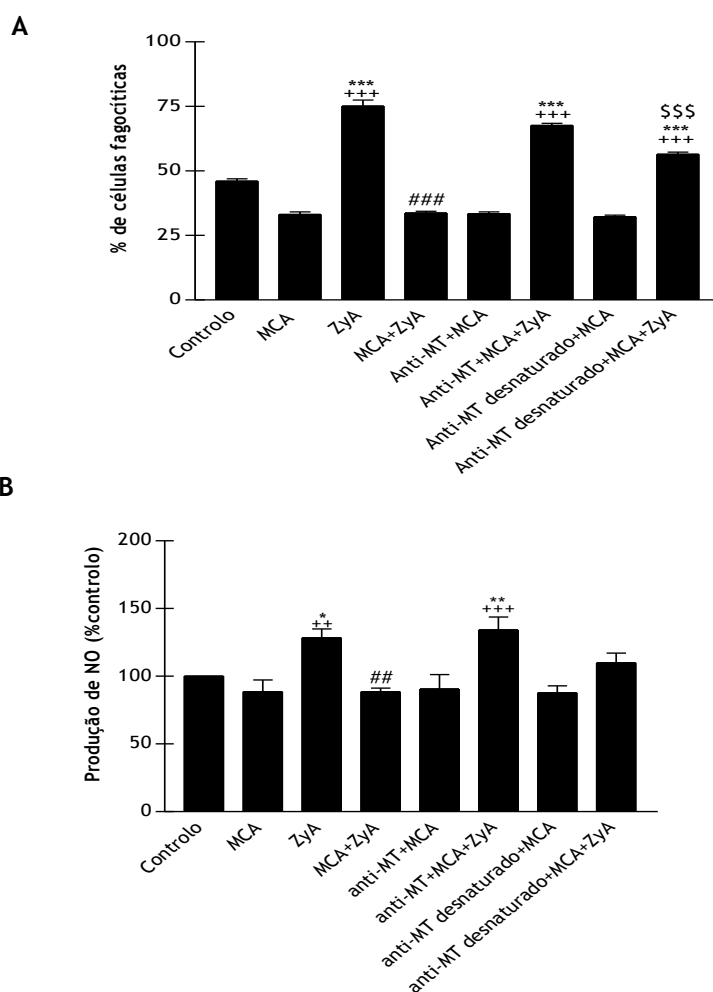


Figura 10 - Avaliação da contribuição da MT-I/II na prevenção, pelos astrócitos, da activação microglial induzida pelo ZyA 0.5 µg/mL. Os dados apresentados são expressos em percentagem de células fagocíticas relativamente ao número total de células (A) e expressos em percentagem do controlo (B) e representam a média de 5 experiências realizadas em duplicado (A) e triplicado (B). \*P <0.05, \*\*P <0.01 e \*\*\*P <0.001 quando comparado com o controlo, ##P <0,01 e ###P <0.001 quando comparado com o ZyA, \*\*P <0.01 e \*\*\*P <0.001 quando comparado com o MCA e \$\$\$P <0.001 quando comparado com a anti-MT+MCA+ZyA.

Os resultados apresentados na figura 10, demonstram que ocorreu um aumento do número de células fagocíticas microgliais (A) e um aumento da produção de NO microglial (B), relativamente ao controlo quando incubadas com o ZyA 0.5 µg/mL (46.1±0.9%, 75.1±2.3% de células fagocíticas, relativamente ao número total de células, para as condições controlo e ZyA, respectivamente e 129.0±6.4% de produção de NO relativamente ao controlo para a condição ZyA). A adição de MCA 24 horas antes da incubação com o ZyA, impediu a activação microglial induzida pelo ZyA, com um número de células fagocíticas e produção de NO abaixo dos valores controlo (33.7±0.6% de células fagocíticas, relativamente ao número total de células e 92.6±5.0% de produção de NO microglial relativamente à percentagem controlo, para a condição MCA+ZyA). A MT-I/II foi bloqueada pela adição do anticorpo Anti-MT I/II ao MCA, e, nesta condição experimental, o número de células fagocíticas e produção de NO permaneceu semelhante ao observado para a situação contendo ZyA (67.6±0.8% de células fagocíticas, relativamente ao número total de células e 134.2±9.6% de produção de NO microglial, relativamente ao controlo, para a condição MCA+ZyA+Anti-MT-I/II). O anticorpo anti-MT-I/II desnaturado foi usado como controlo negativo. Para esta condição obteve-se uma percentagem de células fagocíticas, acima dos valores do controlo (56.5±0.8 de células fagocíticas, relativamente ao número total de células e 10.9±7.2 de produção de NO relativamente ao controlo, para a condição MCA+ZyA+Anti-MT-I/II desnaturada). No entanto estes valores foram inferiores aos valores obtidos na presença de ZyA, e aos valores obtidos quando a acção de MT-II foi bloqueada no MCA, na presença de ZyA (MCA+ZyA+Anti-MT-I/II). Isto poderá significar que a elevada percentagem de células fagocíticas e produção de NO microglial observada na presença de MCA+Anti-MT-I/II é devido ao bloqueio da acção da MT-I/II no MCA.

#### 4.5. Importância da MT-IIA na prevenção da activação microglial induzida pelo ZyA

De modo a avaliar o papel da MT-IIA na prevenção da activação microglial induzida pelo ZyA, foi adicionada MT-IIA à cultura de microglia 24 horas antes da estimulação com o ZyA e testadas várias concentrações, nomeadamente 3,5, 50 e 100 ng/mL. Após a estimulação com ZyA 0.5 µg/mL durante 5 horas e 24 horas, procedeu-se à medição da produção de NO e medição da actividade fagocítica respectivamente (figura 11).

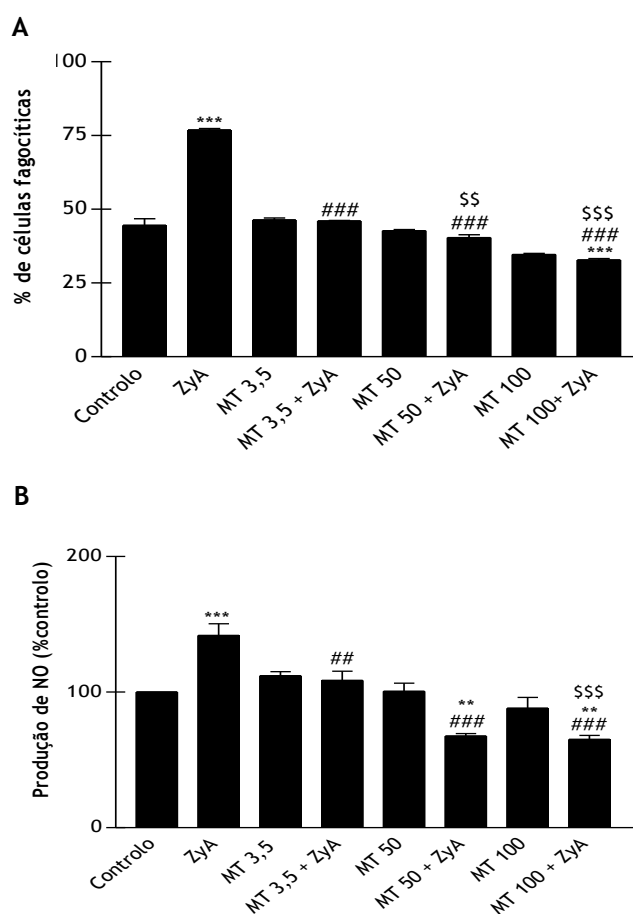


Figura 11 - Avaliação do papel da MT-IIA na prevenção da activação microglial induzida pela concentração de ZyA 0.5 µg/mL. A microglia foi incubada com DMEM, durante 24 horas, na ausência (controlo) e na presença de diferentes concentrações de MT-IIA (3,5; 50 e 100ng/mL) sendo posteriormente exposta a ZyA 0,5µg/mL por um período adicional de 24 horas (A) ou 5 horas (B). Os dados apresentados são expressos em percentagem de células fagocíticas relativamente ao número total de células (A) e em percentagem do controlo (B) e representam a média de 3 experiências realizadas independente em duplicado (A) e triplicado (B). \*\*\*P <0.001 e \*\*P <0.01 quando comparado com o controlo, ###P <0.001 e ##P <0.01 quando comparado com o ZyA e SSSP <0.001 quando comparado com a MT 3.5+ZyA.

