

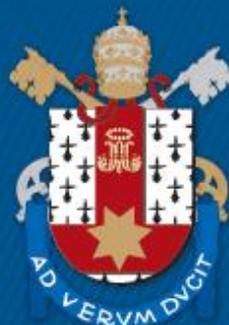
ESCOLA DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GERONTOLOGIA BIOMÉDICA
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ANA PAULA BORNES DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO EXPERIMENTAL *IN VITRO* PARA O ESTUDO DA
EXCITOTOXICIDADE GLUTAMATÉRGICA E DO ESTRESSE OXIDATIVO NA
NEUROMIELITE ÓPTICA**

Porto Alegre
2019

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul

ANA PAULA BORNES DA SILVA

DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO EXPERIMENTAL *IN VITRO* PARA O ESTUDO DA EXCITOTOXICIDADE GLUTAMATÉRGICA E DO ESTRESSE OXIDATIVO NA NEUROMIELITE ÓPTICA

Apresentação de Dissertação como atividade obrigatória para obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Gerontologia Biomédica do Instituto de Geriatria e Gerontologia da PUCRS.

ORIENTADORA: PROFA. DRA. DENISE CANTARELLI MACHADO

CO-ORIENTADOR: PROF. DR. DOUGLAS KAZUTOSHI SATO

Porto Alegre

2019

Ficha Catalográfica

S586d Silva, Ana Paula Bornes da

Desenvolvimento de um modelo experimental in vitro para o estudo da excitotoxicidade glutamatérgica e do estresse oxidativo na neuromielite óptica / Ana Paula Bornes da Silva . – 2019.

110.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Gerontologia Biomédica, PUCRS.

Orientadora: Profa. Dra. Denise Cantarelli Machado.

Co-orientador: Prof. Dr. Douglas Kazutoshi Sato.

1. Doenças desmielinizantes. 2. Aquaporina-4. 3. Excitotoxicidade glutamatérgica. 4. Estresse oxidativo. I. Machado, Denise Cantarelli. II. Sato, Douglas Kazutoshi. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da PUCRS
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Bibliotecária responsável: Salete Maria Sartori CRB-10/1363

AGRADECIMENTOS

Aos Professores Denise Cantarelli Machado e Douglas Kazutoshi Sato agradeço pelas orientações, incentivo, confiança e por me proporcionarem um grande aprendizado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Gerontologia Biomédica da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, por me permitir fazer parte do grupo de alunos e aprender com seus professores. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa integral de estudos.

Ao Professor Diogo Onofre Souza da Universidade Federal do Rio Grande do Sul por abrir as portas de seu laboratório e permitir que uma parcela dos meus experimentos fossem realizados no Departamento de Bioquímica.

Um agradecimento muito especial a Pós-Doutoranda Débora Guerini pelos ensinamentos e ajuda na realização dos experimentos, bem como aos seus alunos de iniciação científica.

Ao Professor Jarbas Rodrigues pela disponibilidade e auxílio em alguns experimentos.

Aos meus colegas de laboratório agradeço pela enorme colaboração e parceria.

Ao meu namorado Rodrigo Nizolli por me apoiar e ser extremamente compreensivo.

E aos meus pais pelo incentivo e suporte.

RESUMO

O distúrbio do espectro da neuromielite óptica (NMOSD) é uma doença inflamatória/autoimune, caracterizada pela produção de autoanticorpos (IgG) contra o canal de água aquaporina-4 (AQP4), uma proteína altamente expressa na membrana celular de astrócitos. A ligação AQP4-IgG induz a abertura da barreira hematoencefálica, provocando astrocitopatia, destruição tecidual e desmielinização em estruturas como os nervos ópticos, medula espinhal, tronco cerebral e córtex. Sabe-se que os astrócitos são células que desempenha papéis importantes no SNC, como regulação da homeostase cerebral e de sinapses glutamatérgicas. Portanto, qualquer dano astrocitário pode comprometer o funcionamento da célula e interferir em processos biológicos, como na captação de glutamato. A regulação dos níveis de glutamato extracelular é realizada pelos transportadores de glutamato presentes em astrócitos. Quando estas células são danificadas, os níveis de glutamato extracelular aumentam, e o neurotransmissor se torna tóxico para as células nervosas, conferindo excitotoxicidade e gerando estresse oxidativo. Por esta razão, acredita-se que além da interação antígeno-anticorpo, a excitotoxicidade e o estresse oxidativo sejam fatores que podem estar relacionados a fisiopatologia da NMOSD. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um modelo experimental *in vitro* de NMOSD, utilizando astrócitos de 36 ratos adultos, a fim de investigar a influência da excitotoxicidade glutamatérgica e do estresse oxidativo na NMOSD. Para tal, os astrócitos foram expostos a amostras de soro AQP4+ e IgG purificada oriundas de pacientes com NMOSD. A caracterização do fenótipo celular foi avaliada pela técnica de imunocitoquímica e os efeitos citotóxicos da exposição do soro AQP4+ e da IgG purificada nas culturas celulares foram avaliados pelo ensaio de viabilidade celular (MTT). A capacidade das células de captar glutamato e a relação do estresse oxidativo também foram avaliadas através dos testes de exposição com L-[2,3-³H] glutamato e DCFHDA. Os dados obtidos mostraram que os autoanticorpos contra a AQP4 são citotóxicos para os astrócitos principalmente para astrócitos expostos ao soro AQP4+ e a IgG purificada em altas concentrações, prejudicando o transporte glutamatérgico e induzindo a produção de oxidantes intracelulares. Neste trabalho, concluímos que os

autoanticorpos são deletérios para astrócitos e capazes de induzir citotoxicidade. Além disso, prejudicam a captação de glutamato astrocitária e gera estresse oxidativo. Logo, pode-se inferir que estes fatores podem estar associados ao desenvolvimento de lesões no SNC observadas em pacientes com NMOSD.

Palavras-chave: Doenças desmielinizantes; Aquaporina-4; Excitotoxicidade glutamatérgica; Estresse oxidativo.

ABSTRACT

Neuromyelitis optical spectrum disorders (NMOSD) is an inflammatory/autoimmune disease, characterized by the production of autoantibodies (IgG) against the aquaporin-4 water channel (AQP4), a protein highly expressed in the astrocyte cell membrane. The AQP4-IgG binding induces the opening of the blood-brain barrier, causing astrocytopathy, tissue destruction and demyelination in structures such as the optic nerves, spinal cord, brainstem and cortex. It is known that astrocytes are cells that play important roles in the CNS, such as regulation of cerebral homeostasis and glutamatergic synapses. Therefore, any astrocytic damage can compromise the cell function and interfere in biological processes, such as glutamate uptake. Regulation of extracellular glutamate levels is performed by glutamate transporters present in astrocytes. When these cells are damaged, extracellular glutamate levels increase, and the neurotransmitter becomes toxic to nerve cells, conferring excitotoxicity and generating oxidative stress. For this reason, it is believed in addition to antigen-antibody interaction, excitotoxicity and oxidative stress are factors that may be related to the physiopathology of NMOSD. The objective of this work was to develop *in vitro* experimental model of NMOSD, using astrocytes from 36 adult rats, to investigate the influence of glutamatergic excitotoxicity and oxidative stress on NMOSD. For this, astrocytes were exposed to serum AQP4+ and purified IgG from patients with NMOSD. Characterization of the cellular phenotype was evaluated by the immunocytochemistry technique, and the cytotoxic effects of the exposure of serum AQP4+ and purified IgG in the cell culture were evaluated by the cell viability assay (MTT). The ability of cells to capture glutamate and the relation of oxidative stress were also evaluated through exposure tests with L-[2,3-³H] glutamate and DCFHDA. The data obtained showed that autoantibodies against AQP4 are cytotoxic to astrocytes mainly for astrocytes exposed to serum AQP4+ and purified IgG in high concentrations, impairing glutamatergic transport and inducing the production of intracellular oxidants. In this work, we conclude that autoantibodies are deleterious to astrocytes and capable of inducing cytotoxicity. In addition, impair in the astrocytic glutamate uptake and generate oxidative stress. Therefore, it can be inferred that these factors may

be associated with the development of CNS lesions observed in patients with NMOSD.

Keywords: Demyelinating diseases; Aquaporin-4; Glutamatergic excitotoxicity; Oxidative stress.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Organização celular do Sistema Nervoso Central.....	18
Figura 2 – Lesões características do Distúrbio do Espectro da Neuromielite Óptica.....	23
Figura 3 – Mecanismos celulares do Distúrbio do Espectro da Neuromielite Óptica.....	25
Figura 4 – Distribuição de aquaporinas no cérebro.....	32
Figura 5 – Metabolismo do glutamato cerebral.....	35
Figura 6 – Fotomicrografias de células HEK-293T marcadas por imunofluorescência evidenciando a ligação antígeno-anticorpo.....	49
Figura 7 – Fotomicrografias da caracterização astrocitária de ratos adultos por imunocitoquímica.....	51
Figura 8 – Imagens capturadas comparando alterações morfológicas nos astrócitos tratados com soro AQP4+ e IgG purificada em relação ao grupo controle.....	53
Figura 9 – Histograma representando o percentual de viabilidade celular de astrócitos de ratos adultos tratados com soro AQP4+ e IgG purificada.....	55
Figura 10 – Histograma representando os níveis de captação de glutamato em astrócitos de ratos adultos tratados com soro AQP4+ e IgG purificada.....	57
Figura 11 – Cultivo celular mostrando um aglomerado de células derivadas de astrócitos de ratos adultos, causado pelo descolamento da malha celular.....	58
Figura 12 – Histograma representando a porcentagem de EROs produzidos por astrócitos de ratos adultos tratados com soro AQP4+ e IgG purificada.....	59

Figura 13 – Histograma representando os níveis de peroxidação lipídica em astrócitos de rator adultos tratados com soro AQP4+.....60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características clínicas básicas do Distúrbio do Espectro da Neuromielite Óptica.....	27
Tabela 2 – Classificação das formas clínicas do Distúrbio do Espectro da Neuromielite Óptica.....	28
Tabela 3 – Definição dos critérios diagnósticos para o Distúrbio do Espectro da Neuromielite Óptica conforme estabelecido em 2015.....	29

LISTA DE ABREVIATURAS

ADCC – Citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpo (do inglês *Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*)

ADEM – Encefalomielite Disseminada Aguda (do inglês *Acute Disseminated Encephalomyelitis*)

AQPs – Aquaporinas (do inglês *Aquaporins*)

AQP1 – Aquaporina-1 (do inglês *Aquaporin-1*)

AQP3 – Aquaporina-3 (do inglês *Aquaporin-3*)

AQP4 – Aquaporina-4 (do inglês *Aquaporin-4*)

AQP7 – Aquaporina-7 (do inglês *Aquaporin-7*)

AQP9 – Aquaporina-9 (do inglês *Aquaporin-9*)

ATM – Mielite Transversa Aguda (do inglês *Acute Transverse Myelitis*)

CBA – Ensaio baseado em células (do inglês *Cell-based Assay*)

CDC – Citotoxicidade dependente de complemento (do inglês *Complement-dependent cytotoxicity*)

DCFHDA – 2',7'- Diacetato de diclorofluoresceína (do inglês 2',7'-*Dichlorofluorescin diacetate*)

DCFH – Diclorofluoresceína (do inglês *Dichlorofluorescin*)

DCF – Diclorofluoresceína Fluorescente (do inglês *Dichlorofluorescin Fluorescent*)

DAPI – Marcador de material genético (do inglês *4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride*)

DMEM – Meio de cultura de células (do inglês *Dulbecco's Modified Eagle Medium*)

DMEM/F12 – Meio de cultura de células (do inglês *Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12*)

DMSO – Dimetilsulfóxido (do inglês *Dimethyl sulfoxide*)

EAAT – Transportador de Aminóciados Excitatórios (do inglês *Excitatory Amino Acid Transporter*)

EAAT1 – Transportador de Aminóciados Excitatórios-1 (do inglês *Excitatory Amino Acid Transporter-1*)

EAAT2 – Transportador de Aminóciados Excitatórios-2 (do inglês *Excitatory Amino Acid Transporter-2*)

EAAT3 – Transportador de Aminóciados Excitatórios-3 (do inglês *Excitatory Amino Acid Transporter-3*)

EM – Esclerose Múltipla

EROs – Espécies Reativas de Oxigênio

G-CSF – Fator estimulador de colônias de granulócitos (do inglês *Granulocyte-colony stimulating factor*)

GFAP – Proteína Acídica Fibrilar Glial (do inglês *Glial Fibrillary Acidic Protein*)

GLT-1 – Transportador de Glutamato-1 (do inglês *Glutamate Transporter-1*)

HBSS – Solução Salina Equilibrada de Hanks (do inglês *Hanks' Balanced Salt solution*)

HEK-293T – Células de rim embrionário humano linhagem 293T (do inglês *Human Embryonic Kidney 293T cells*)

IgG – Imunoglobulina G (do inglês *Immunoglobulin G*)

iGluRs – Receptores Ionotrópicos de Glutamato (do inglês *Ionotropic Glutamate Receptors*)

MDA – Malondialdeído (do inglês *Malondialdehyde*)

MT – Mielite Transversa

MTT – Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolium (do inglês 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)

NMO – Neuromielite Óptica (do inglês *Neuromyelitis Optica*)

NMOSD – Transtorno do Espectro da Neuromielite Óptica (do inglês *Neuromyelitis Optica Spectrum Disorder*)

NO – Neurite Óptica

PBS – Tampão Fosfato-salino (do inglês *Phosphate-buffered saline*)

PFA - Paraformaldeído

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio (do inglês *Sodium Dodecyl Sulfate*)

SFB – Soro Fetal Bovino

SNC – Sistema Nervoso Central

SNP – Sistema Nervoso Periférico

TBARS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (do inglês *Thiobarbituric acid reactive substances*)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1 SISTEMA NERVOSO CENTRAL	18
2.2 GLIA	19
2.2.1 Astrócitos	20
2.3 DOENÇAS IMUNO-MEDIADAS DO SNC	21
2.4 DISTÚRBO DO ESPECTRO DA NEUROMIELITE ÓPTICA.....	22
2.4.1 Características Patológicas	22
2.4.2 Epidemiologia	23
2.4.3 Fisiopatologia.....	24
2.4.4 Apresentação Clínica.....	26
2.4.5 Diagnóstico	28
2.4.6 Tratamento	29
2.5 AQUAPORINAS	31
2.6 EXCITOTOXICIDADE GLUTAMATÉRGICA	34
2.7 ESTRESSE OXIDATIVO E ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROs).....	36
2.8 MODELO EXPERIMENTAL <i>IN VITRO</i>	38
3 OBJETIVOS	40
3.1 OBJETIVO GERAL	40
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
4 METODOLOGIA	41
4.1 ASPECTOS ÉTICOS.....	41
4.2 ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	41
4.3 PROCESSAMENTO DO SORO AQP4+ E PURIFICAÇÃO DAS IgGs PLASMÁTICAS HUMANAS	41
4.4 ENSAIO DE AFINIDADE DAS IgGs PURIFICADAS EM CULTURAS DE HEK-293T TRANSFECTADAS	43
4.5 ISOLAMENTO E CULTIVO DE ASTRÓCITOS DE RATOS ADULTOS.....	44
4.6 CARACTERIZAÇÃO DOS ASTRÓCITOS POR IMUNOCITOQUÍMICA	45
4.7 DESENVOLVIMENTO DO MODELO <i>IN VITRO</i> DE NMOSD EM ASTRÓCITOS ADULTOS	46
4.8 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE CELULAR EM ASTRÓCITOS EXPOSTOS AO SORO AQP4+ E IgG PURIFICADA	46