Os resultados apresentados na figura 11, demonstram que ocorreu um aumento do número de células fagocíticas microgliais e produção de NO, relativamente ao controlo, após incubação com o ZyA 0.5 µg/mL (44.5±2.3%, 76.9±0.45% de células fagocíticas, relativamente ao número total de células, para as condições controlo e ZyA, respectivamente e 141.8±8.6% de produção de NO relativamente ao controlo para a condição ZyA). Na presença de MT-IIA, em qualquer das concentrações testadas, o número de células fagocíticas e produção de NO microglial remeteu-se para percentagens de controlo ou mesmo abaixo deste, quando incubadas com ZyA (46.0±0.2%; 40.4±1.0% e 32.8±0.5% de células fagocíticas, relativamente ao número total de células; 108.5±6.9%; 67.6±1.8% e 65.1±3.0% de produção de NO, relativamente ao controlo, para as condições MT-IIA 3.5ng/mL+ZyA, MT-IIA 50ng/mL+ZyA e MT-IIA 100ng/mL+ZyA, respectivamente). Para concentrações de MT-IIA de 50 e 100 ng/mL, e na presença de ZyA, observou-se uma maior diminuição do número de células fagocíticas e produção de NO microglial relativamente ao observado na presença de MT-IIA de 3.5ng/mL e ZyA, remetendo para percentagens abaixo do controlo.

#### 4.6. Avaliação da viabilidade celular da microglia na presença do estímulo inflamatório ZyA

Com o objectivo de avaliar a viabilidade da microglia na presença de ZyA 0,5 µg/mL, realizou-se o teste do MTT para diferentes tempos de incubação com ZyA (Figura 12).

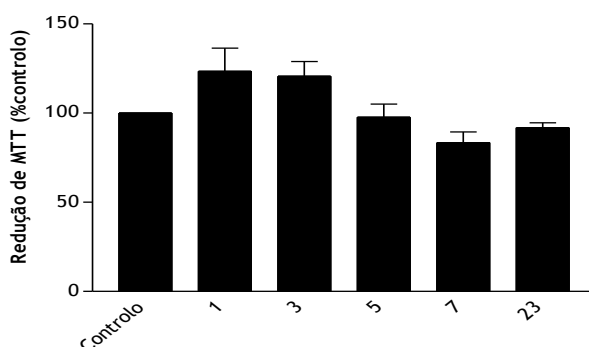


Figura 12 - Avaliação da viabilidade celular da microglia na ausência (controlo) e na presença de ZyA 0,5µg/mL, durante vários tempos de incubação, através do ensaio de MTT. Os dados apresentados são expressos em percentagem do controlo e representam a média de uma experiência realizada em triplicado.

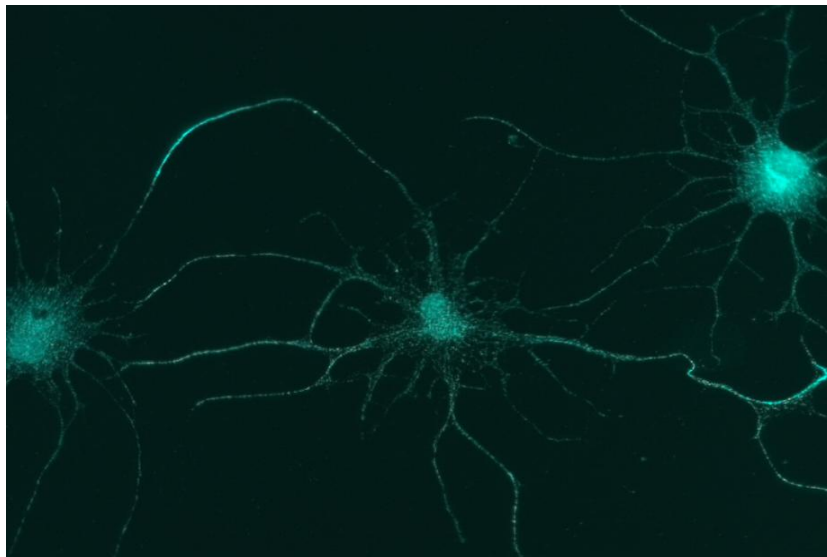
Os resultados obtidos na figura 12, mostram que não ocorre morte celular acentuada com o estímulo de ZyA 0.5 µg/mL para qualquer um dos tempos de incubação testados, sendo que às

5 e às 23 horas, tempos de incubação com ZyA relevantes para este trabalho, obtiveram-se valores de  $97,6 \pm 7,4\%$  e  $91,8 \pm 2,7\%$ , respectivamente, para a redução de MTT pela microglia.

#### 4.7. Avaliação da expressão do receptor LRP1 na microglia

Dados anteriores deste trabalho, mostraram que as MT-I/II, e especificamente a MT-IIA, libertadas pelos astrócitos previnem a activação microglial induzida pelo ZyA. No entanto, o modo como as MT-I/II interagem com a microglia ainda não é conhecido.

Alguns estudos descrevem que as MT-I/II interagem especificamente com os membros da família de receptores da superfície celular de lipoproteínas, incluindo o receptor da lipoproteína-1 (LRP-1) (West, et al., 2011). A microglia expressa alguns dos receptores LRP (Chung, et al., 2009), que podem interagir com as MTs e mediar a sua acção na microglia. Assim, foi-se avaliar a expressão do receptor LRP1 na microglia do mesencéfalo ventral, utilizada neste estudo (Figura 13).



**Figura 13 - Avaliação da expressão do receptor LRP1 na microglia do mesencéfalo ventral.** Imagem de fluorescência representativa da cultura de microglia incubada previamente com anticorpo anti-LRP1. A imagem foi obtida através de um microscópio de fluorescência invertido Zeiss (Axiobserver Z1, Zeiss); ampliação 40x.

A figura 13 mostra que o receptor LRP1 é amplamente expresso na microglia do mesencéfalo ventral, observando-se a sua presença ao nível do corpo celular e prolongamentos das células.

## Capítulo 5 - Discussão dos resultados

A neuroinflamação envolve principalmente a actividade de dois tipos de células gliais, astrócitos e microglia, ocorrendo com frequência em distúrbios neurológicos, nomeadamente na DP (revisto por Bolognin, et al., 2009). Como resposta a alterações no ambiente, particularmente lesões neuronais, a microglia exhibe alterações morfológicas, prolifera, torna-se fagocítica, e regula a expressão de um grande número de moléculas, tais como citocinas (TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ), moléculas de adesão, receptores de membrana, e factores de transcrição. Este processo, chamado de activação da microglia, é uma resposta fisiológica que visa proteger o tecido neuronal afectado (revisto por Saura, et al., 2003). Portanto, é provável que a microglia desempenhe papéis críticos no estabelecimento e manutenção das respostas inflamatórias no contexto de doenças neurodegenerativas (Glass, et al., 2010). Devido à capacidade de produção de espécies altamente neurotóxicas, nomeadamente EROs e NO, a microglia activada pode participar também na patogénese de doenças neurodegenerativas como a DP, tendo aqui um papel neurotóxico, potenciador da morte neuronal (revisto por Mastroeni, et al., 2009; Long-Smith, et al., 2009).

Com este trabalho pretendeu-se investigar o papel das MT-I/II libertadas pelos astrócitos mesencefálicos, na regulação do estado de activação da microglia através da análise da actividade fagocítica microglial, dos níveis celulares de EROs e da produção de NO após exposição aos agentes inflamatórios LPS e ZyA.

De forma a estudar o efeito dos factores solúveis libertados pelos astrócitos na regulação da reactividade microglial, efectuaram-se culturas primárias de microglia do mesencéfalo ventral, que se obtêm por tripsinização de uma cultura mista de células da glia confluenta, após 21 dias em cultura. Através deste método, a microglia foi isolada, com elevado grau de pureza, após o desprendimento de uma camada de células intactas contendo praticamente todos os astrócitos, deixando uma população de células aderentes à superfície da placa da cultura, identificadas como microglia. Devido ao seu elevado rendimento, este método pode ser especialmente útil quando grandes quantidades de proteína microglial/mARN são necessários (Saura, et al., 2003). Existe um outro método, mais utilizado para obtenção da microglia. Através dele, as microglias são separadas de culturas primárias mistas gliais confluentes por agitação num agitador rotativo, permitindo a preparação de culturas microgliais altamente enriquecidas. No entanto, a quantidade de microglias obtidas por este último método é baixa, comparando com o método de tripsinização que tem um elevado rendimento. Além disso, a pureza das culturas de microglia obtidas por agitação é muito variável sendo a contaminação com astrócitos o principal problema encontrado. O método de tripsinização é simples, reprodutível, versátil e permite a preparação de culturas microgliais de elevada pureza (>98%) (Saura et al., 2003). As microglias obtidas com este método são funcionais como avaliado pela sua capacidade de proliferação, fagocitose, mudança de

morfologia, libertação de NO, EROs e TNF- $\alpha$ , em resposta a estímulos específicos. A microglia isolada por tripsinização responde a M-CSF, LPS e IFN- $\gamma$  o que é característico destas células (Saura et al., 2003).

Neste trabalho, começou-se pelo uso do LPS como agente inflamatório, e procedeu-se à medição dos níveis de EROs, da produção de NO e avaliação da actividade fagocítica. Ao contrário do que está descrito, para estas culturas de microglia não se verificou indução de produção de EROs, NO e actividade fagocítica na presença de 1 $\mu$ g/mL de LPS. Assim, pelo facto de este estímulo possivelmente não ter funcionado com estas culturas microgliais, ou pela perda de actividade deste agente inflamatório, que pode ocorrer ao longo do tempo com ciclos sucessivos de congelação/dcongelação, optou-se pelo uso de outro estímulo inflamatório, o ZyA.

Estudos anteriormente efectuados pelo nosso grupo, indicaram que a concentração de ZyA de 0,5  $\mu$ g/mL provoca um aumento acentuado da actividade fagocítica microglial, bem como da produção de EROs, sem no entanto induzir a morte destas células (Cristóvão, et al., 2010).

Uma vez que estes estudos anteriores foram realizados em culturas primárias de microglia obtidas por agitação, neste trabalho, sendo utilizado um método diferente, foi necessária a optimização dos tempos de incubação com ZyA para avaliação de produção de EROs, NO e actividade fagocítica nas culturas primárias de microglia. Tal optimização é relevante uma vez que se verificou que as células obtidas por tripsinização não apresentam uma morfologia tão ramificada como as microglias obtidas pelo método de agitação, podendo o comportamento das células ser diferente. Também se optimizou (embora não apresentado nos resultados, pois foi efectuada apenas uma experiência) qual o melhor dia após a tripsinização e com incubação de ZyA em que se observa uma maior reactividade microglial em termos de aumento de actividade fagocítica e produção de NO e EROs. Testou-se os 2, 5 e 8 dias, e verificou-se que os 5 dias eram o melhor dia para as experiências, pois com a incubação com o ZyA verificou-se um maior aumento de actividade fagocítica e produção de NO e EROs.

Com este estudo, observou-se um maior aumento de produção microglial de NO ( $\approx$ 38,6%) na presença de ZyA 0.5  $\mu$ g/mL às 5 horas deste estímulo relativamente ao controlo, concluindo-se então que o tempo de estímulo para se observarem alterações máximas na produção de NO é de 5 horas comparando com os outros tempos de estimulação testados. Quanto à medição da actividade fagocítica microglial verificou-se que com uma concentração de ZyA 0.5  $\mu$ g/mL durante 24 horas houve um maior aumento de actividade fagocítica microglial ( $\approx$ 26,4%) em comparação com outros tempos de estimulação testados. Assim, com estes resultados, verificou-se que o melhor tempo de estímulo para avaliar a actividade fagocítica é de 24 horas. Quanto à produção microglial de EROS na presença de ZyA, não se observaram aumentos significativos, comparativamente ao controlo, para todos os tempos de incubação

testados, sendo que deixou-se de efectuar este método, possivelmente devido à falta de sensibilidade do leitor de placas acoplado ao espectrofluorímetro.

Para avaliar a viabilidade celular da microglia nestas culturas, estimuladas com o ZyA 0.5 µg/mL, utilizou-se o método do MTT. Os resultados obtidos demonstraram que não ocorre morte celular com o estímulo de ZyA para qualquer tempo de incubação com ZyA testado, incluindo as 5 e as 23 horas.

Neste trabalho laboratorial a fim de determinar se os factores solúveis libertados pelos astrócitos podem regular o estado de activação microglial, foi-se avaliar o efeito do MCA na actividade fagocítica e na produção de NO pela microglia, na presença de ZyA. Verificou-se que após uma exposição de 5 horas com ZyA, este tratamento aumentou a produção de NO ( $\approx 21.4\%$ ) relativamente ao controlo. As microglias que foram pré-incubadas com MCA durante 24 horas antes do tratamento com o ZyA, não demonstraram um aumento da produção de NO relativamente ao controlo. Para a actividade fagocítica, após uma exposição de 24 horas com ZyA, verificou-se um aumento da actividade fagocítica ( $\approx 29\%$ ), relativamente ao controlo. As microglias que foram pré-incubadas com MCA durante 24 horas antes do tratamento com o ZyA não demonstraram um aumento da actividade fagocítica. Ou seja, na ausência de condicionamento de astrócitos, ocorreu um aumento na actividade fagocítica, não se verificando o mesmo quando as células foram pré-incubadas com MCA antes da exposição a ZyA. Estes resultados tanto a nível da produção de NO, como da actividade fagocítica microglial, sugerem que factores solúveis libertados pelos astrócitos previnem a activação microglial induzida pelo agente inflamatório ZyA.

Estudos descrevem que, uma variedade de factores solúveis libertados pelos astrócitos pode estar envolvida na ramificação da microglia na cultura mista de células cerebrais (Tanaka, et al., 1999). Entre os factores solúveis derivados de astrócitos, o M-CSF tem sido frequentemente proposto como o candidato mais provável para induzir a ramificação. O M-CSF, produzido e libertado por astrócitos, induz mudanças morfológicas na célula microglial e redução dos níveis de EROs e produção de NO por estas células (Tanaka, et al., 1999; Chung, et al., 2010).

Estudos prévios desenvolvidos pelo nosso grupo demonstraram que mediadores solúveis de baixo peso molecular ( $<10$  kDa), libertados pelos astrócitos mesencefálicos, são capazes de prevenir a activação da microglia induzida pelo agente inflamatório ZyA, sendo que, as MTs com um peso molecular de 6-7 kDa, são possíveis candidatas a testar, uma vez que são expressas pelos astrócitos e é conhecido o seu efeito neuroprotector no SNC (Ebadi, et al., 2005; Stankovic, et al., 2007).