4.9 AVALIAÇÃO DA EXCITOTOXICIDADE GLUTAMATÉRGICA EM ASTRÓCITOS EXPOSTOS AO SORO AQP4+ E IgG PURIFICADA	46
4.10 AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO EM ASTRÓCITOS TRATADOS COM SORO AQP4+ E IgG PURIFICADA	47
4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA	48
5 RESULTADOS.....	49
5.1 DADOS DAS AMOSTRAS DE SORO AQP4+ E IgG PURIFICADA	49
5.2 AFINIDADE DAS IgGs PURIFICADAS PELO ANTÍGENO AQP4.....	49
5.3 CARACTERIZAÇÃO DAS CULTURAS DE ASTRÓCITOS DE RATOS ADULTOS	50
5.4 ALTERAÇÕES NA MORFOLOGIA ASTROCÍTICA NA PRESENÇA DE SORO AQP4+ E IgG PURIFICADA	53
5.5 VIABILIDADE CELULAR DE ASTRÓCITOS EXPOSTOS AO SORO AQP4+ E IgG PURIFICADA	54
5.6 NÍVEIS DE ABSORÇÃO DE GLUTAMATO DE ASTRÓCITOS NA PRESENÇA DE SORO AQP4+ E IgG PURIFICADA.....	56
5.7 PRODUÇÃO DE EROs POR ASTRÓCITOS EXPOSTOS AO SORO AQP4+ E IgG PURIFICADA.....	58
6 DISCUSSÃO	61
7 CONCLUSÕES	75
8 PERSPECTIVAS.....	77
10 APÊNDICES	84
10.1 APÊNDICE A – Cronograma	84
ANEXOS	85
ANEXO 1 – APROVAÇÃO PELA COMISSÃO CIENTÍFICA DO INSTITUTO DE GERIATRIA E GERONTOLOGIA.....	85
ANEXO 2 – APROVAÇÃO PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	86
ANEXO 3 – ARTIGO CIENTÍFICO SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO EM REVISTA INDEXADA.....	87
ANEXO 4 – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO.....	108
ANEXO 5 – COMPROVANTE DE ACEITE DO ARTIGO.....	109
ANEXO 6 – COMPROVANTE DE PUBLICAÇÃO DO ARTIGO.....	110

1 INTRODUÇÃO

O processo de envelhecimento é caracterizado pelo acúmulo de alterações biológicas, tanto morfológicas quanto fisiológicas, que levam as células a perda progressiva de suas funções e conseqüentemente a de tecidos, órgãos e sistemas até a morte do indivíduo (TORRES et al., 2011; FOUGÈRE et al., 2017; AKHA, 2018). Todos os sistemas de um organismo são afetados pelo envelhecimento, incluindo o sistema imunológico. O sistema imune (inato/adaptativo) sofre uma remodelação e reestruturação conforme envelhecemos, tanto a nível celular quanto sistêmico (TORRES et al., 2011; SIMON et al., 2015; FOUGÈRE et al., 2017; VENTURA et al., 2017; AKHA, 2018). Este processo é chamado de imunossenescência e é caracterizado por três eventos: 1) redução da resposta imune; 2) aumento de inflamação e 3) produção de autoanticorpos (WATAD et al., 2017). Assim, o sistema imune reduz gradativamente a imunidade protetora, tornando os idosos mais suscetíveis a desenvolver infecções virais e bacterianas, cânceres, doenças neurodegenerativas associadas à inflamação e doenças autoimunes (CASTELO-BRANCO; SOVERAL, 2014; WEYAND; GORONZY, 2016).

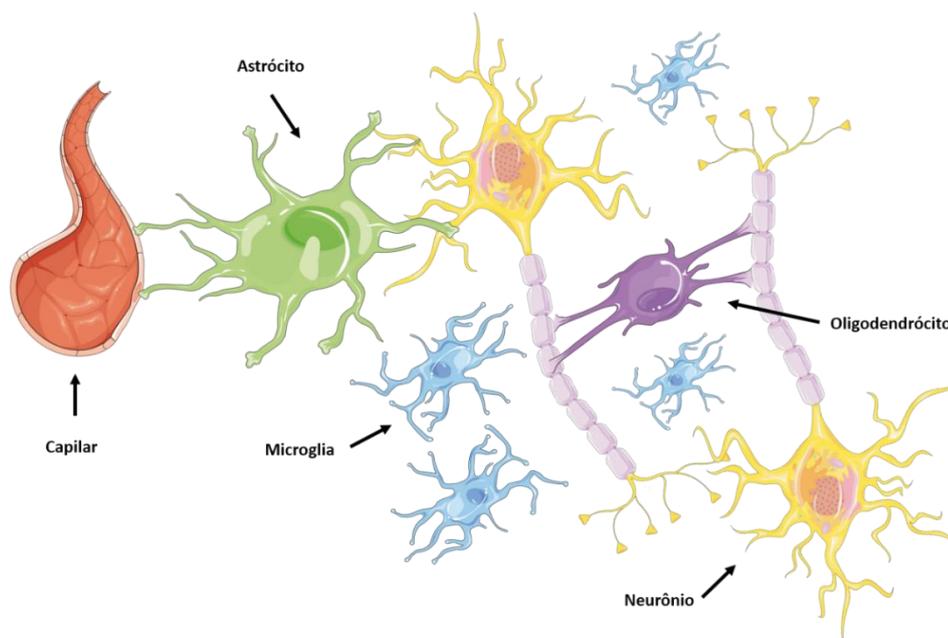
Sabe-se que a população idosa apresenta uma alta incidência e prevalência de doenças autoimunes. Mesmo o organismo envelhecido apresentar declínio nas respostas imunes, ele consegue produzir mais autoanticorpos do que organismos jovens (MINATO, 2015; WEYAND; GORONZY, 2016). Esta incidência é influenciada por fatores ambientais e genéticos que alteram o epigênoma do organismo, impulsionando-o a desenvolver autoimunidade e contribuindo para um aumento da morbidade e mortalidade em idosos (RAY; YUNG, 2018). Visto que a patologia a ser abordada neste estudo tem caráter autoimune/inflamatório com descrição de casos na população idosa, é importante identificar e compreender os mecanismos celulares, moleculares e bioquímicos da doença, visando contribuir para o desenvolvimento de estratégias que modulem este distúrbio, promovendo uma melhor qualidade de vida e longevidade para a população idosa.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 SISTEMA NERVOSO CENTRAL

O tecido nervoso é distribuído por todo o organismo estabelecendo uma interligação, de modo a formar uma grande rede de comunicação, que constitui o sistema nervoso (KANDEL et al., 2014, p. 63). Este é dividido em dois grupos: sistema nervoso central (SNC) e periférico (SNP). Neste trabalho vamos abordar apenas o que diz respeito ao SNC. Este é formado pelo encéfalo, constituído do sistema sensorial e a medula espinhal (KANDEL et al., 2014, p. 63; BARTON et al., 2017) e apresenta dois tipos celulares principais: os neurônios e as células da glia ou neuroglia (Figura 1), presentes tanto na substância cinzenta quanto na substância branca do SNC (KANDEL et al., 2014, p. 63). Os neurônios são células que identificam as modificações que ocorrem no ambiente, passando esta informação para as demais células nervosas, além de comandar as respostas corporais a essas ações. As células da glia, por sua vez, isolam, sustentam e nutrem os neurônios vizinhos. Além de contribuir significativamente nos processos de informação no encéfalo (BEAR; CONNORS; PARADISO, 2008, p. 24).

Figura 1 – Organização celular do Sistema Nervoso Central.



Fonte: O autor (As figuras celulares foram retiradas de <https://smart.servier.com/>).

2.2 GLIA

As células gliais do SNC de mamíferos compreendem células como: astrócitos, oligodendrócitos e microglia, e são as células mais abundantes do SNC. A palavra glia é derivada do grego e significa “cola”, reflete a visão do século XIX de Rudolph Virchow de que essas células tinham função de manter o sistema nervoso em conjunto, como células de apoio (DOMINGUES et al., 2016). Entretanto, com o passar dos anos, observou-se que as células gliais desempenham outras funções importantes no SNC, contribuindo de forma crucial para a formação, operação e adaptação de circuitos neurais (ALLEN; BARRES, 2009).

A microglia nada mais são do que células imunes inatas do SNC, as quais são ontogeneticamente diferentes de outros macrófagos teciduais, tendo longevidade e capacidade de auto-renovação. Os oligodendrócitos, são células responsáveis pela mielinização do SNC, formando a bainha de mielina que envolve os axônios e permite a condução rápida de potenciais de ação, também fornecem suporte metabólico axonal e contribuem para a neuroplasticidade (DOMINGUES et al., 2016). Por fim, os astrócitos são o tipo de célula glial mais abundante do SNC. Essas células preenchem os espaços entre os neurônios, regulam a homeostase da barreira hematoencefálica, fornecem suporte estrutural e metabólico para outras células nervosas, bem como mantêm a homeostase iônica. Além disso, são células que influenciam diretamente a formação de sinapses e assim estão sendo classificados como atores vitais na regulação da plasticidade sináptica (DOMINGUES et al., 2016; HUBBARD et al., 2017).

Como as células gliais são muito numerosas no SNC, se tornam alvos de várias patologias. Os aspectos básicos da fisiologia e fisiopatologia das células gliais não estão completamente compreendidos em relação ao papel desempenhado por elas na saúde e na doença, porém cada vez mais surgem evidências de que a interação glia-glia tem papéis importantes na função cerebral durante o desenvolvimento normal e doença (DOMINGUES et al., 2016).

2.2.1 Astrócitos

Os astrócitos são células altamente ativas nos processos de sinalização do SNC e essenciais para a manutenção da homeostase cerebral. No cérebro existem diferentes tipos de astrócitos, cada qual com sua especialização. A astroglia interlaminar está presente na primeira camada cortical. São células que apresentam corpos celulares pequenos e arredondados, com ramificações curtas, responsáveis por promover a comunicação e coordenação intracortical de longa distância (OBERHEIM et al., 2009; VASILE et al., 2017).

Os astrócitos protoplasmáticos são o tipo de astrócitos mais abundantes no cérebro humano. Estas células estão localizadas na segunda e sexta camada do córtex, apresentam uma morfologia fusiforme com prolongamentos longos e muito ramificados. Os astrócitos protoplasmáticos são as células que modulam a comunicação interneural e participam ativamente das sinapses (OBERHEIM et al., 2009; VASILE et al., 2017).

Nas camadas mais profundas da substância branca cortical são encontrados os astrócitos fibrosos, estas células são maiores que os astrócitos protoplasmáticos e apresentam prolongamentos menos ramificados. Estes são os astrócitos que fornecem suporte estrutural e metabólico para neurônios (OBERHEIM et al., 2009; VASILE et al., 2017).

Os astrócitos são células que possuem papéis que vão além de dar suporte para outras células nervosas. Nos últimos anos, ficou claro que estas células participam de diversos processos fisiológicos e metabólicos no cérebro como a formação e maturação de sinapses, controle do tráfico de receptores, controle da homeostase de íons, água e metabólitos, regulação do fluxo sanguíneo, depuração de neurotransmissores, regulação do volume do espaço extracelular e modulação da sinaptogênese e da plasticidade sináptica. Além de contribuir para o processamento de informação e formação de memória no cérebro (CRAWFORD et al., 2012; FANG et al., 2012; IACOVETTA et al., 2012; VASILE et al., 2017; DOSSI et al., 2018).

Dentre os papéis desempenhados pelos astrócitos, a participação nas sinapses regulando a difusão de neurotransmissores é uma das mais importantes no SNC. Estas células apresentam em suas membranas proteínas

especializadas que removem ativamente os neurotransmissores da fenda, principalmente nas sinapses glutamatérgicas, controlando os níveis de glutamato no espaço extracelular. Além disso, também controlam as concentrações extracelulares de outras substâncias que tenham potencial para interferir nas funções neuronais normais (BEAR; CONNORS; PARADISO, 2008, p. 46).

Os astrócitos estão frequentemente associados à patogênese de doenças que acometem o SNC. Estudos com tecidos humanos post-mortem, ressecados cirurgicamente e de modelos animais, de patologias do SNC, indicam que disfunções astrogliais implicam na patogênese de alguns distúrbios neurológicos (DOSSI et al., 2018). Por serem mais numerosos que os neurônios no cérebro de mamíferos e por desempenharem funções importantes no SNC, estas células podem ser alvo de diferentes patologias, dentre elas, doenças imunitárias associadas a respostas inflamatórias que envolvem o SNC (DOMINGUES et al., 2016).

2.3 DOENÇAS IMUNO-MEDIADAS DO SNC

As doenças inflamatórias de caráter desmielinizante do SNC são um grupo de distúrbios imuno-mediados que ocorrem em resposta a uma inflamação aguda ou crônica, danificando a mielina que envolve as fibras nervosas (HÖFTBERGER; LASSMANN, 2018). Isto ocorre por meio de respostas imunitárias celulares e/ou humorais dirigidas contra antígenos gliais. Estas patologias incluem a esclerose múltipla (EM), transtorno do espectro da neuromielite óptica (NMOSD), encefalomielite disseminada aguda (ADEM), neurite óptica (NO) e mielite transversa aguda (ATM) (CASSERLY et al., 2017; ZHOU et al., 2017). Apesar de estas doenças compartilharem características clínicas, radiológicas e histopatológicas comuns, elas envolvem diferentes processos imunológicos e padrões de lesões diferentes (CASSERLY et al., 2017).

2.4 DISTÚRBO DO ESPECTRO DA NEUROMIELITE ÓPTICA

O distúrbio do espectro da neuromielite óptica (NMOSD), que inclui a neuromielite óptica (NMO), é um grupo de transtornos de caráter inflamatório e autoimune que acomete o SNC atingindo os nervos ópticos e a medula espinhal, comprometendo significativamente a atividade motora e visual dos portadores (BRADL et al., 2009; ASAVAPANUMAS et al., 2014; BRUSCOLINI et al., 2018). As lesões da NMOSD ocasionam necrose com perda de axônios e astrócitos, lesão tecidual e desmielinização, levando a perda de aquaporinas (AQP4 e AQP1) e reatividade da proteína acídica fibrilar glia (GFAP). Nos estágios iniciais da formação das lesões há infiltração por granulócitos, posteriormente por macrófagos e linfócitos, deposição de IgG e complemento ativado no local lesionado (HÖFTBERGER; LASSMANN, 2018).

2.4.1 Características Patológicas

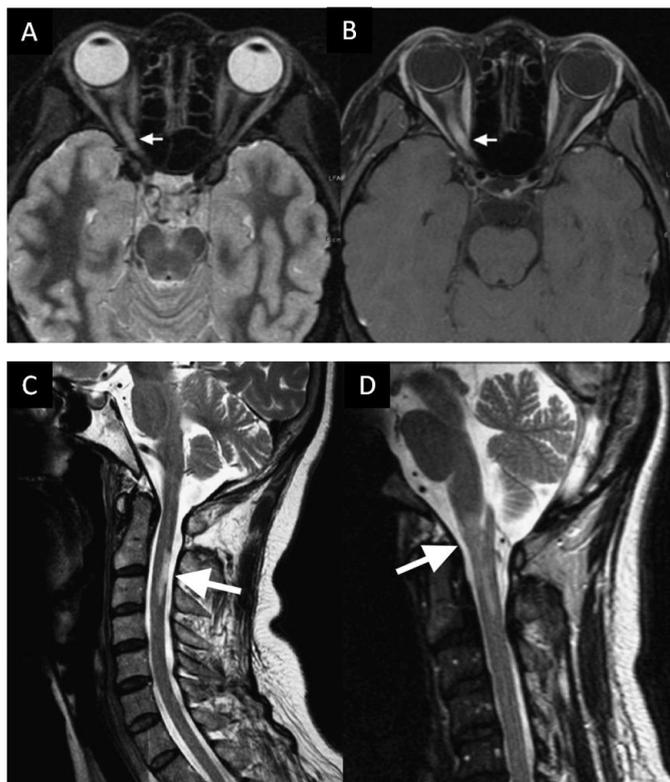
A NMOSD é caracterizada pela presença de lesões em regiões específicas nos nervos ópticos e na medula espinhal (Figura 2) e em menor grau no cérebro. A neurite óptica (NO) é um processo inflamatório dos nervos ópticos, caracterizada por uma redução aguda na acuidade visual por um tempo variável entre horas a dias, com ofuscamento de cor especialmente o vermelho, e acompanhada de dor quando há movimento ocular (LUDWIG et al., 2017).

A manifestação de NO pode ser unilateral ou até mesmo bilateral e seria a primeira manifestação clínica da doença. Apesar de a manifestação unilateral ser a mais comum nos pacientes com NMOSD, a forma bilateral é a primeira manifestação em 20% dos pacientes. A mielite transversa (MT) é uma inflamação da medula espinhal que acomete o sistema sensorial, motor e anatômico marcado por dor na região dorsal podendo causar paraplegia (LUDWIG et al., 2017; BAGHBANIAN et al., 2018). Quando atinge outras regiões cerebrais como o tronco cerebral, os pacientes podem manifestar vômitos e soluços intratáveis (LUDWIG et al., 2017).

Por muito tempo a NMOSD foi considerada uma variante da EM, porém esta doença apresenta características distintivas próprias, sendo as principais:

a resposta de autoanticorpos com alta sensibilidade e especificidade para o diagnóstico da doença, bem como o curso da doença clínica e as respostas ao tratamento (BRADL et al., 2009; JARIUS et al., 2014).

Figura 2 – Lesões características do Distúrbio do Espectro da Neuromielite Óptica. A- Lesão edematosa axial, de alta intensidade no nervo óptico direito; B- Com aumento de contraste; C- Lesões curtas de mielite; D- Lesões de tronco encefálico.



Fonte: Retirado de Sato, D. K. (2013, p. 2212).

2.4.2 Epidemiologia

A NMOSD tem um predomínio na população de aproximadamente 1-10 para cada 100.000 indivíduos. É mais recorrente em mulheres, porém casos masculinos já foram descritos (proporção de 8:1) (LUDWIG et al., 2017; PATTERSON; GOGLIN, 2017). As primeiras manifestações iniciam por volta dos 35-45 anos de idade, embora 18% dos casos ocorram em crianças e idosos (JARIUS et al., 2014; ZEKERIDOU; LENNON, 2015; DAVOUDI et al., 2016). A ocorrência na população feminina sugere que os hormônios sexuais influenciam na susceptibilidade e atividade da NMOSD (PEREIRA et al., 2015; DAVOUDI et al., 2016). Embora a maioria dos casos se pronuncie de forma esporádica, há relatos de NMOSD familiar AQP4-IgG soropositivos com

fenótipo clássico. Por isso, acredita-se que esses indivíduos tenham um componente genético que os torne suscetíveis para o desenvolvimento da doença (JARIUS et al., 2014; ZEKERIDOU; LENNON, 2015).

Os casos de NMOSD são encontrados em maior número na América Latina. Na América do Sul a NMOSD representa 11,8% das doenças idiopáticas inflamatórias, sendo a mais frequente entre as mulheres não brancas. No Brasil há uma baixa frequência de NMOSD na região sul (5,1%), devido o histórico de colonização alemã e italiana, porém na região norte do país a incidência de casos é maior (ALVARENGA et al., 2017). A miscigenação racial é a principal característica da população da América Latina, desencadeada pela interação sexual de europeus com escravos africanos e índios. Aproximadamente 54% da população brasileira é constituída de indivíduos mulatos ou negros. Por isso, existe um aumento da frequência de NMOSD nos estados mais ao norte do que ao sul, principalmente por causa da imigração. Ainda não é compreendido os fatores que propiciam os negros terem mais susceptibilidade de desenvolver NMOSD, porém em países que a população é na maioria negra ou tenha miscigenação, a NMOSD é mais frequente (ALVARENGA et al., 2017).

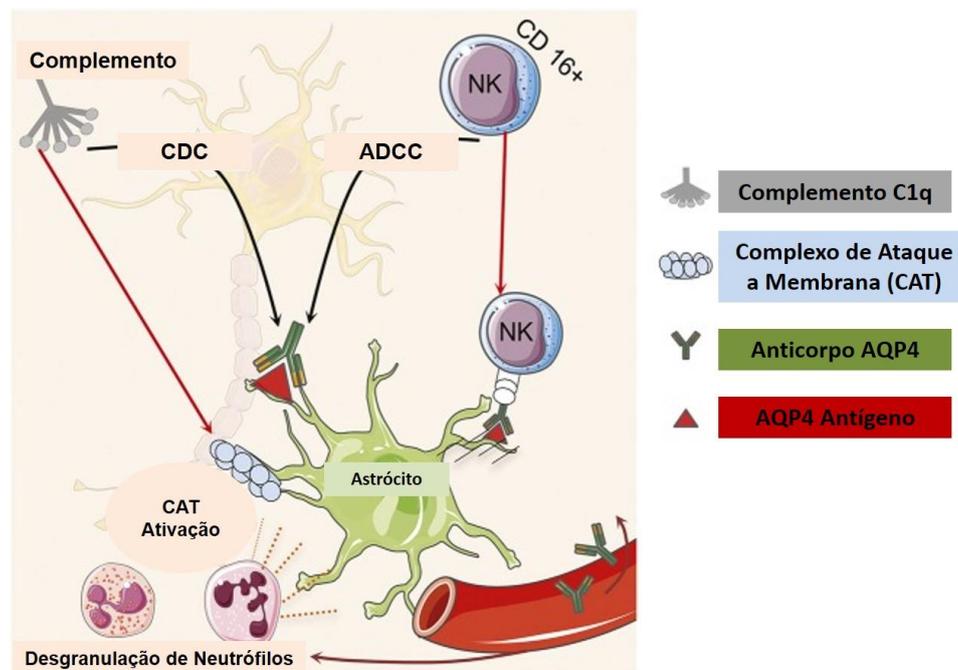
2.4.3 Fisiopatologia

A descoberta dos autoanticorpos IgG circulantes (imunoglobulinas IgG1) presente nos pacientes com NMOSD permitiu desassociar a doença da EM. Os autoanticorpos IgG que atacam a AQP4, um canal de água expresso na membrana plasmática de astrócitos em todo o SNC, são encontrados no soro da maioria dos pacientes com NMOSD (ASAVAPANUMAS et al., 2014; LUDWIG et al., 2017). A presença destes anticorpos no soro do paciente serve como biomarcador diagnóstico da doença, permitindo definir o espectro clínico da NMOSD, bem como o tratamento (BRADL et al., 2009).

Os anticorpos IgG ligam-se a AQP4 que está localizada prolongamentos astocitáros próximo aos capilares sanguíneos, esta ligação ativa o sistema complemento resultando no ataque a membrana. As citocinas como, por exemplo, a interleucina IL-17, IL-8 e o fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF) disparam um sinal para o recrutamento de neutrófilos e

eosinófilos para os espaços perivasculares. A liberação dos grânulos destas células nos espaços perivasculares promove a morte de astrócitos, causam lesões teciduais, levam a perda de expressão de AQP4 e GFAP, causam o recrutamento de macrófagos, a deposição vasculocêntrica de complemento ativado, secundariamente a morte de oligodendrócitos e por fim a degeneração axonal e desmielinização (ASAVAPANUMAS et al., 2014; PEREIRA et al., 2015; WEIL et al., 2016; GUO et al., 2017; KAWACHI; LASSMANN, 2017). O mecanismo de ação da doença está resumido na figura 3 (DAVOUDI et al., 2016).

Figura 3 – Mecanismos celulares do Distúrbio do Espectro da Neuromielite Óptica.



A NMOSD tem início com a entrada de IgG na barreira hematoencefálica e ligação na AQP4 dos astrócitos, ativa o sistema complemento resultando no complexo de ataque a membrana (MAC) e posterior lesão astrocitária pela desgranulação de neutrófilos e eosinófilos. A depleção dos astrócitos leva a um dano secundário aos oligodendrócitos e neurônios. O complexo anticorpo-antígeno leva à citotoxicidade dependente de complemento (CDC) na presença de sistema complemento ou a citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpo (ADCC) usando células citotóxicas natural killer. Fonte: Adaptado de Davoudi, V. (2016, p. 02).

Estudos com modelos de roedores, em que se transfere a IgG específica de forma passiva, mostram que a ligação de IgG na AQP4 dá início a citotoxicidade dependente de complemento (CDC) e dependente de anticorpos

(ADCC), além de causar dano astrocitário, inflamação e permeabilidade da barreira hematoencefálica levando a posterior desmielinização. Trabalhos que avaliam o fluido cefalorraquidiano mostraram que há uma elevação de GFAP circulante, importante componente estrutural astrocitário. Quando este é identificado no líquido cefalorraquidiano indica a ocorrência de uma lise massiva de astrócitos, considerada a chave da patologia (KUROSAWA et al., 2015; LUDWIG et al., 2017; PATTERSON; GOGLIN, 2017).

2.4.4 Apresentação Clínica

As características clínicas da NMOSD incluem ataques recorrentes de mielite transversa e/ou de neurite óptica uni ou bilateral. Os sintomas diferem em indivíduos jovens e adultos. Na infância é principalmente neurite óptica, enquanto que em pacientes idosos a mielite prevalece, sugerindo que a idade de início está associada à localização da lesão. Além do nervo óptico e da medula espinhal, há relatos de lesões localizadas em áreas circumventriculares ou periaquedutais, como a área postrema e hipotálamo, uma vez que a expressão de AQP4 é enriquecida nestes locais (KUROSAWA et al., 2015).

As lesões da medula espinhal em NMOSD são caracterizadas pela presença de danos longitudinalmente extensos com comprometimento do tecido. A mielite transversa é um sintoma inflamatório caracterizado pela disfunção da medula no que diz respeito à sensibilidade, pode causar diversas condições inflamatórias e desmielinizantes subjacentes. No quadro de NMOSD a mielite compromete significativamente o paciente podendo causar perda parcial das funções motoras dos membros inferiores e/ou superiores, paralisia cerebral (quadriparesia), disfunção da bexiga e perda sensorial caudal ao nível da lesão medular. As lesões geralmente se estendem por três ou mais segmentos da medula, compreendendo o cordão cervical ou torácico (PATTERSON; GOGLIN, 2017).

As lesões de via visual são extensas e graves, caracterizadas por uma inflamação exacerbada do nervo óptico. Esta inflamação pode causar a perda de visão e dor ocular quando há movimentação. As lesões são extensas expandindo-se mais da metade da distância da órbita ao quiasma óptico (PATTERSON; GOGLIN, 2017; LUDWIG et al., 2017). As lesões de tronco

cerebral, quando ocorrem, causam soluções intratáveis e/ou náusea e vômito, caracterizando a síndrome da área postrema. Além desses sintomas outros podem surgir, como: perda auditiva, paralisia facial, vertigem, ataxia vestibular e neuralgia do trigêmeo (ZEKERIDOU; LENNON, 2015; KAWACHI; LASSMANN, 2017; PATTERSON; GOGLIN, 2017). Além disso, lesões no cerebelo e lesões corticais são frequentemente observadas em pacientes com NMOSD (KAWACHI; LASSMANN, 2017). As principais características clínicas estão resumidas na tabela 1 (BAGHBANIAN et al., 2018).

Tabela 1 – Características clínicas básicas do Distúrbio do Espectro da Neuromielite Óptica.

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE NMOSD*

- | |
|--|
| 1. Neurite Óptica |
| 2. Mielite Aguda |
| 3. Síndrome da área postrema |
| 4. Síndrome do tronco encefálico agudo |
| 5. Narcolepsia sintomática ou síndrome clínica diencefálica aguda |
| 6. Síndrome sintomática cerebral com lesões cerebrais típicas de NMOSD |

*NMOSD: Distúrbio do Espectro da Neuromielite Óptica.

Fonte: Adaptado de Baghbanian, S. M. (2018, p. 2).

A NMOSD pode seguir um curso monofásico ou recorrente, sendo que 80%-90% dos pacientes tem a forma recorrente. Eugène Devic e Fernand Gault caracterizaram a NMOSD como um distúrbio monofásico agudo da mielite transversa e da neurite óptica, podendo ocorrer simultaneamente ou se apresentar de modo repentino. Alguns pacientes apresentam a doença de forma recorrente, alguns estudos sugerem que a NMOSD clássica ocorre em parte dos casos, com pessoas do sexo feminino e masculino, igualmente afetados. Em mais de 80% dos casos (JARIUS et al., 2014), a NMOSD é recorrente, sendo mais comumente encontrada em mulheres e associada com a idade mais avançada de início, maior intervalo de tempo entre eventos de índice, menos comprometimento motor com o primeiro ataque de mielite e com a presença de autoimunidade sistêmica (PEREIRA et al., 2015) (Tabela 2).