Assim, no presente trabalho, de modo a avaliar o papel desempenhado pelas MT-I/II expressas pelos astrócitos mesencefálicos, na modulação/prevenção da activação microglial pelos astrócitos, utilizou-se o anticorpo anti-MT-I/II para bloquear a acção das MT-I/II no MCA,

através da ligação específica do anticorpo às respectivas proteínas. O MCA contendo anti-MT-I/II, foi adicionado às culturas de microglia 24 horas antes da estimulação com o ZyA. Após a estimulação com o ZyA 0.5 µg/mL durante 5 e 24 horas, procedeu-se à medição da produção de NO e medição da actividade fagocítica, respectivamente. Os resultados obtidos demonstraram que os aumentos no número de células fagocíticas microgliais e produção de NO, relativamente ao controlo, após exposição a ZyA 0.5 µg/mL, não se observaram quando as células foram previamente incubadas com MCA durante 24 horas. Quando a acção das MT-I/II foi bloqueada pela adição do anticorpo Anti-MT-I/II ao MCA, o número de células fagocíticas e a produção de NO permaneceu relativamente semelhante ao observado para a situação contendo ZyA, o que sugere que o bloqueio da acção da MT-I/II no MCA não previne a activação microglial induzida pelo estímulo inflamatório. O anticorpo anti-MT-I/II desnaturado foi usado como controlo negativo, de forma a anular o efeito específico da ligação às MT-I/II. Para esta condição obteve-se uma percentagem de células fagocíticas e produção de NO microglial, um pouco superior ao esperado, isto é acima dos valores do controlo. No entanto estes valores foram inferiores aos valores obtidos na presença de ZyA, e para a condição experimental MCA+ZyA+Anti-MT-II. Com base nestes resultados e nos dados obtidos na literatura, as MT-I/II poderão ser potenciais alvos terapêuticos na modulação da actividade das principais células envolvidas na inflamação associada à DP, nomeadamente a microglia, mostrando-se aqui a importância dos astrócitos na modulação da neuroinflamação.

Alguns estudos verificaram a existência de aumentos de MT-I/II na astrogliia em doenças degenerativas, como a DP (revisto por Penkowa, 2006). As MT-I/II podem desempenhar um importante papel na DP, através da indução da sua síntese pelas citocinas pró-inflamatórias libertadas pela microglia activada. A indução de MTs, além da desintoxicação de metais, ajuda na eliminação de EROs, activação do complexo-1, atenuação da nitração de  $\alpha$ -sinucleína, e supressão de citocinas pró-inflamatórias, nomeadamente TNF- $\alpha$ , e NFkB envolvidas na etiopatogenia da DP e envelhecimento (Ebadi, et al., 2005). O aumento da expressão de MT-I/II em astrócitos pode resultar da indução por IL-1 libertada pela microglia activada, radicais livres, metais libertados a partir de células degenerativas ou proteínas plasmáticas que entram no cérebro devido à ruptura da barreira hematoencefálica. Além disso, as MT-I/II têm sido associadas à prevenção do stress oxidativo e protecção contra danos no ADN, o que pode explicar a elevada expressão astrocitária de MT-I/II (Mirza, et al., 2000). Estudos usando ratos *knockout* para a MT-I/II, demonstraram que as MTs têm um papel regulador na resposta inflamatória e regeneradora a uma lesão no cérebro (Hozumi, et al., 2004).

Foi demonstrado que a MT protege contra vários tipos de condições inflamatórias em ratos, implicando indução da MT e/ou suplementação de zinco com o objectivo de melhorar possíveis opções terapêuticas para doenças inflamatórias, embora pesquisas adicionais são necessárias para concluir sua utilidade clínica (Inoue, et al., 2009; Yu, et al., 2011).

É possível que, dentro do cérebro, uma série de factores conhecidos como indutores da expressão de MT-I/II em cultura, incluindo zinco, glutamato e citocinas, regulem a expressão de MT-I/II em resposta a lesões (Chung, et al., 2008). Recentemente, experiências em ratos transgénicos para a MT indicaram que as MTs têm um papel protector na lesão cerebral. Por exemplo, os ratinhos *knockout* (KO) para as MT-I/II (MT-KO) são susceptíveis a agentes químicos, físicos e a lesão cerebral, enquanto os ratos que sobre-expressam isoformas de MT no cérebro são comparativamente mais resistentes a lesões (revisto por Chung et al., 2003). Apesar de não ser claro o modo como as MTs agem para proteger os neurónios após lesão, alguns estudos sugerem uma acção extracelular. Tem sido demonstrado que a expressão de MT-I/II é rapidamente sobre-regulada em astrócitos em resposta à lesão neuronal, em cultura e a seguir a lesões cerebrais corticais, em parte, mediada pela comunicação rápida entre os neurónicos e os astrócitos. Em paralelo a uma série de outros estudos, este é mais um indício da importância recentemente identificada das MTs na resposta celular à lesão neuronal (revisto por Chung et al., 2003).

Estudos sobre as funções antioxidantes das MT-I/II *in vivo* no cérebro com deficiência na produção de MT-I/II, resultaram na formação de EROs amplificada e stress oxidativo, incluindo peroxidação lipídica altamente aumentada, nitrosilação de proteína e oxidação do ADN, quando comparado com os controlos *wild type* (WT) (revisto por Chung et al., 2003). Além disso, ratinhos KO para as MT-I/II demonstraram que a neurodegeneração aumentou significativamente e aumentou a morte celular por apoptose em relação aos controlos WT como mostrado durante o traumatismo crânio-encefálico. Durante estes distúrbios cerebrais, os ratos MT-KO também desenvolveram sintomas clínicos piores e demonstram uma evolução neurológica reduzida em relação aos controlos WT (Chung et al., 2003).

Nas patologias cerebrais, as MT-I/II são essenciais para o recrutamento de células precursoras neurológicas e a sua migração para o local da lesão. Estes resultados indicaram que as MT-I/II inibem as citocinas pró-inflamatórias de forma eficiente, EROs, NO, MMPs e sinais pró-apoptóticos, que juntos podem causar uma ampla gama de distúrbios cerebrais (revisto por Stankovic, et al., 2007). Como mostrado em vários estudos, os níveis de MT-I /II estão inversamente relacionados com o grau de dano cerebral observado após lesão traumática e com a presença de doenças neurodegenerativas, como a DP (revisto por Stankovic, et al., 2007). Outros estudos também demonstraram que a administração de MT astrocitária exógena atenua a resposta neuroinflamatória ao reduzir a activação da microglia e fornece neuroprotecção após lesões cerebrais. Estes resultados demonstraram as propriedades neuroimunomodulatórias da MT assim como a sua acção directa supressiva sobre a neuroinflamação (Chung et al., 2009).

A compreensão dos mecanismos de acção das MTs no metabolismo oxidativo (e sua modificação por  $Zn^{2+}$ ) pode fornecer novos alvos para fármacos a serem usados no tratamento

de doenças neurológicas como a DP, onde o stress oxidativo está implicado (Gauthier, et al., 2008).

Estudos recentes descrevem que a MT-IIA humana (a principal isoforma humana de MT-I/II) tem capacidade para melhorar a recuperação neuronal após uma lesão por acção directa sobre os neurónios. Este dado sugere que a MT promove a recuperação neuronal por dois mecanismos distintos: através da diminuição da resposta inflamatória associada com lesão e por promover directamente a recuperação neuronal (Chung, et al., 2003). A administração directa de MT-IIA promove a regeneração axonal exacerbada após lesão no neocórtex de ratos adultos (Chung, et al., 2008).