Tabela 2 – Classificação das formas clínicas do Distúrbio do Espectro da Neuromielite Óptica.

Formas Clínicas	Características
Monofásico	<ul style="list-style-type: none"> - Mielite transversa e neurite óptica ocorrem simultaneamente ou em rápida sucessão. - Afeta homens e mulher por igual. - Minoria dos casos. - NMOSD clássica.
Recaída	<ul style="list-style-type: none"> - Mielite transversa. - Neurite óptica. - Afeta frequentemente mulheres. - Maioria dos casos.
Anti-AQP4+ e formas limitadas de NMOSD	<ul style="list-style-type: none"> - Eventos idiopáticos únicos ou recorrentes de mielite extensa longitudinalmente. - Neurite óptica bilateral ou recorrente simultânea. - Neurite óptica ou mielite longitudinalmente extensa associada à doença autoimune sistêmica. - Neurite óptica ou associação de mielite com lesões cerebrais típicas.

Fonte: Adaptado Pereira, W. (2015, p. 8).

2.4.5 Diagnóstico

No último consenso referente aos critérios diagnósticos para NMOSD foram estabelecidos seis critérios básicos para refinar o diagnóstico de NMOSD que incluem: neurite óptica, mielite transversa, síndrome da área postrema, síndrome do tronco encefálico agudo, síndrome clínica diencefálica aguda e síndrome cerebral sintomática. Para os pacientes que apresentam um status AQP4-IgG positivo, identificado por testes sorológicos, apenas um critério é suficiente para o diagnóstico da doença. Porém, para pacientes que possuem um status sorológico AQP4-IgG negativo são necessários contemplar no mínimo dois dos critérios básicos, devendo apresentar neurite óptica, mielite transversa ou a síndrome da área postrema como um critério principal. Os critérios diagnósticos estabelecidos para os adultos também podem ser aplicados no diagnóstico de NMOSD pediátrica (FLANAGAN et al., 2014; BAGHBANIAN et al., 2018). O resumo dos critérios diagnósticos está presente na tabela 3.

Tabela 3 – Definição dos critérios diagnósticos para o Distúrbio do Espectro da Neuromielite Óptica conforme estabelecido em 2015.

CRITÉRIOS DIAGNÓSTICOS DE NMOSD* COM AQP4-IgG**	
Principais Critérios	<ul style="list-style-type: none"> Ter pelo menos uma característica clínica Teste positivo para AQP4-IgG Exclusão de diagnósticos alternativos
CRITÉRIOS DIAGNÓSTICOS DE NMOSD SEM AQP4-IgG	
Principais Critérios	<ul style="list-style-type: none"> Ter pelo menos 2 características clínicas principais Ter uma característica central: neurite óptica, mielite aguda ou síndrome da área postrema Cumprimento de requisitos adicionais de ressonância magnética Teste negativo para AQP4-IgG Exclusão de diagnósticos alternativos

*NMOSD: Distúrbio do Espectro da Neuromielite Óptica; **AQP4-IgG: aquaporina-4 imunoglobulina G.

Fonte: Adaptado de Baghbanian, S. M. (2018, p. 2).

O termo “distúrbio do espectro” foi introduzido no último consenso para abranger a definição de NMO clássica e incluir um espectro mais amplo das manifestações clínicas. A caracterização de anticorpos IgG específicos para AQP4 e, as características observadas em exames de neuroimagem, resultaram na reavaliação da classificação anterior da doença, por isso foi renomeada NMOSD, apresentando critérios diagnósticos mais abrangentes. As apresentações clínicas, imunológicas e radiológicas permitem um diagnóstico distintivo e adequado para NMOSD. Além disso, esta nova classificação também inclui os pacientes que tem NMOSD, porém são soronegativos para AQP4 ou que possuem um status sorológico desconhecido para AQP4, mas que apresentam neurite óptica e mielite ou até mesmo lesões cerebrais isoladas (BRUSCOLINI et al., 2018).

2.4.6 Tratamento

Não há um tratamento específico para NMOSD, os tratamentos atuais são baseados em tratamentos usados em outras doenças autoimunes. Entretanto existe um consenso dos tratamentos eficazes e ineficazes para a doença. A base da terapia NMOSD inclui a imunossupressão e a terapia de depleção de células B. As terapias atuais são razoavelmente boas,

particularmente a depleção de células B com o rituximabe, embora muitos pacientes continuem a ter exacerbações e déficits neurológicos mesmo com múltiplas drogas. Além disso, os imunossupressores podem ter efeitos colaterais significativos com o uso em longo prazo (LUDWIG et al., 2017).

O primeiro tratamento recomendado quando um indivíduo é diagnosticado com NMOSD é metilprednisolona intravenosa em altas doses (1g por dia) durante 3-7 dias. Este tratamento é indicado quando ocorre um ataque agudo. É evidente que o uso de glicocorticoides traz benefícios para os pacientes, já que esta classe de medicamentos inibe algumas respostas inflamatórias e reduz mediadores imunológicos. A administração de altas doses em um curto período pode inibir algumas funções que as células T desempenham, além disso, diminui a proliferação de linfócitos e a expressão de moléculas de adesão de leucócitos e induz apoptose de células T (FLANAGAN et al., 2014; SRISUPA – OLAN et al., 2018).

Outros medicamentos que podem ser utilizados são azatioprina e micofenolato de mofetila. A azatioprina é um medicamento utilizado como imunossupressor, isolado ou associado a outras drogas como os corticosteroides. Tem como ação principal inibir a proliferação celular, especialmente dos linfócitos por meio da redução do metabolismo de purinas, inibindo a síntese de DNA e RNA. Entretanto, a azatioprina pode demorar alguns meses para exercer suas atividades imunossupressoras. É uma medicação bem tolerada e utilizada no tratamento de doenças autoimunes, bem como em transplantes de órgãos (SATO et al., 2012; YANG et al., 2018). Por sua eficácia em reduzir os eventos de recaídas dos pacientes com NMOSD, este medicamento vem sendo amplamente utilizado na clínica.

O micofenolato de mofetila é um imunossupressor também utilizado para prevenir a rejeição em transplantes e no tratamento de doenças autoimunes. Ele atua inibindo o crescimento e proliferação celular de linfócitos T e B, pois interfere na síntese de novos nucleotídeos de guanina que são necessários para a proliferação dos linfócitos. Este medicamento promove uma redução nas taxas de recaídas dos pacientes, bem como uma melhora da sua incapacidade física (SATO et al., 2012; YANG et al., 2018).

Nos casos em que o paciente não responde ao medicamento pode ser adotado a plasmaférese (substituição do plasma), este procedimento é indicado para quadros onde há uma exacerbação de mielite e lesões no tronco cerebral que comprometam o bom funcionamento do sistema respiratório do indivíduo. Este procedimento é eficaz para a retirada de autoanticorpos, quimocinas e citocinas circulantes que propagam e amplificam a lesão na NMOSD. Os pacientes submetidos à plasmaférese apresentam uma melhora gradual no quadro clínico que persiste durante aproximadamente 6 meses (SRISUPA – OLAN et al., 2018).

Após o controle dos quadros de surtos na NMOSD os pacientes recebem um tratamento de manutenção, geralmente com prednisona (1mg/kg). Este tratamento tem ação rápida e eficaz, e geralmente é administrado quando o paciente teve uma atividade recente da doença ou até mesmo para prevenir um novo quadro de surto (FLANAGAN et al., 2014).

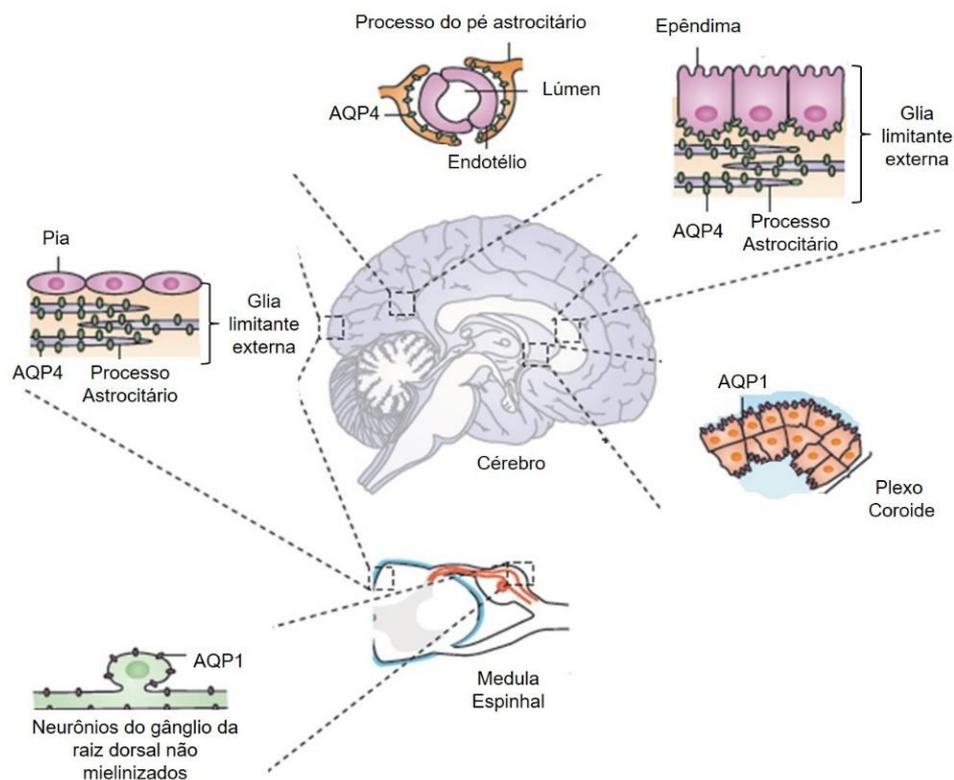
2.5 AQUAPORINAS

As aquaporinas (AQPs) são uma família de proteínas integradas à membrana plasmática que facilitam a passagem de água por meio das membranas biológicas em resposta a gradientes osmóticos (PAPADOPOULOS; VERKMAN, 2013; VERKMAN et al., 2014; NAKADA, 2015). Até o momento 13 canais de água foram identificadas em múltiplas espécies de mamíferos em locais que incluem túbulos renais e condutos coletores, glândulas secretoras, músculo esquelético, nos pequenos ramos do sistema linfático das vilosidades intestinais, pâncreas, estômago, células do intestino delgado do sistema digestivo, nas vias aéreas e no epitélio alveolar do sistema respiratório, no epitélio corneano e nas células oculares da retina, no tecido reprodutivo testicular e no cérebro (IACOVETTA et al., 2012).

Além do transporte de água, algumas AQPs conhecidas como aquagliceroproteínas que incluem AQP3, AQP7 e AQP9, também são capazes de transportar glicerol e alguns solutos polares. Em algumas condições as AQPs podem transportar alguns gases como: CO₂, NH₃, NO e O₂. Solutos pequenos como H₂O₂ e íons K⁺ e Cl⁻ também podem ser transportados

(PAPADOPOULOS; VERKMAN, 2013; VERKMAN et al., 2014). O transporte de água via AQP depende de gradientes de concentração de solutos transversais à membrana. A taxa de transporte depende da permeabilidade do canal e da abundância e localização das AQPs (IACOVETTA et al., 2012). Há três isoformas, nomeadas APQ1, AQP4 e AQP9 que foram identificadas no cérebro *in vivo* representadas na figura 4 (NAKADA, 2015).

Figura 4 – Distribuição de aquaporinas no cérebro.



Fonte: Adaptado de Papadopoulos, M. C. (2013, p. 267).

A AQP1 é expressa na membrana plasmática das células epiteliais do plexo coroide, o que sugere que a AQP1 tem um papel importante na secreção de líquido cefalorraquidiano (IACOVETTA et al., 2012; NAGELHUS; OTTERSEN, 2013; PAPADOPOULOS; VERKMAN, 2013; NAKADA et al., 2015). Também está presente em células endoteliais vasculares em todo o corpo, mas está ausente no endotélio cerebrovascular, exceto em áreas circumventriculares (PAPADOPOULOS; VERKMAN, 2013).

A AQP9 é pouco expressa no cérebro, está presente em neurônios da substância cinzenta e em alguns astrócitos. Acredita-se que AQP9 também está envolvida no metabolismo energético cerebral (IACOVETTA et al., 2012; NAGELHUS; OTTERSEN, 2013; PAPADOPOULOS; VERKMAN, 2013). A AQP mais abundante no cérebro até o momento é a AQP4, com grande distribuição na medula espinhal e nos nervos ópticos, mais precisamente nas extremidades subpiais e perivasculares dos astrócitos (PAPADOPOULOS; VERKMAN, 2013; NAKADA, 2015; IKESHIMA-KATAOKA, 2016).

A distribuição de AQP4 no cérebro é bastante diversificada, inclui o córtex cerebral, corpo caloso, retina, nervos ópticos, cerebelo, núcleos magnocelulares do hipotálamo e tronco cerebral. Além disso, está altamente expressa nos astrócitos que formam a membrana glial limitante (que atua como uma interface do SNC) e na membrana basolateral de células endoteliais. Este padrão de distribuição da AQP4 nas fronteiras entre o cérebro e os principais locais onde há água, sugere que a AQP4 facilite a passagem de líquido para dentro e fora do cérebro. Nas regiões do cérebro que não são limitadas pela barreira hematoencefálica como as regiões circumventriculares e o hipocampo, a AQP4 está altamente expressa em toda a membrana plasmática dos astrócitos ali presentes (PAPADOPOULOS; VERKMAN, 2013; IKESHIMA-KATAOKA, 2016).

AQP4 é responsável por regular o balanço hídrico, além disso, desempenha um papel importante na captação e liberação de potássio pelos astrócitos, migração das células gliais, cicatrização glial e comunicação celular entre astrócitos (VERKMAN et al., 2014; VERKMAN et al., 2017). Em estudos com ratos knockout para a AQP4, foram identificados papéis importantes desempenhados pela proteína como a facilitação do movimento da água para dentro e fora do SNC, migração astrocitária e neurocirculação (PAPADOPOULOS; VERKMAN, 2013). Além disso, animais com AQP4 deficiente desenvolvem um edema cerebral citotóxico devido ao desequilíbrio osmótico. A ligação de IgG a AQP4 tem como consequência a alteração da função da proteína, pois o astrócito internaliza a AQP4 comprometendo seu funcionamento e causando danos celulares (VERKMAN et al., 2014; VERKMAN et al., 2017).

O predomínio de AQP4 sobre o astrócito torna-a uma célula-alvo de distúrbios cerebrais, sendo uma área promissora para a investigação e identificação de novas abordagens terapêuticas (IACOVETTA et al., 2012; GUO et al., 2017). Como o cérebro não possui um sistema linfático característico, a AQP4 foi uma alternativa para manutenção de fluídos (HUBBARD et al., 2017). Por conta das suas funções, as AQPs expressas no SNC são alvos de algumas patologias, dentre elas está a NMOSD e astrocitopatias (PAPADOPOULOS; VERKMAN, 2013; ASAVAPANUMAS et al., 2014).

2.6 EXCITOTOXICIDADE GLUTAMATÉRGICA

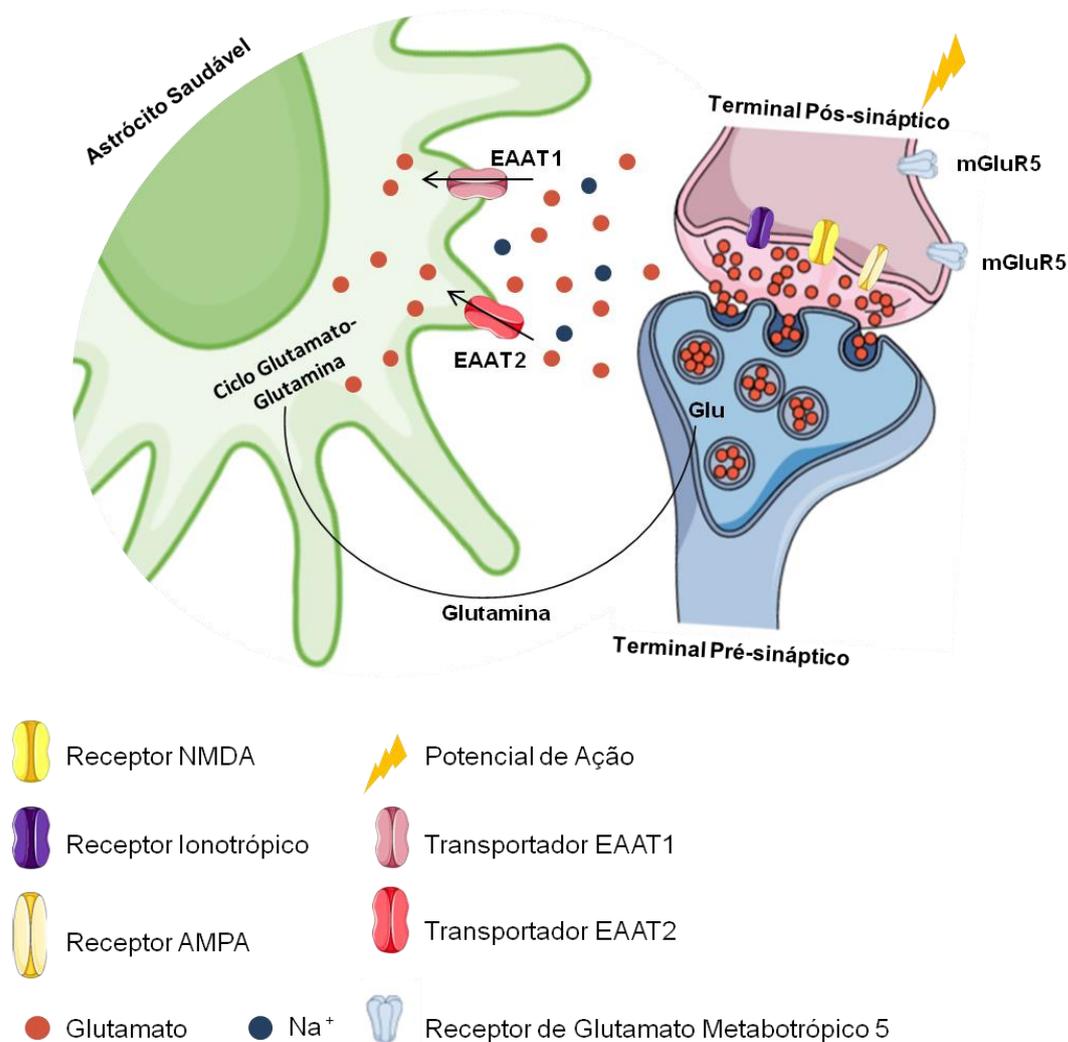
Como mencionado anteriormente, os astrócitos são células que participam ativamente das sinapses glutamatérgicas, regulando os níveis de glutamato liberados no espaço extracelular, através da ação de transportadores de glutamato. O glutamato é uma molécula livre e a mais abundante no SNC. As primeiras pesquisas com esta molécula demonstraram que o glutamato tem uma ação excitatória intensa sobre as células nervosas e, desde então, as funções desempenhadas por ele são estudadas, incluindo o papel de neurotransmissor excitatório e no metabolismo cerebral (LEWERENZ; MAHER, 2015; SILVA et al., 2019).

No SNC, o glutamato é disposto em vesículas sinápticas no terminal pré-sináptico por intermédio da ação dos transportadores vesiculares de glutamato. Após a despolarização da membrana pré-sináptica o glutamato é liberado na fenda e se liga aos receptores ionotrópicos de glutamato (iGluRs) na membrana pós-sináptica (Figura 5). A despolarização provocada pelo glutamato gera um potencial excitatório pós-sináptico, o que irá facilitar a formação de um potencial de ação no axônio (LEWERENZ; MAHER, 2015; DANBOLT et al., 2016).

A sinapse glutamatérgica é controlada por processos astrocitários, pois são nos astrócitos que os transportadores de aminoácidos excitatórios (EAATs) estão altamente expressos. Até o momento já foram identificados cinco tipos diferentes destes transportadores, dos quais EAAT1 e EAAT2 estão presentes

nos astrócitos. Aproximadamente 90% do transporte de glutamato é mediado pelo EAAT2, também conhecido como GLT-1 em roedores, foi o primeiro dos transportadores a ser imunocitoquimicamente localizado (LEWERENZ; MAHER, 2015; DANBOLT et al., 2016).

Figura 5 – Metabolismo do glutamato cerebral.



O glutamato é vesiculado no terminal pré-sináptico através de vGLUT e liberado na fenda sináptica após a despolarização da membrana pré-sináptica, ligando-se aos iGluRs presentes na membrana pós-sináptica e aos receptores NMDA e AMPA para gerar um potencial de ação. O excesso de glutamato liberado na fenda sináptica é regulado pelos astrócitos através dos transportadores de aminoácidos excitatórios EAAT1 e EAAT2 contra um gradiente de concentração. Nos astrócitos, o glutamato é reciclado e convertido em glutamina, que é transportada para os neurônios e convertido em glutamato novamente para ser usado em uma nova sinapse. Fonte: Fonte: Adaptado de Silva, A. P. B. (2019, p. 04).

Estes transportadores co-transportam duas ou três moléculas de Na⁺ e um próton com cada molécula de glutamato, em conjunto com o

contratransporte de um íon K^+ . Assim, utilizam um gradiente eletroquímico destes íons através da membrana plasmática como uma fonte de energia. Os transportadores são capazes de acumular eficazmente glutamato em células contra os seus índices de concentração intra e extracelulares, permitindo que o cérebro mantenha uma baixa concentração de glutamato extracelular (LEWERENZ; MAHER, 2015; DANBOLT et al., 2016; SILVA et al., 2019).

A excitotoxicidade é uma resposta provocada pelo excesso de glutamato que resulta na morte de células nervosas. Esse processo é desencadeado pela ativação dos receptores iGluRs levando a perda das características das estruturas pós-sinápticas que incluem dendritos e corpos celulares. A excitotoxicidade aguda tem ações importantes nos distúrbios do SNC, incluindo isquemia cerebral, estado epilético e, acredita-se que também está envolvida na NMOSD, devido à lesão astrocitária (LEWERENZ; MAHER, 2015).

Com base em testes *in vitro*, após a ligação da IgG na AQP4 ocorre um comprometimento funcional do transportador EAAT2 nos astrócitos, por conta da ativação do processo de endocitose da AQP4 e degradação lisossômica. Por isso, há uma redução na captação de glutamato por este transportador (HINSON et al., 2017). Isso permite que altas concentrações extracelulares de glutamato fiquem livres na fenda sináptica. Quando este aminoácido excitatório está em altas concentrações ele se torna uma neurotoxina altamente potente provocando danos neurais graves (FANG et al., 2012; LEWERENZ; MAHER, 2015). Quando há um estímulo excessivo do glutamato, as células nervosas são destruídas. Por esta razão, a excitotoxicidade pode estar fortemente envolvida com doenças agudas ou crônicas do SNC (LEWERENZ; MAHER, 2015).

2.7 ESTRESSE OXIDATIVO E ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROs)

O oxigênio é a principal molécula fornecedora de energia para os organismos aeróbios vivos. Entretanto, as células que se beneficiam do oxigênio também são sobrecarregadas pela presença de espécies reativas de oxigênio (EROs) (MATSCHE et al., 2018). Ao gerar energia na forma de ATP, as mitocôndrias celulares produzem como subproduto EROs, estes compostos

químicos são os responsáveis por induzir um processo conhecido como estresse oxidativo (ADIELE; ADIELE, 2017). Este processo é desencadeado quando a produção de substâncias pró-oxidantes ultrapassa a produção de moléculas antioxidantes. Esta perturbação na homeostase oxidativa pode provocar danos às células, organelas celulares e componentes como lipídeos, proteínas, carboidratos e DNA. Se estes danos não forem reparados, ocorrerá a morte celular (OHL et al., 2016; MATSCHKE et al., 2018).

O estresse oxidativo está associado a patogênese de diversas doenças, dentre elas estão acidente vascular cerebral, Parkinson, Alzheimer e distúrbios autoimunes do SNC como EM e NMOSD, devido a produção de EROs pelo processo inflamatório (OHL et al., 2016; ADIELE; ADIELE, 2017; MATSCHKE et al., 2018). Nas células do SNC há uma alta produção de energia pelas mitocôndrias, para formação de potenciais de ação, condução de impulsos nervosos, transporte axonal, entre outras funções. Como consequência estas células naturalmente produzem altos níveis EROs intracelulares. Em condições patológicas, como no caso da NMOSD, em que há uma destruição celular associada a um processo inflamatório, resultando na quebra da homeostase celular, ocorre uma produção elevada de EROs que contribui para a morte de células como astrócitos, neurônios e principalmente oligodendrócitos, por serem mais sensíveis as ações das EROs (ADIELE; ADIELE, 2017).

Acredita-se que o estresse oxidativo seja um dos mecanismos causadores de destruição de astrócitos e secundariamente de oligodendrócitos na NMOSD, contribuindo diretamente para a formação das lesões (PENTÓN-ROL et al., 2009). A NMOSD tem como característica uma inflamação grave com recrutamento de células como macrófagos e microglia ativada. Estas células são capazes de induzir a produção de grandes quantidades de EROs que irão interferir negativamente na homeostase de astrócitos e oligodendrócitos. Por serem mais suscetíveis a ação do estresse oxidativo, estas células entram em colapso e como consequência ocorrerá uma destruição neuronal e axonal, bem como danos a bainha de mielina. Por este motivo, pensa-se que o estresse oxidativo seja um dos fatores que contribui para degeneração celular, destruição de estruturas celulares e para o processo

de demielinização observados na NMOSD (PENTÓN-ROL et al., 2009; ADIELE; ADIELE, 2017; MATSCHKE et al., 2018).

2.8 MODELO EXPERIMENTAL *IN VITRO*

Após a descoberta de um biomarcador circulante específico conhecido como AQP4-IgG, cientistas procuraram compreender melhor a interação do anticorpo com seu alvo, a AQP4 astrocitária. Para tal, alguns modelos *in vitro* e *in vivo* foram propostos e desenvolvidos para elucidar os mecanismos patológicos da NMOSD (LI; YAN, 2015). Dentre estes modelos experimentais, os mais utilizados para o estudo da doença são executados *in vivo*. Estes modelos são capazes de mimetizar características patológicas semelhantes às observadas em humanos como infiltração de células do sistema imune, deposição de IgG e complemento ativado, degradação celular e tecidual, bem como desmielinização (BRADL; LASSMANN, 2014; WU et al., 2019). Entretanto, estes modelos não podem ser utilizados para investigar pequenas alterações a nível celular, molecular e bioquímico que podem estar envolvidos na fisiopatologia da NMOSD. Para tal, os modelos experimentais *in vitro* foram desenvolvidos.

Um dos primeiros trabalhos realizados em modelos *in vitro*, demonstrou que o soro de pacientes AQP4+ era capaz de induzir necrose em astrócitos de roedores em cultura, por meio da via clássica do sistema complemento. Além de evidenciar que a citotoxicidade é mediada pelo complemento ativado, este estudo também nos forneceu um modelo celular para mimetizar a perda astrocitária mediada pela ação de anticorpos anti-AQP4. Além de evidenciar que o anticorpo específico é capaz de alterar tanto o fenótipo quanto a morfologia de astrócitos em cultura (LI; YAN, 2015).

Estudos posteriores destacaram que os mecanismos patogênicos da IgG específica incluem modificar a permeabilidade da barreira hematoencefálica, induzir a internalização de AQP4 pela célula, bem como interromper a expressão polarizada da proteína, mediar subprodutos inflamatórios perivasculares da ativação do complemento, induzir lesão astrocitária, causar

desmielinização devido a ADCC, além de desestabilizar a homeostase glutamatérgica (LI; YAN, 2015).

Logo, culturas primárias de astrócitos expostas a anticorpos anti-AQP4, com ou sem associação de complemento, podem ser utilizadas como um modelo *in vitro* na investigação dos mecanismos celulares da doença, bem como para triagem de novas drogas que possam manter as células viáveis e que bloqueiem alterações fenotípicas e morfológicas em astrócitos, reduzindo a morte celular (LI; YAN, 2015; WU et al., 2019).

Para se investigar alterações celulares, moleculares e bioquímicas que possam implicar na NMOSD, os modelos *in vitro* são essenciais. O cultivo de astrócitos como culturas primárias e linhagens representa uma ferramenta poderosa para explorar informações específicas fornecidas por essas células e para revelar mecanismos relacionados ao seu funcionamento normal e na doença (HERTZ et al., 1998). Assim, o uso de modelos *in vitro* de tipos celulares específicos tem sido muito útil no progresso do campo da neurociência (LANGE et al., 2012).