De modo a avaliar o papel da MT-IIA na prevenção da activação microglial, no presente trabalho experimental, adicionou-se a proteína MT-IIA exogenamente à cultura de microglia 24 horas antes da estimulação com o ZyA. Um estudo descreveu que os níveis de MT-I/II presentes no meio de astrócitos estão abaixo de 0.1-5.0µg/ml, e nestas concentrações a MT-I/II extracelular promove crescimento de neurites em cultura. No entanto, é provável que as concentrações locais de MT-I/II nas junções entre astrócitos e neurónios *in vivo* sejam muito maiores (Chung et al., 2008). Com base neste estudo, decidiu-se então testar várias concentrações de MT-IIA, nomeadamente, 3.5, 50 e 100 ng/mL, para verificar qual era a concentração que atenuava os efeitos do ZyA na microglia. Após a estimulação com ZyA 0.5 µg/mL durante 5 e 24 horas, procedeu-se à medição da produção de NO e avaliação da actividade fagocítica, respectivamente. Para qualquer uma das concentrações de MT-IIA testadas, o número de células fagocíticas e a produção de NO pela microglia remeteu-se para valores de controlo ou mesmo abaixo deste, mesmo quando as células são expostas a ZyA. Com concentrações de MT-IIA de 50 e 100 ng/mL observou-se maior diminuição do número de células fagocíticas e de produção de NO pela microglia, remetendo para percentagens abaixo do controlo. Estas experiências demonstraram que a MT-IIA pode reduzir a actividade fagocítica e produção de NO microglial, podendo ser importante no controlo da activação microglial em resposta a lesões ou infecções.

O modo da acção da MT na microglia não é ainda conhecido. Recentemente, foi descrito que a MT pode-se ligar a um receptor pertencente à família dos receptores de lipoproteínas de baixa densidade (LDLR) existente na membrana epitelial nos rins (revisto por Asmussen, et al., 2009). Além disso, foi demonstrado que receptores de lipoproteína de baixa densidade (LRP-1 e megalina) pertencentes à família LDLR são expressos em neurónios em cultura do cerebelo de ratinho e parecem mediar a ligação da MT ou o seu transporte através da membrana neuronal (Asmussen, et al., 2009). O LRP-1 é um receptor endocítico amplamente expresso em todo o corpo dos mamíferos, incluindo o SNC (West, et al., 2011), tendo sido demonstrado que a sua activação aumenta os níveis de AMPc intracelular (Asmussen, et al., 2009). As MTs tem destaque pelas suas interacções com os receptores LRP que parecem ser capazes de explicar, pelo menos, algumas das propriedades neuroprotectoras exibidas por

proteínas de estruturas muito diferentes e abundantes. Neste contexto, os receptores LRPs podem agir como integrantes associados a moléculas do stress e quando um limite é atingido, activa vias intracelulares levando à neuroprotecção. Isto poderá ser uma estratégia de sucesso terapêutico para a neuroprotecção (Antonelli, et al., 2011)

Até à data, as interacções de MTs com LRP1 e megalina têm sido mais investigadas, embora continue a ser uma possibilidade de que as MTs podem também interagir com outros membros da família LDL.

O LRP1 está presente em vários tipos de neurónios, em terminais astrocíticas e pericitos, mas não em células epiteliais da vasculatura e pode activar vias de sinalização intracelulares. Uma série de outras respostas celulares são accionadas por LRPs, por exemplo, a estimulação da migração celular. Foi demonstrado que as MTs exógenas têm efeitos sobre a migração de outras células, incluindo leucócitos e queratinócitos, e esta pode ser mediada por LRPs. A descoberta da interacção de MT com os receptores da família LDL, particularmente LRP1 e megalina, prevê ainda um mecanismo plausível pelo qual a MT extracelular pode exercer essas acções (West, et al., 2011). As células de microglia são descritas como células que expressam alguns dos receptores LRP, o que pode fornecer um mecanismo para facilitar a acção da MT sobre a microglia (Chung, et al., 2009).

Assim, neste trabalho, avaliou-se a expressão do receptor LRP1 na microglia em cultura obtida a partir do mesencéfalo ventral e verificou-se que estas células expressam este receptor. Será pertinente no futuro avaliar se a acção das MT-I/II (e MT-IIA) sobre a reactividade microglial é mediada pelo receptor LRP1, não havendo nada descrito na literatura sobre isto.

Os resultados apresentados no presente trabalho, em conjunto com resultados já descritos na literatura, contribuem para uma melhor compreensão do papel das MT-I/II, e em particular da MT-IIA, produzidas pelos astrócitos no controlo da activação microglial induzida pelo estímulo pró-inflamatório ZyA. Estes resultados indicam que no futuro as MT-I/II e, mais especificamente, a MT-IIA poderão ser utilizadas como importantes agentes anti-inflamatórios na terapia de doenças neurodegenerativas, como a DP.

## Capítulo 6 - Conclusão

Este estudo permitiu investigar o papel das MT-I/II libertadas pelos astrócitos mesencefálicos, na regulação do estado de activação da microglia através da análise da actividade fagocítica microglial e da produção de NO após exposição ao agente inflamatório ZyA, tendo-se obtido as seguintes conclusões:

- A pré-incubação de culturas microgliais do mesencéfalo ventral com MCA impediu o aumento da actividade fagocítica microglial e produção de NO induzida pelo agente pró-inflamatório ZyA. Este resultado indica que factores solúveis libertados pelos astrócitos são capazes de modular a reactividade microglial.
- As MT-I/II expressas pelos astrócitos têm um papel importante na comunicação astrócitos-microglia, estando envolvidas na prevenção, pelos astrócitos, da activação microglial induzida por 0,5 µg/mL de ZyA. Este facto foi confirmado pela utilização do anticorpo anti-MT-I/II e pela desnaturação deste, através da avaliação da actividade fagocítica e produção de NO pela microglia.
- A MT-IIA pode ter um papel importante no controlo da activação microglial em resposta a lesões ou infecções. Este facto foi confirmado pela adição exógena de MT-IIA às culturas de microglia, antes da incubação com ZyA, através da avaliação da actividade fagocítica e produção de NO pela microglia.
- A microglia do mesencéfalo ventral expressa o receptor LRP-1 que poderá mediar a acção anti-inflamatória das MT-I/II, e em particular, da MT-IIA.

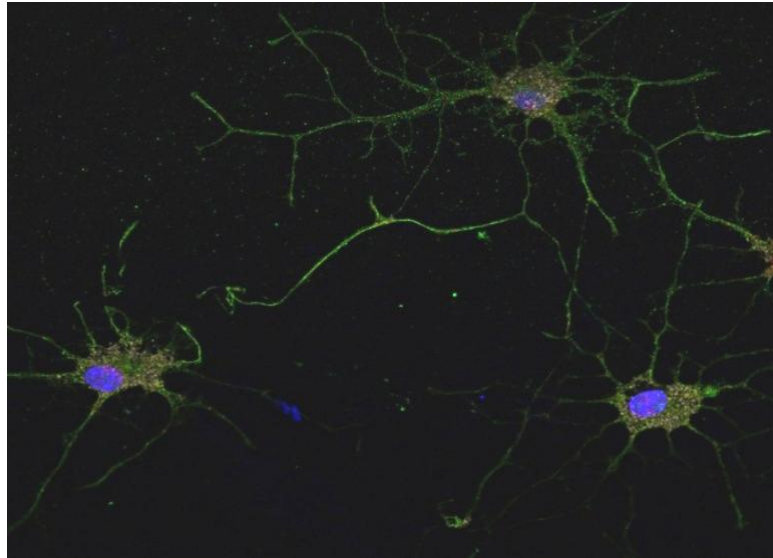
Os resultados apresentados no presente trabalho experimental, poderão contribuir para uma melhor compreensão do papel das MT-I/II produzidas pelos astrócitos no controlo da activação microglial induzida pelo estímulo pró-inflamatório ZyA. Estes resultados sugerem que as MT-I/II e, em particular a MT-IIA, são importantes agentes anti-inflamatórios que poderão ter um papel promissor na terapia de doenças neurodegenerativas, como a DP.