A importância deste trabalho é justificada pelo fato da NMOSD ser uma doença inflamatória, autoimune e incapacitante que acomete o principal sistema humano, causando lesões destrutivas graves em células e tecido que comprometem o funcionamento dos sistemas visual e sensorio-motor do portador. Logo, é relevante identificar modificações celulares, moleculares e bioquímicas, através de culturas de astrócitos de ratos adultos, para nos proporcionar uma melhor compreensão da patogênese da doença, visando o desenvolvimento de novos candidatos terapêuticos personalizados mais eficazes e direcionados para o tratamento da NMOSD.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um modelo experimental *in vitro* de NMOSD utilizando anticorpos reativos derivados do soro e IgG purificada de pacientes com NMOSD anti-AQP4+ e avaliar por meio de culturas primárias de astrócitos adultos a relação da excitotoxicidade glutamatérgica e do estresse oxidativo na fisiopatologia da NMOSD.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obter, filtrar e armazenar amostras de soro AQP4+ de pacientes com diagnóstico confirmado de NMOSD.
2. Purificar as proteínas (IgG) a partir do plasma de pacientes diagnosticados com NMOSD.
3. Estabelecer e caracterizar culturas primárias de astrócitos de ratos adultos.
4. Avaliar a citotoxicidade celular em astrócitos expostos ao soro AQP4+ e a IgG purificada.
5. Comparar a morfologia das culturas de astrócitos antes e após a exposição ao soro AQP4+ e a IgG purificada.
6. Avaliar a captação de glutamato por astrócitos expostos ao soro AQP4+ e a IgG purificada.
7. Avaliar o estresse oxidativo em astrócitos expostos ao soro AQP4+ e a IgG purificada.

4 METODOLOGIA

4.1 ASPECTOS ÉTICOS

O presente trabalho foi aprovado pela Comissão Científica do Instituto de Geriatria e Gerontologia e pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS) sob o número 8139 do SIPESQ (anexo), e desenvolvido no Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Instituto do Cérebro – InsCer em colaboração com o Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

4.2 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

O estudo contou com um total de 36 ratos (34 fêmeas e 2 machos) da linhagem Wistar com idade entre seis e nove meses e peso entre 400-500g para obtenção dos astrócitos. Os animais foram alojados no Centro de Modelos Biológicos Experimentais (CEMBE) localizado no prédio 14 da PUCRS e no Biotério do Departamento de Bioquímica da UFRGS.

4.3 PROCESSAMENTO DO SORO AQP4+ E PURIFICAÇÃO DAS IgGs PLASMÁTICAS HUMANAS

As amostras de soro AQP4+, oriundas de uma coleta de sangue convencional, foram obtidas de um banco amostral pertencente a um projeto piloto (CEP/aprovação do projeto CEAE, número 30315514.9.0000.5336) desenvolvido no Laboratório de Biologia Celular e Molecular. Estas amostras de soro AQP4+ foram filtradas utilizando um filtro estéril Millex-GV com um poro de 0,22 µm (MERK, Sigma-Aldrich, Missouri, EUA), para retirada de impurezas da amostra. Após, estas amostras de soro AQP4+ foram mantidas a -80°C até o uso.

A extração dos autoanticorpos IgG foi realizada utilizando uma amostra de plasma, através de plasmaférese, de um indivíduo idoso, do sexo feminino, com status sorológico positivo para AQP4. A IgG foi então preparada, purificada e ajustada para uma concentração de 2 mg/ml. Este procedimento é

composto por quatro etapas descritas a seguir. Inicialmente 40 ml de Tampão A (0,02 M de NaH_2PO_4 , 0,15 M de NaCl em pH de 8,0) foi adicionado em um tubo cônico (50 ml), seguido da adição de 5 ml de Sepharose® 4B (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA), esta mistura foi mantida a 4°C por 18 horas sobre agitação orbital para homogeneização. No mesmo momento 1 L do plasma foi descongelado em temperatura ambiente e mantido a 4°C.

O plasma foi filtrado utilizando um filtro Sartopore® 2 MidiCaps® 0,2 μm (Sartorius, Göttingen, Germany) com o auxílio de uma bomba peristáltica. Após, a mistura foi centrifugada (20°C, 800 g, 10 minutos), o sobrenadante foi descartado e a resina foi resuspensa com 5 ml do Tampão A, e adicionada ao plasma a uma proporção de 1:1. A mistura foi mantida sobre agitação magnética em temperatura ambiente durante 18 horas.

Após o período de incubação, a amostra de plasma contendo a Sepharose foi transferida para uma coluna de eluição (3 cm x 15 cm) (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA), após toda a passagem da amostra na coluna foi feita uma lavagem da resina com o Tampão A, e foi realizada a dissociação do anticorpo da resina utilizando 10 ml de Tampão Glicina (0,1 M e pH de 2,5). A solução contendo as IgGs purificadas foi diluída em tampão de diluição 10X (100 mM de NaH_2PO_4 , 10 mM de Tris) seguido de diálise com o Pur-A-Lyzer™ Mega Dialysis Kit (MERK, Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) contra PBS (1X), a 4°C sobre agitação magnética por 18 horas.

Posteriormente, as IgGs foram transferidas para Amicon® Ultra-4 (MERK, Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) e centrifugadas (4°C, 3.800 rpm, 15 minutos), para sua concentração. As proteínas foram quantificadas com o kit Pierce™ Coomassie Plus (Bradford) Assay (Thermo Scientific, Life Technologies, EUA) por espectrofotometria em um comprimento de onda de 595 nm.

4.4 ENSAIO DE AFINIDADE DAS IgGs PURIFICADAS EM CULTURAS DE HEK-293T TRANSFECTADAS

Para avaliar a afinidade das IgGs purificadas com a AQP4, a linhagem de células de rim embrionário humano-293, expressando uma versão mutante do antígeno T (HEK-293T), foram cultivadas com DMEM-Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Gibco, Life Technologies, EUA) suplementado com 10% de SFB-Soro Fetal Bovino (Gibco, Life Technologies, EUA), 1% (100 U/ml) de penicilina/estreptomicina (Gibco, Life Technologies, EUA) e 0,1% (100 µg/ml) de gentamicina (Gibco, Life Technologies, EUA) a 37°C com 5% de CO₂.

Após atingirem uma confluência de aproximadamente 70%, as células foram transfectadas com plasmídeo (pIRES2-DsRED2 5,3 kb) contendo o cDNA da isoforma AQP4-M23. Para tal usou-se 225 µl de Opti-MEM® (Gibco, Life Technologies, EUA), 20 µl do agente de transfecção FuGENE® (Promega, Madison, Wisconsin, EUA) e 5 µl de cDNA de AQP4-M23 e incubou-se por 15 minutos a 37°C. Após a tripsinização das células, as mesmas foram transferidas para uma placa de 6 poços e mantidas em estufa por 24 horas juntamente com o meio de transfecção.

As células HEK-293T AQP4-M23 foram tripsinizadas e semeadas em lâminas de Teflon (TF1205M) (Matsunami Glass, Osaka, Japan) de 12 poços e incubadas por 24 horas. A IgG purificada é diluída em meio de cultivo (1:16) e 15 µl desta diluição é colocado nos poços seguido de incubação por 30 minutos em temperatura ambiente. As células foram lavadas com solução de PBS, seguido da adição do anticorpo secundário fluorescente Anti-Human IgG Cross-Adsorbed, DyLight 488® (Thermo Scientific, Life Technologies, EUA) diluído 1:500 em meio de cultura, incubado por 30 minutos. As células foram lavadas novamente com PBS e fixadas com álcool absoluto por 15 minutos. Ao final, as lâminas são montadas com lamínulas utilizando o Fluoroshield™ (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) e visualizadas em microscópio confocal (Zeiss LSM-5 Exciter).

4.5 ISOLAMENTO E CULTIVO DE ASTRÓCITOS DE RATOS ADULTOS

Para o isolamento dos astrócitos derivados de ratos adultos foi empregado o protocolo descrito por Souza e colaboradores (2013). Para a cultura de células foi utilizado um total de 2 ratos machos e 34 fêmeas saudáveis totalizando um número amostral de 36 animais, onde cada animal permitiu a cultura de duas placas de 24 poços, totalizando assim 72 placas de cultivo.

Os animais foram eutanasiados utilizando guilhotina específica para roedores, o crânio foi retirado e o córtex foi coletado para extração dos astrócitos. Pequenas fatias da substância cinzenta do córtex foram retiradas e dispostas em uma placa de petri contendo 10 ml de HBSS-Hanks' Balanced Salt Solution (Gibco, Life Technologies, EUA). O conteúdo da placa foi transferido para um tubo contendo 0,05% de tripsina (Gibco, Life Technologies, EUA) e 0,2 mg de DNase (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) e incubado em banho-maria por 15 minutos, seguido de dissociação mecânica dos tecidos por 15 minutos. Para inativar a ação da tripsina foi adicionado 20% de SFB (Gibco, Life Technologies, EUA).

Após a homogeneização, a amostra foi centrifugada (20°C, 1.200 rpm, 5 minutos), o sobrenadante foi retirado e adicionado mais 10 ml de HBSS contendo 40 U papaína/ml (Worthington Biochemical Corporation, EUA), 0,2 mg de DNase e 1 mg de cisteína com mais 10 minutos de dissociação mecânica. Após esse período foi acrescentado 20% de SFB e seguido de centrifugação (20°C, 1.200 rpm, 5 minutos).

Após centrifugação o sobrenadante foi removido e adicionou-se 8 ml de HBSS para decantação por 1 hora. Após a decantação o sobrenadante é coletado seguido de uma centrifugação a 1.200 rpm por 7 minutos a 20°C. As células foram ressuspensas com 1 ml de meio de cultivo, DMEM/F12-Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (Gibco, Life Technologies, EUA) suplementado com 10% de SFB, 1% de fungizona (Gibco, Life Technologies, EUA) e 0,5% de gentamicina (Gibco, Life Technologies, EUA). Foram semeadas 1×10^5 células por poço, em uma placa de 24 poços revestida com poli-L-lisina a 0,01% (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA).

As células foram mantidas em estufa a 37°C, com 5% de CO₂ durante 3 semanas para proliferação celular. O meio de cultivo foi substituído 24 horas após a cultura. Na primeira semana, o meio foi substituído a cada 2 dias, na segunda semana a cada 4 dias, e na terceira semana o meio de cultivo foi suplementado com 20% de SFB e substituído a cada 4 dias. A cada troca de meio, as células foram submetidas à agitação orbital durante 5 minutos a temperatura ambiente, com intuito de remover a microglia e células precursoras de oligodendrócitos, tornando a cultura de astrócitos pura. Os astrócitos foram utilizados após atingirem 70-80% de confluência.

4.6 CARACTERIZAÇÃO DOS ASTRÓCITOS POR IMUNOCITOQUÍMICA

Para a imunocitoquímica, as culturas foram fixadas com PFA 4% durante 30 minutos e permeabilizadas com uma solução contendo 0,2% de Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA), 3% de SFB diluídos em HBSS, por 30 minutos em temperatura ambiente. Após a permeabilização, as culturas celulares foram expostas aos anticorpos primários para S-100 β , proteína que difere astrócitos de neurônios (1:200; Sigma-Aldrich, Missouri, EUA), para a proteína canal de água astrocitária AQP4 (1:100; Sigma-Aldrich, Missouri, EUA), para o principal transportador de glutamato astrocitário GLT-1 (1:100; Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) por 24 horas.

Posteriormente os astrócitos foram lavados com HBSS e marcados com os anticorpos secundários fluorescentes Alexa Fluor® 594 (1:200) para identificação de S100 β , Alexa Fluor® 488 para GLT-1(1:200) e com Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) FITC conjugated (1:200) para identificação de AQP4, durante um período de 2 horas. Também foram realizadas incubações com DAPI-4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride (Invitrogen, Life Technologies, EUA) para marcação do núcleo celular e com Faloidina (Cytoskeleton, Denver, EUA) para evidenciar os filamentos de actina, ambos durante 15 minutos. As células foram observadas em microscópio com fluorescência Nikon Eclipse TE2000 Inverted.

4.7 DESENVOLVIMENTO DO MODELO *IN VITRO* DE NMOSD EM ASTRÓCITOS ADULTOS

Ao atingirem a confluência (70-80%), os astrócitos receberam os seguintes tratamentos: (1) exposição a 15% de soro AQP4+; (2) exposição a 50 µg/ml; (3) 100 µg/ml e (4) 200 µg/ml de IgG purificada do plasma pacientes com NMOSD. O grupo controle não recebeu nenhum tratamento. Durante o tratamento a suplementação do meio com SFB foi reduzida para 1%. Os tratamentos ficaram expostos as células durante os períodos de 24, 48 e 72 horas.

4.8 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE CELULAR EM ASTRÓCITOS EXPOSTOS AO SORO AQP4+ E IgG PURIFICADA

Para avaliar a citotoxicidade das amostras de soro AQP4+ e IgG purificada, foi realizado o teste MTT para produção de Formazan {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]} (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA). Após a incubação com soro AQP4+ e com IgG 50 µg/ml, 100 µg/ml e 200 µg/ml durante o período de 24, 48 e 72 horas, incubou-se uma solução de MTT 0,05 mg/ml (1µl de MTT para cada 100 µl de meio de cultivo).

Esta solução permaneceu na placa durante 3 horas, após o meio foi removido e foi adicionado 300 µl de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) seguida de agitação por 5 minutos. Para a leitura, 200 µl desta solução foi transferido para uma placa de 96 poços. A leitura foi realizada em comprimentos de onda de 560 nm e 650 nm utilizando o leitor de placas Spectra Max M5, Molecular Devices.

4.9 AVALIAÇÃO DA EXCITOTOXICIDADE GLUTAMATÉRGICA EM ASTRÓCITOS EXPOSTOS AO SORO AQP4+ E IgG PURIFICADA

Para avaliar o processo de excitotoxicidade e mensurar a capacidade dos astrócitos de captar glutamato, as culturas foram expostas ao soro AQP4+ e a IgG purificada, em diferentes concentrações, nos períodos de 24, 48 e 72 horas. Após esse período, o meio de cultura foi substituído por uma solução de

HBSS (280 µl) contendo 0,1 mM de L-glutamato e 0,33 µCi/ml de L-[2,3-³H] glutamato (20 µl) (PerkinElmer, Massachusetts, EUA).

Após um período de 7 minutos de incubação a 37°C, a solução foi retirada e as células foram lavadas três vezes com 300 µl de HBSS gelado. As células foram lisadas com uma solução de NaOH 0,5 M durante 24 horas. Após este período, o conteúdo lisado foi coletado e 20 µl foi utilizado para quantificação de proteínas totais e 200 µl foram dispostos em *ependorfs* contendo o líquido de cintilação. Após homogeneização em vórtex a captação de glutamato foi lida em contador de cintilação (Hidex, 300SL).

4.10 AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO EM ASTRÓCITOS TRATADOS COM SORO AQP4+ E IgG PURIFICADA

Para avaliar os danos celulares provocados pelo estresse oxidativo foram realizados dois ensaios distintos após os tratamentos com soro AQP4+ e IgG purificada. O primeiro, foi o teste com 2'-7'-diclorofluoresceína (DCFHDA) (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) a uma concentração de 10 µM. O DCFHDA é hidrolisado por esterases intracelulares em diclorofluoresceína (DCFH), que fica retido dentro da célula. Após a ação de oxidantes celulares, esta molécula não fluorescente é oxidada em diclorofluorescina fluorescente (DCF), posteriormente é realizada a lise celular para quantificação da fluorescência do composto intracelular retido nas células, assim é possível mensurar a produção de EROs após os tratamentos.

Para tal ensaio, as células foram expostas ao DCFHDA por 30 minutos a uma temperatura de 37°C. A seguir, as células foram lisadas com uma solução de PBS suplementado com 0,2% de Triton X-100 e transferidas para uma placa escura para leitura da fluorescência utilizando um leitor de placas (Spectra Max M5, Molecular Devices) nos comprimentos de onda de excitação e emissão de 485 nm e 520 nm, respectivamente.

O segundo teste realizado foi o TBARS, que permite detectar a produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), formadas pela ação da peroxidação lipídica, que pode ocorrer por consequência da produção de

EROs. O teste TBARS quantifica o malondialdeído (MDA) presente nas células, que é um dos produtos liberados quando ocorre dano nas membranas lipídicas celulares. Após os tratamentos, os astrócitos aderentes foram retirados da placa utilizando uma solução de tripsina 0,5%, centrifugadas a 1.200 rpm por 5 minutos e o *pellet* celular foi ressuspensão em solução de PBS. Para executar o teste TBARS utilizou-se o TBARS Assay Kit (Cayman Chemical Company, Michigan, EUA) conforme as recomendações do fabricante.

Resumidamente, 100 µl de amostra foram transferidos para um tubo de 5 ml, onde foi adicionado 100 µl de dodecil sulfato de sódio (SDS) seguido de homogeneização em vórtex. Após, 4ml do Reagente de Cor (contém: 530 mg de ácido tiobarbitúrico, 50 ml da solução de ácido acético e 50 ml de hidróxido de sódio) previamente preparado foi acrescentado, seguido de uma homogeneização. Os tubos foram então incubados em banho-maria durante 1 hora a 100°C e posteriormente em gelo durante 10 minutos para interromper a reação.

Após esse período, os tubos foram centrifugados a 1.600 g por 10 minutos a 4°C. Para quantificar a produção de MDA, 150 µl do homogeneizado foram transferidos para uma placa escura. A leitura da fluorescência foi realizada em um leitor de placas (VICTOR Multilabel Plate Reader) nos comprimentos de onda de excitação e emissão de 530 nm e 550 nm, respectivamente.

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para comparar os resultados dos astrócitos tratados com as células controle foi aplicado uma análise estatística paramétrica, a ANOVA (teste de variância) seguido de um post-hoc de Dunnett, considerando como um resultado significativo o valor de $p < 0,05$. Para fins estatísticos, neste estudo os dados de machos e fêmeas foram compilados, uma vez que não se observou diferença nos resultados de ambos os sexos.

5 RESULTADOS

5.1 DADOS DAS AMOSTRAS DE SORO AQP4+ E IgG PURIFICADA

A amostra de plasma utilizada para extração das IgGs foi extraída durante um quadro de surto de mielite de um indivíduo do sexo feminino, com 66 anos, branca. O diagnóstico clínico de NMOSD foi confirmado através do status sorológico positivo para anticorpos anti-AQP4 (titulação 1.024X). A paciente apresentava manifestações clínicas de mielite transversa longitudinalmente extensa recorrente e síndrome da área postrema. Seguiu-se o tratamento com rituximabe (anticorpo monoclonal anti-CD20) na quantidade de 1 g EV a cada 6 meses, juntamente com prednisolona oral 10 mg/dia e metotrexate oral 15 mg uma vez por semana.

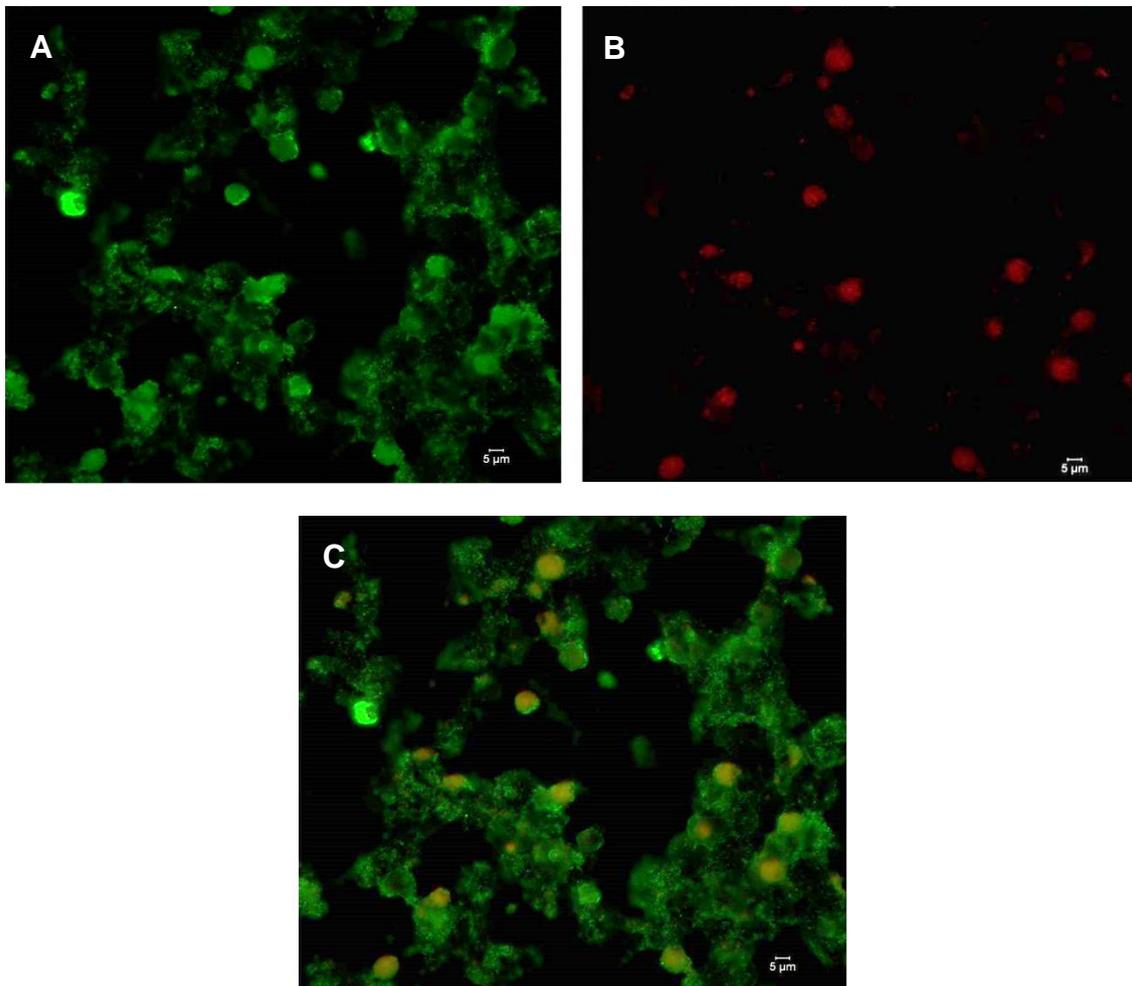
As amostras de soro AQP4+ foram selecionadas de um banco de dados amostral oriundo do Laboratório de Biologia Celular e Molecular. Estas amostras eram derivadas de indivíduos adultos do sexo masculino e feminino, de etnia mista (brancos e negros), com status sorológico positivo para anticorpos anti-AQP4.

5.2 AFINIDADE DAS IgGs PURIFICADAS PELO ANTÍGENO AQP4

Após a purificação das IgGs da amostra de plasma humano, foi realizado o ensaio baseado em células (CBA) para verificar se as IgGs purificadas reconheciam a AQP4 expressa nas células HEK-293T transfectadas com AQP4-M23. O ensaio mostrou que as IgGs purificadas são capazes de reconhecer e se ligar a proteína AQP4, indicando assim que entre as IgGs extraídas, há IgG específica para o antígeno AQP4. A figura 6 abaixo mostra fotomicrografias de uma imunofluorescência indireta. A fluorescência em verde corresponde a marcação da IgG purificada, em vermelho as células HEK-293T expressando o antígeno (AQP4-M23) e em merge evidencia-se a ligação de IgG a AQP4 expressa nas células HEK-293T.

Figura 6 – Fotomicrografias de células HEK-293T marcadas por imunofluorescência evidenciando a ligação antígeno-anticorpo (aumento de 200X). (A) Marcação de IgG com anticorpo secundário Alexa Fluor IgG Daylight 488; (B) Células marcadas com o plasmídeo (pIRES2-DsRED2 5,3 kb),

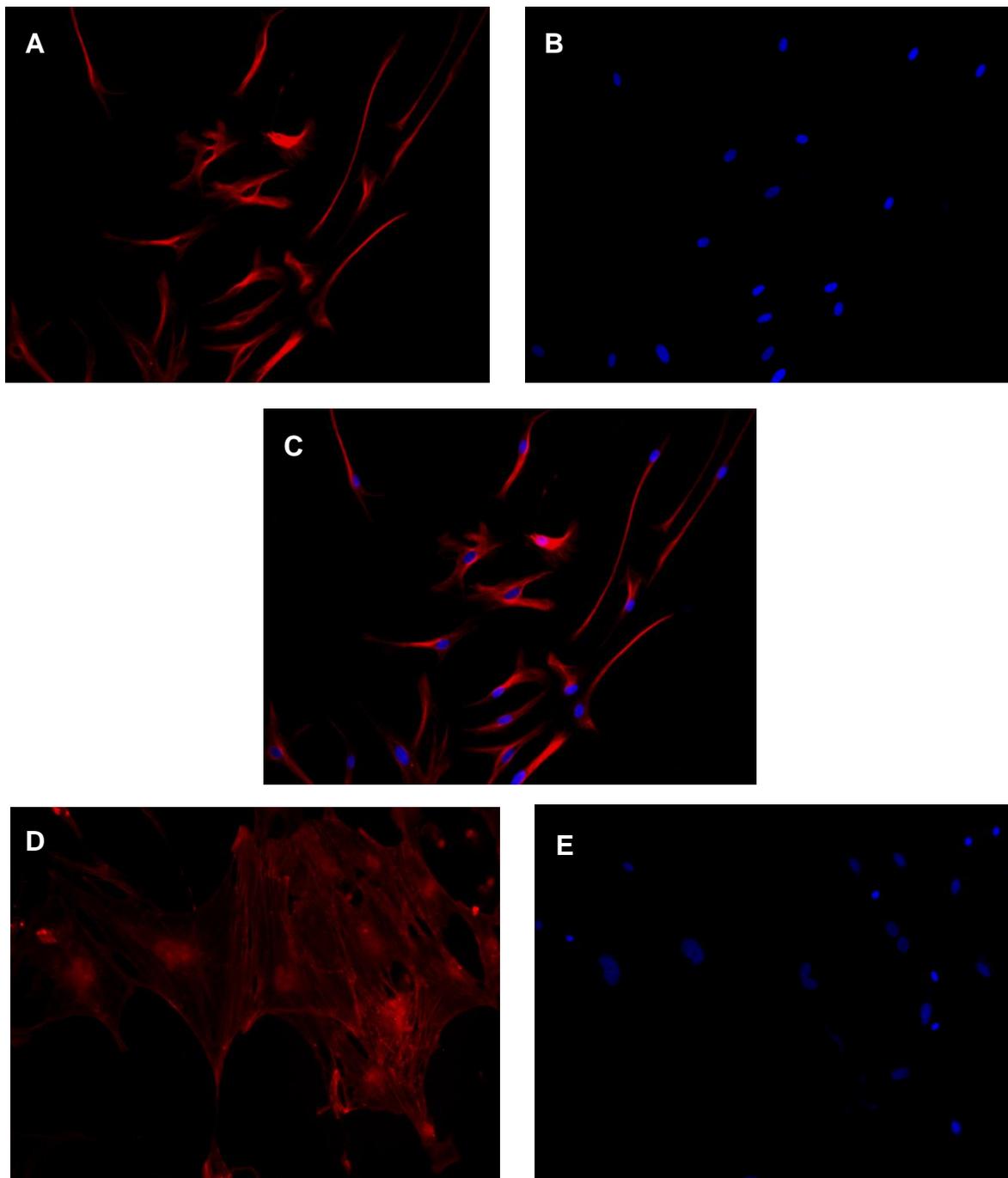
expressando o gene AQP4-M23; (C) Co-localização das imagens comprovando a ligação antígeno-anticorpo.

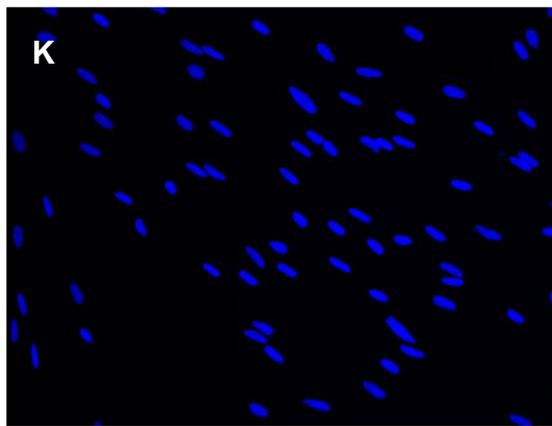
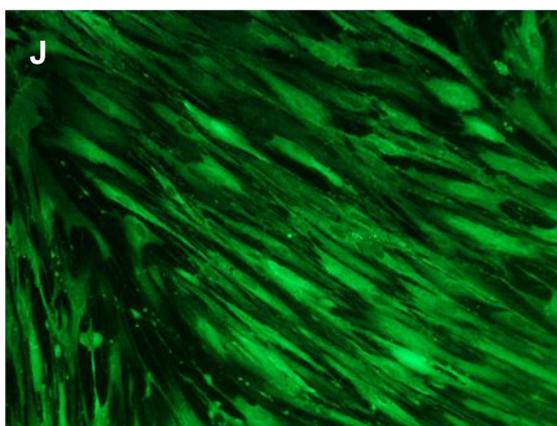
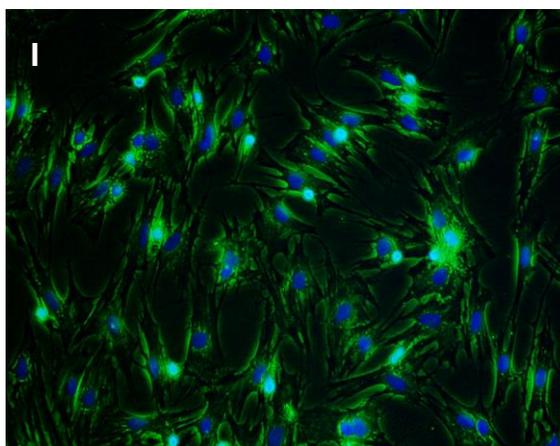
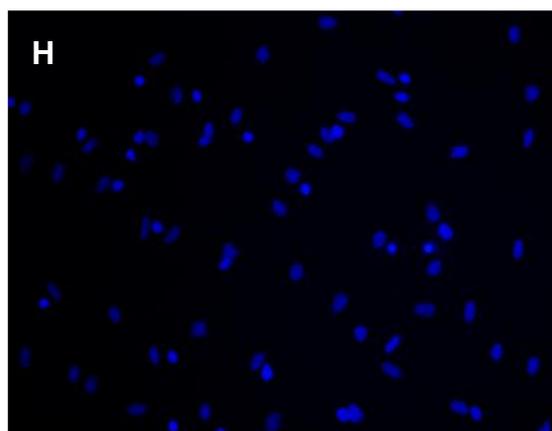
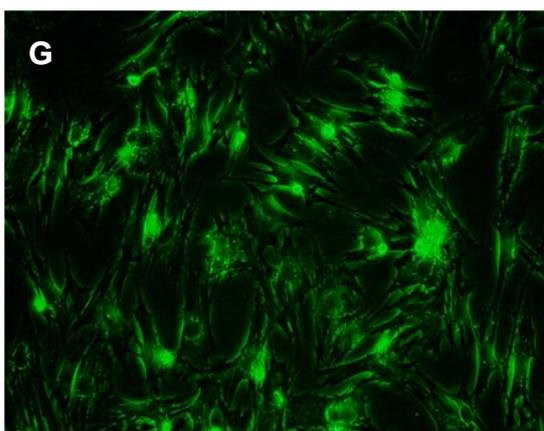
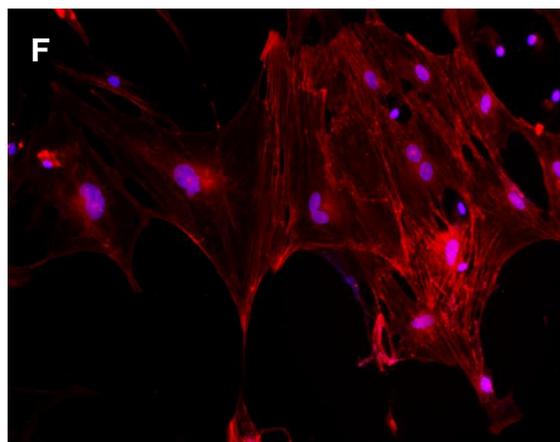