## Capítulo 7 - Perspectivas Futuras

Como trabalho futuro, propomos:

- 1) Confirmar a presença das MT-I/II no meio extracelular por Western-Blot.
- 2) Quantificar a concentração de MTs no MCA por radioimunoensaio.
- 3) Obter meio condicionado por astrócitos previamente silenciados para a MT e testar o seu efeito na activação da microglia induzida pelo ZyA.
- 4) Investigar se o receptor LRP1, expresso na microglia do mesencéfalo ventral, medeia a acção das MT-I/II, recorrendo à imunocitoquímica e também ao bloqueio deste receptor na cultura de microglia, observando-se o efeito deste bloqueio ao nível da produção de NO e de actividade fagocítica microglial após exposição ao ZyA.
- 5) Investigar a participação do receptor megalina na acção anti-inflamatória das MT-I/II, avaliando, em primeiro lugar, a sua expressão na microglia (uma vez que não está ainda descrito na literatura) e, caso seja expresso, avaliar o seu papel na modulação da reactividade microglial pelas MTs libertadas pelos astrócitos.
- 6) Avaliar o efeito da MT-III na cultura de microglia pois esta proteína existe no SNC (Gauthier, et al., 2008). O seu papel neuroprotector na DA tem vindo a ser reconhecido, sendo pertinente averiguar se poderá ter um papel anti-inflamatório na DP. Assim, poder-se-ia avaliar o efeito desta MT ao nível da produção de NO e da actividade fagocítica antes da exposição ao ZyA.
- 7) Investigar o modo de acção das MTs na microglia, nomeadamente, se a sua acção anti-inflamatória se deve à ligação a receptores membranares e/ou à sua internalização por estas células. Uma vez que a microglia expressa MT-I/II (Anexo 1), a estratégia para avaliar este ponto passará por adicionar exogenamente MT marcada com um fluoróforo e depois seguir o seu destino na microglia por microscopia de fluorescência.
- 8) Realizar estudos *in vivo*, pois a utilização de animais como modelo experimental permite a reprodução das condições normais do organismo, sendo as respostas obtidas mais próximas da situação real.

## Anexo I



**Figura 14 - Avaliação da expressão da MT I/II na microglia.** Imagens de microscopia de fluorescência obtida no microscópio confocal, da cultura de microglia incubada previamente com o anticorpo Anti-MT-I/II (verde) e Hoescht (azul).

## Referências bibliográficas

Adachi, T., Satoh, M., Pramanik, R., Kuroda, S., Ishido, M., & Kunimoto, M. (2006). Region-dependent differences and alterations of protective thiol compound levels in cultured astrocytes and brain tissues. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 29(7), p. 1466-1469.

Antonelli, M. C., Guillemin, G. J., Raisman-Vozari, R., Del-Bel, E. a, Aschner, M., Collins, M. a, Tizabi, Y., et al. (2011). New Strategies in Neuroprotection and Neurorepair. *Neurotoxicity research*, p. 9265-9268.

Aschner, M. (1998). Immune and inflammatory responses in the CNS: modulation by astrocytes. *Toxicology letters*, 102-103, p. 283-287.

Asmussen, J. W., Von Sperling, M. L., & Penkowa, M. (2009). Intraneuronal signaling pathways of metallothionein. *Journal of neuroscience research*, 87, p. 2926-2936.

Bolognin, S., Drago, D., Messori, L., & Zatta, P. (2009). ChelationTherapy for Neurodegenerative Diseases. *Medicinal Research Reviews*, 29(4), p. 547-570.

Bolognin, S., Messori, L., & Zatta, P. (2009). Metal ion physiopathology in neurodegenerative disorders. *Neuromolecular medicine*, 11, p. 223-238.

Braak, H., Tredici, K. D., Rüb, U., de Vos, R. a I., Jansen Steur, E. N. H., & Braak, E. (2003). Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiology of Aging*, 24, p. 197-211.

Burke, R E, M Antonelli, and D Sulzer (1998). "Glial cell line-derived neurotrophic growth factor inhibits apoptotic death of postnatal substantia nigra dopamine neurons in primary culture." *Journal of neurochemistry* 71: 517-525.

Chung, R. S., Adlard, P., Dittmann, J., Vickers, J. C., Chuah, M. I., & West, Adrian K. (2003). Neuron-glia communication: metallothionein expression is specifically up-regulated by astrocytes in response to neuronal injury. *Journal of Neurochemistry*, 88(2), p. 454-461.

Chung, R. S., Leung, Y. K., Butler, C. W., Chen, Y., Eaton, E. D., Pankhurst, M. W., West, a K., et al. (2009). Metallothionein treatment attenuates microglial activation and expression of neurotoxic quinolinic acid following traumatic brain injury. *Neurotoxicity research*, 15(4), p. 381-389.

- Chung, R. S., Hidalgo, J, & West, a K. (2008). New insight into the molecular pathways of metallothionein-mediated neuroprotection and regeneration. *Journal of neurochemistry*, 104(1), p. 14-20.
- Chung, R. S., Penkowa, M., Dittmann, J., King, C. E., Bartlett, C., Asmussen, J. W., Hidalgo, Juan, et al. (2008). Redefining the role of metallothionein within the injured brain. *Journal of Biological Chemistry*, 283(22), p. 15349-15358.
- Chung, Roger S., Adlard, P. a, Dittmann, J., Vickers, J. C., Chuah, M. I., & West, A. K. (2003). Neuron-glia communication: metallothionein expression is specifically up-regulated by astrocytes in response to neuronal injury. *Journal of Neurochemistry*, 88(2), p. 454-461.
- Chung, Y., Ko, H., Bok, E., Park, E., & Huh, S. (2010). The role of neuroinflammation on the pathogenesis of Parkinson's disease. *BMB reports*, p. 225-232.
- Colton, C. & Gilbert, D. L. (1987). Production of superoxide anions by a CNS macrophage, the microglia. *FEBS letters*, 223(2), p. 284-288.
- Colton, C., Wilt, S., Gilbert, D., Chernyshev, O., Snell, J., & Dubois-Dalcq, M. (1996). Species differences in the generation of reactive oxygen species by microglia. *Molecular and chemical neuropathology*, 28, p. 15-20.
- Coyle, P., Philcox, J., Carey, L., & Rofe, A. (2002). Metallothionein: the multipurpose protein. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 59(4), p. 627-647.
- Cristóvão, A. C., Saavedra, A., Fonseca, C. P., Campos, F., Duarte, E. P., & Baltazar, G. (2010). Microglia of rat ventral midbrain recovers its resting state over time in vitro: let microglia rest before work. *Journal of neuroscience research*, 88, p. 552-562.
- Dauer, W., & Przedborski, S. (2003). Parkinson ' s Disease : Mechanisms and Models. *Neuron*, 39, p. 889-909.
- Davie, C. A. (2008). A review of Parkinson's disease. *British medical bulletin*, 86, p. 109-127.
- Dong, Y. (2001). Immune function of astrocytes. *Glia*, 36, p. 180 -190.
- Ebadi, M., Brown-Borg, H., El Refaey, H., Singh, B. B., Garrett, S., Shavali, S., & Sharma, S. K. (2005). Metallothionein-mediated neuroprotection in genetically engineered mouse models of Parkinson's disease. *Molecular brain research*, 134(1), p. 67-75.

- Eder, C. (1998). Ion channels in microglia (brain macrophages). *American Physiological Society*, p. C327-C342.
- El Refaey, H., Ebadi, M., Kuszynski, C. a, Sweeney, J., Hamada, F. M., & Hamed, A. (1997). Identification of metallothionein receptors in human astrocytes. *Neuroscience letters*, 231, p. 131-134.
- Floden, a M., & Combs, C. K. (2007). Microglia repetitively isolated from in vitro mixed glial cultures retain their initial phenotype. *Journal of neuroscience methods*, 164, p. 218-224.
- Frank-Cannon, T. C., Alto, L. T., McAlpine, F. E., & Tansey, M. G. (2009). Does neuroinflammation fan the flame in neurodegenerative diseases? *Molecular neurodegeneration*.
- Frank, M. G., Baratta, M. V., Sprunger, D. B., Watkins, L. R., & Maier, S. F. (2007). Microglia serve as a neuroimmune substrate for stress-induced potentiation of CNS pro-inflammatory cytokine responses. *Brain, behavior, and immunity*, 21, p. 47-59.
- Fujita, H., Tanaka, J., Toku, K., Tateishi, N., & Suzuki, Y. (1996). Effects of GM-CSF and ordinary supplements on the ramification of microglia in culture: A morphometrical study. *Glia*, 18, p. 269-281.
- Gao, H. M., Jiang, J., Wilson, Belinda, Zhang, W., Hong, J.S., & Liu, Bin. (2002). Microglial activation-mediated delayed and progressive degeneration of rat nigral dopaminergic neurons: relevance to Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*, 81, p. 1285-1297.
- Gauthier, M. a, Eibl, J. K., Crispo, J. a G., & Ross, G. M. (2008). Covalent arylation of metallothionein by oxidized dopamine products: a possible mechanism for zinc-mediated enhancement of dopaminergic neuron survival. *Neurotoxicity research*, 14(4), p. 317-328.
- Giulian, D., Vaca, K., & Corpuz, M. (1993). Brain glia release factors with opposing actions upon neuronal survival. *The Journal of neuroscience*, 13(1), p. 29-37.
- Glass, C. K., Saijo, K., Winner, B., Marchetto, M. C., & Gage, F. H. (2010). Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell*, 140, p. 918-934.
- Graeber, M. B., & Streit, Wolfgang J. (2010). Microglia: biology and pathology. *Acta neuropathologica*, 119, p. 89-105.
- Hald, A., Beek, J. V. A. N., & Lotharius, J. (2007). INFLAMMATION IN PARKINSON ' S DISEASE Causative or epiphenomenal? *Inflammation in the Pathogenesis of Chronic Diseases*, p. 249-279.

- Hanisch, U. K. (2002). Microglia as a source and target of cytokines. *Glia*, 40, p. 140-155.
- Hansson, E., & Ronnback, L. (2003). Glial neuronal signaling in the central nervous system. *The FASEB journal*, 17, p. 341-348.
- Hozumi, I., Asanuma, M., Yamada, M., & Uchida, Y. (2004). Metallothioneins and Neurodegenerative Diseases. *Journal of Health Science*, 50(4), p. 323-331.
- Inoue, K. Ichiro, Takano, H., Shimada, A., & Satoh, M. (2009). Metallothionein as an anti-inflammatory mediator. *Mediators of inflammation*.
- Jomova, K., Vondrakova, D., Lawson, M., & Valko, M. (2010). Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders. *Molecular and cellular biochemistry*, 345, p. 91-104.
- Kalla, R., Bohatschek, M., Kloss, C. U. A., Krol, J., Von Maltzan, X., & Raivich, G. (2003). Loss of microglial ramification in microglia-astrocyte cocultures: Involvement of adenylate cyclase, calcium, phosphatase, and Gi-protein systems. *Glia*, 41, p. 50-63.
- Kim, S. U., & de Vellis, J. (2005). Microglia in health and disease. *Journal of neuroscience research*, 81, p. 302-313.
- Kim, W. G., Mohny, R. P., Wilson, B, Jeohn, G. H., Liu, B, & Hong, J S. (2000). Regional difference in susceptibility to lipopolysaccharide-induced neurotoxicity in the rat brain: role of microglia. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 20(16), p. 6309-6316.
- Kim, Y. S., & Joh, T. H. (2006). Microglia, major player in the brain inflammation: their roles in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Experimental & molecular medicine*, 38(4), p. 333-347.
- Koehler, R. C., Gebremedhin, D., & Harder, D. R. (2006). Role of astrocytes in cerebrovascular regulation. *Journal of applied physiology*, 100(1), p. 307-317.
- Krishnan Sriram, Joanna M. Matheson, Stanley A. Benkovic, Diane B. Miller, M. I. L. and J. P. O. (2002). Mice deficient in TNF receptors are protected against dopaminergic neurotoxicity: Implications for Parkinson's disease. *The FASEB Journal*, 16(3), p. 390-400.
- Le Cabec, V., Cols, C., & Maridonneau-Parini, I. (2000). Nonopsonic phagocytosis of zymosan and *Mycobacterium kansasii* by CR3 (CD11b/CD18) involves distinct molecular determinants and is or is not coupled with NADPH oxidase activation. *Infection and immunity*, 68(8), p. 4736-4745.

- Lee Mosley, R., Benner, E. J., Kadiu, I., Thomas, M., Boska, M. D., Hasan, K., Laurie, C., et al. (2006). Neuroinflammation, oxidative stress, and the pathogenesis of Parkinson's disease. *Clinical neuroscience research*, 6, p. 261-281.
- Liberto, C. M., Albrecht, P. J., Herx, L. M., Yong, V. W., & Levison, S. W. (2004). Pro-regenerative properties of cytokine-activated astrocytes. *Journal of neurochemistry*, 89(5), p. 1092-1100.
- Lin, T. K., Liou, C. W., Chen, S. D., Chuang, Y. C., Tiao, M. M., Wang, P. W., Chen, J. B., et al. (2009). Mitochondrial dysfunction and biogenesis in the pathogenesis of Parkinson's disease, 32(6), p. 589-599.
- Liu, B., & Hong, J.S. (2003). Role of microglia in inflammation-mediated neurodegenerative diseases: mechanisms and strategies for therapeutic intervention. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 304(1), p. 1-7.
- Long-Smith, C. M., Sullivan, A. M., & Nolan, Y. M. (2009). The influence of microglia on the pathogenesis of Parkinson's disease. *Progress in neurobiology*, 89(3), p. 277-287.
- Maragakis, N. J., & Rothstein, J. D. (2006). Mechanisms of Disease: astrocytes in neurodegenerative disease. *Nature clinical practice. Neurology*, 2(12), p. 679-689.
- Mastroeni, D., Grover, A., Leonard, B., Joyce, J. N., Coleman, P. D., Kozik, B., Bellinger, D. L., et al. (2009). Microglial responses to dopamine in a cell culture model of Parkinson's disease. *Neurobiology of aging*, 30(11), p. 1805-1817.
- Mazzio, E., Close, F., & Soliman, K. F. (2011). The biochemical and cellular basis for nutraceutical strategies to attenuate neurodegeneration in Parkinson's disease. *International journal of molecular sciences*, 12, p. 506-569.
- McGeer, P. L., & McGeer, E. G. (2004). Inflammation and neurodegeneration in Parkinson's disease. *Parkinsonism & related disorders*, 10, p. 3-7.
- McGeer, P. L., & McGeer, E. G. (2008). Glial reactions in Parkinson's disease. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*, 23(4), p. 474-483.
- Min, K. J., Yang, M. Soon, Kim, S. U., Jou, I., & Joe, E. (2006). Astrocytes induce hemeoxygenase-1 expression in microglia: a feasible mechanism for preventing excessive brain inflammation. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 26(6), p. 1880-1887.

- Mirza, B., Hadberg, H., Thomsen, P., & Moos, T. (2000). The absence of reactive astrocytosis is indicative of a unique inflammatory process in Parkinson's disease. *Neuroscience*, 95(2), p. 425-432.
- Molinero, A., Carrasco, J., Hernandez, J., & Hidalgo, J. (1998). Effect of nitric oxide synthesis inhibition on mouse liver and brain metallothionein expression. *Neurochemistry international*, 33, p. 559-566.
- Montgomery, D. L. (1994). Astrocytes: Form, Functions, and Roles in Disease. *Veterinary Pathology*, 31(2), p. 145-167.
- Myer, D. J., Gurkoff, G. G., Lee, S. M., Hovda, D. a, & Sofroniew, M. V. (2006). Essential protective roles of reactive astrocytes in traumatic brain injury. *Brain: a journal of neurology*, 129(10), p. 2761-2772.
- Nakamura, Y, Q S Si, and K Kataoka. 1999. "Lipopolysaccharide-induced microglial activation in culture: temporal profiles of morphological change and release of cytokines and nitric oxide." *Neuroscience research* 35: p. 95-100.
- Nedergaard, M., Ransom, B., & Goldman, S. a. (2003). New roles for astrocytes: Redefining the functional architecture of the brain. *Trends in Neurosciences*, 26(10), p. 523-530.
- Nielsen, A. E., Bohr, A., & Penkowa, M. (2007). The Balance between Life and Death of Cells: Roles of Metallothioneins. *Biomarker insights*, 1, p. 99-111.
- Orr, C., Rowe, D., & Halliday, G. (2002). An inflammatory review of Parkinson's disease. *Progress in neurobiology*, 68(5), p. 325-340.
- Penkowa, M. (2006). Metallothioneins are multipurpose neuroprotectants during brain pathology. *The FEBS journal*, 273(9), p. 1857-1870.
- Penkowa, M. (2006). Metallothionein I+II expression and roles during neuropathology in the CNS. *Danish medical bulletin*, 53(2), p. 105-121.
- Penkowa, M., Giralt, M., & Camats, J. (2002). Metallothionein1+ 2 Protect the CNS During Neuroglial DegenerationInduced by 6-Aminonicotinamide. *The Journal of Comparative Neurology*, 444, p. 174 -189.
- Perry, V. H., Bell, M. D., Brown, H. C., & Matyszak, M. K. (1995). Inflammation in the nervous system. *Current opinion in neurobiology*, 5, p. 636-641.

- Petrova, T. V., Hu, J., & Van Eldik, L. J. (2000). Modulation of glial activation by astrocyte-derived protein S100B: differential responses of astrocyte and microglial cultures. *Brain research*, 853, p. 74-80.
- Qian, L., & Flood, P. M. (2008). Microglial cells and Parkinson's disease. *Immunologic research*, 41, p. 155-164.
- Reynolds, A. D., Banerjee, R., Liu, J., Gendelman, H. E., & Mosley, R. L. (2007). Neuroprotective activities of CD4+CD25+ regulatory T cells in an animal model of Parkinson's disease. *Journal of leukocyte biology*, 82(5), p. 1083-1094.
- Rosenstiel, P., Lucius, R., Deuschl, G., Sievers, J., & Wilms, H. (2001). From theory to therapy: implications from an in vitro model of ramified microglia. *Microscopy research and technique*, 54, p. 18-25.
- Van Rossum, D., & Uwe-Karsten., H. (2004). Microglia. *Metabolic Brain Disease*, 19(3/4), p. 393-411.
- Przedborskia S., and J. E. G. (2004). Pathogenic role of glial cells in Parkinson's disease. *Advances in Molecular and Cell Biology*, 31, p. 967-982.
- Saura, J., Tusell, J. M., & Serratosa, J. (2003). High-yield isolation of murine microglia by mild trypsinization. *Glia*, 44, p. 183-189.
- Schapira, A. H., & Jenner, P. (2011). Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, 26(6), p. 1049-1055.
- Seth, P., & Koul, N. (2008). Astrocyte, the star avatar: redefined. *Journal of biosciences*, 33(3), p. 405-421.
- Stankovic, R. K., Chung, R. S., & Penkowa, M. (2007). Metallothioneins I and II: neuroprotective significance during CNS pathology. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 39(3), p. 484-489.
- Streit, W., Conde, J., Fendrick, S., Flanary, B., & Mariani, C. (2005). Role of microglia in the central nervous system's immune response. *Neurological research*, 27, p. 685-691.
- Streit, W. J., Walter, S. a, & Pennell, N. a. (1999). Reactive microgliosis. *Progress in neurobiology*, 57, p. 563-581.
- Takeuchi, H. (2010). Neurotoxicity by microglia: Mechanisms and potential therapeutic strategy. *Clinical and Experimental Neuroimmunology*, 1, p. 12-21.

- Tambuyzer, B. R., Ponsaerts, P., & Nouwen, E. J. (2009). Microglia: gatekeepers of central nervous system immunology. *Journal of leukocyte biology*, 85, p. 352-370.
- Tanaka, J., Toku, K., Sakanaka, M., & Maeda, N. (1999). Morphological differentiation of microglial cells in culture: involvement of insoluble factors derived from astrocytes. *Neuroscience research*, 34(4), p. 207-215.
- Teismann, P., & Schulz, J. B. (2004). Cellular pathology of Parkinson's disease: astrocytes, microglia and inflammation. *Cell and tissue research*, 318, p. 149-161.
- Vasák, M., & Hasler, D. W. (2000). Metallothioneins: new functional and structural insights. *Current opinion in chemical biology*, 4(2), p. 177-183.
- Vilhardt, F. (2005). Microglia: phagocyte and glia cell. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 37, p. 17-21.
- West, Adrian K, Hidalgo, J., Eddins, D., Levin, Edward D, & Aschner, M. (2008). Metallothionein in the central nervous system: Roles in protection, regeneration and cognition. *Neurotoxicology*, 29, p. 489-503.
- West, A. K., Leung, J. Y. K., & Chung, R. S. (2011). Neuroprotection and regeneration by extracellular metallothionein via lipoprotein-receptor-related proteins. *Journal of biological inorganic chemistry: JBIC: a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry*, 16(7), p. 1115-1122.
- Whitton, P. S. (2007). Inflammation as a causative factor in the aetiology of Parkinson's disease. *British journal of pharmacology*, 150, p. 963-976.
- Williams, W. M., Weinberg, A., & Smith, M. a. (2011). Protein Modification by Dicarbonyl Molecular Species in Neurodegenerative Diseases. *Journal of Amino Acids*, p. 1-9.
- Woodruff, T. M., Thundyil, J., Tang, S. C., Sobey, C. G., Taylor, S. M., & Arumugam, T. V. (2011). Pathophysiology, treatment, and animal and cellular models of human ischemic stroke. *Molecular neurodegeneration*, 6 (11), p. 1-19.
- Wyss-Coray, T., & Mucke, L. (2002). Inflammation in neurodegenerative disease-a double-edged sword. *Neuron*, 35, p. 419-432.
- Yang, M.-soon, Min, K.-jin, & Joe, E. (2007). Mini-Review Multiple Mechanisms That Prevent Excessive Brain Inflammation. *Journal of Neuroscience Research*, 85, p. 2298-2305.

Yu, X., Guo, J., Fang, H., & Peng, S. (2011). Basal metallothionein-I/II protects against NMDA-mediated oxidative injury in cortical neuron/astrocyte cultures. *Toxicology*, 282, p. 16-22.