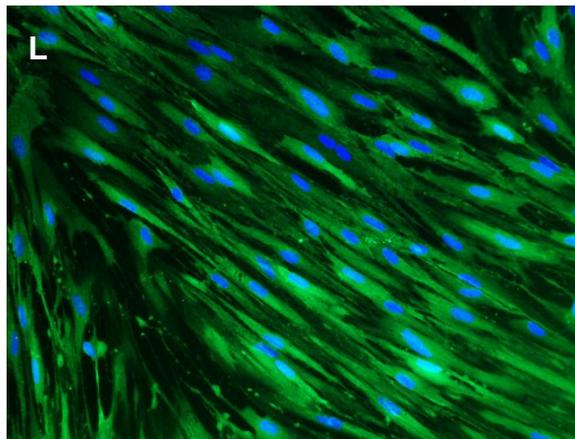
5.3 CARACTERIZAÇÃO DAS CULTURAS DE ASTRÓCITOS DE RATOS ADULTOS

Após 21 dias em cultura, os astrócitos de ratos adultos foram caracterizados com os marcadores anti-S100 β , anti-AQP4, anti-GLT-1 e Faloidina, a fim de confirmar a pureza da cultura. A imunocitoquímica abaixo (Figura 7) contrasta em azul (B, E, H, K) os núcleos celulares marcados com DAPI. Em vermelho temos a marcação da proteína que distingue astrócitos e neurônios S100 β (A e C) e com Faloidina (D e F) evidenciando os filamentos de actina. Em verde, a marcação da proteína canal de água astrocitária AQP4 (G e I) e do principal transportador de glutamato GLT-1 (J e L).

Figura 7 – Fotomicrografias da caracterização astrocitária de ratos adultos por imunocitoquímica (aumento de 200X). (A) Marcação com anti-S100 β ; (B) Marcação com DAPI; (C) Sobreposição de A e B (Merge); (D) Marcação com Faloidina; (E) Marcação com DAPI; (F) Sobreposição de D e E (Merge); (G) Marcação com anti-AQP4; (H) Marcação com DAPI; (I) Sobreposição de G e H (Merge); (J) Marcação com anti-GLT-1; (K) Marcação com DAPI; (L) Sobreposição de J e K (Merge).



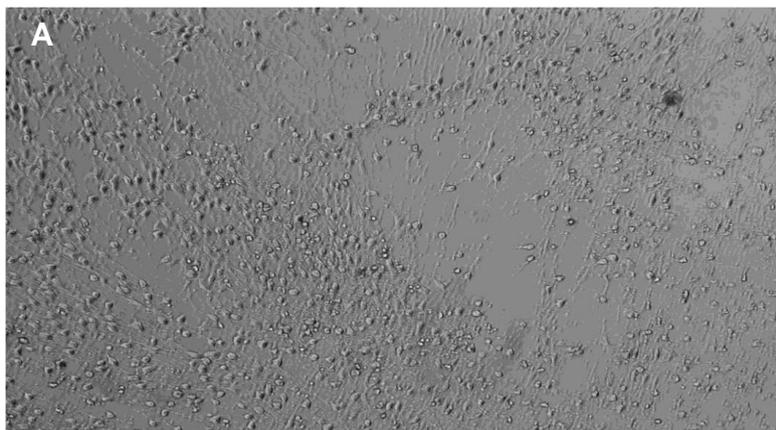


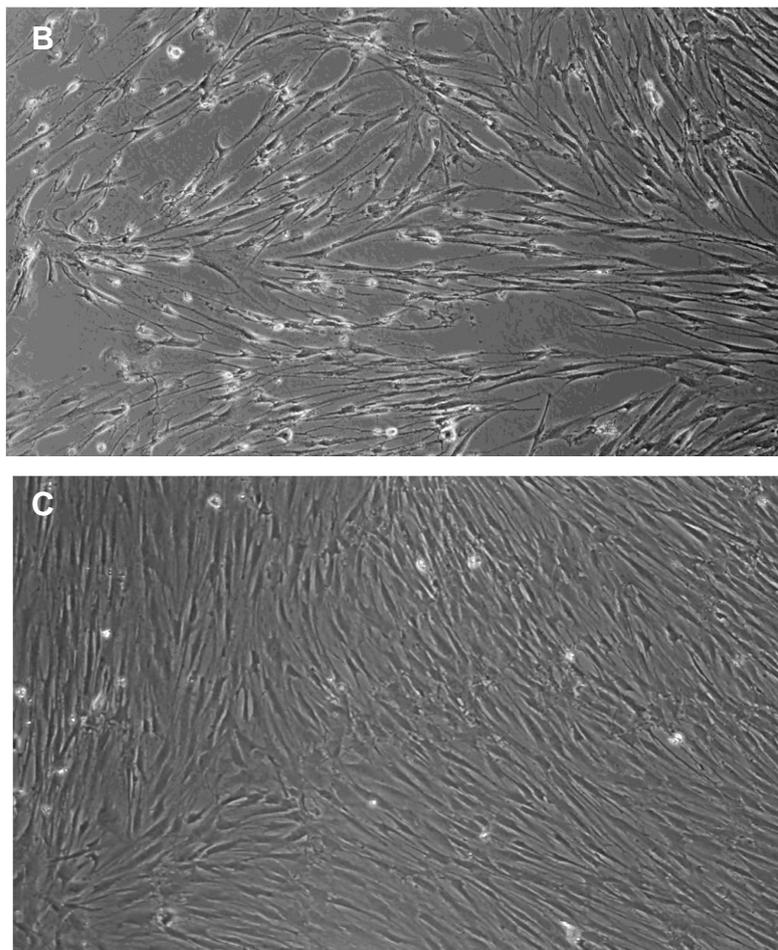


5.4 ALTERAÇÕES NA MORFOLOGIA ASTROCÍTICA NA PRESENÇA DE SORO AQP4+ E IgG PURIFICADA

Após a exposição ao soro AQP4+ e diferentes concentrações de IgG purificada foi possível observar alterações na morfologia dos astrócitos. As células expostas ao soro AQP4+ apresentam uma morfologia disforme, os astrócitos apresentam um corpo celular estreito, prolongamentos reduzidos, além de indícios de morte celular indicado pelas falhas da malha celular presente na figura abaixo. As células expostas a IgG na concentração de 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ também apresentam alterações morfológicas, células com corpo celular estreito e redução dos prolongamentos (Figura 8). Assim, tanto o soro AQP4+ quanto a IgG purificada são deletérios para as células, desencadeando uma alteração visível na morfologia celular quando comparado ao controle.

Figura 8 – Imagens capturadas comparando alterações morfológicas nos astrócitos tratados com soro AQP4+ e IgG purificada em relação ao grupo controle (aumento de 100X). (A) Culturas expostas a soro AQP4+ no período de 24 horas; (B) Culturas expostas a IgG purificada na concentração de 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ no período de 24 horas; (C) Grupo controle sem tratamento.





5.5 VIABILIDADE CELULAR DE ASTRÓCITOS EXPOSTOS AO SORO AQP4+ E IgG PURIFICADA

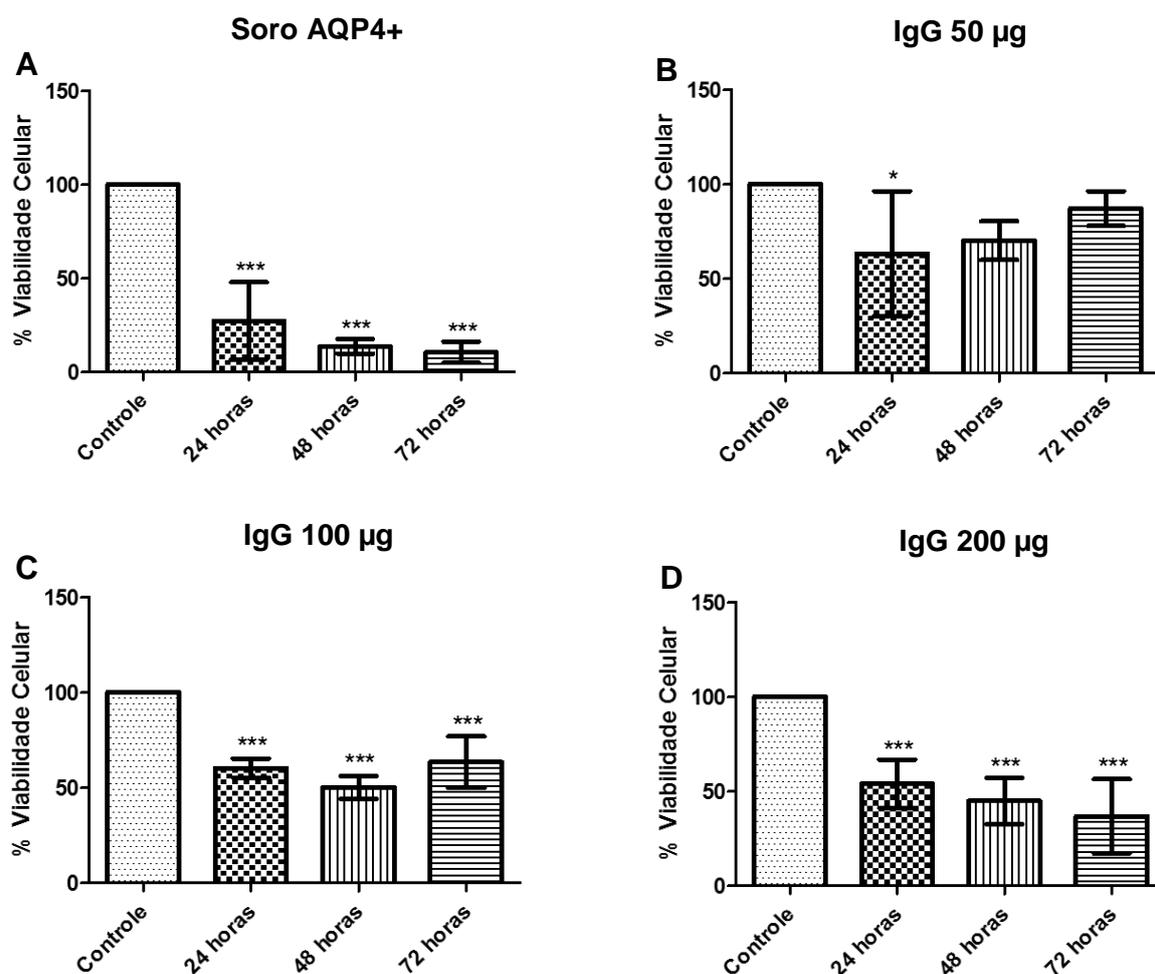
Após a exposição das amostras de soro AQP4+ e de IgG purificada a 50 μg , 100 μg e 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ durante 24, 48 e 72 horas foi realizado o ensaio MTT para avaliar a citotoxicidade das amostras biológicas sobre as células. Os resultados estão representados em porcentagem (Figura 9).

Os astrócitos expostos ao soro AQP4+ apresentaram uma redução expressiva na sua viabilidade de forma decrescente, conforme o tempo de exposição ao soro AQP4+ aumentava. Em 24 horas de exposição os astrócitos apresentaram uma viabilidade de 27,32%, em 48 horas de 13,67% e em 72 horas de 10,58%. Os astrócitos expostos a IgG purificada também apresentaram uma redução na viabilidade, porém em menor grau do que o grupo exposto ao soro AQP4+. Na concentração de 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ as células apresentaram em 24 horas uma viabilidade celular de 63,31%. Porém, no

período de 48 e 72 horas foi visto que a viabilidade celular aumentou para 70,22% e 87,13% respectivamente. Um resultado semelhante foi observado na concentração de 100 µg/ml, em 24 horas a viabilidade celular era de 60,27%, em 48 horas de 50,18%, mas em 72 horas a viabilidade aumentou para 63,45%.

O contrário ocorreu com o grupo celular exposto a IgG em 200 µg/ml. Nesta concentração, assim como no grupo soro AQP4+, os astrócitos apresentaram um declínio gradual na sua viabilidade. Em 24 horas foi de 53,99%, em 48 horas de 44,93% e em 72 horas de 36,80. Assim, doses elevadas de anticorpos podem desencadear danos graves e irreversíveis para astrócitos.

Figura 9 – Histograma representando o percentual de viabilidade celular de astrócitos de ratos adultos tratados com soro AQP4+ e IgG purificada. (A) soro AQP4+, (B) IgG 50 µg/ml, (C) IgG 100 µg/ml e (D) IgG 200 µg/ml.



Os resultados estão apresentados com média \pm e desvio padrão usando como parâmetro comparativo a porcentagem do controle, o qual foi determinado o valor de 100%. *Representa o grau de significância teste ANOVA seguido pelo teste Dunnett's, onde *** $p < 0,0001$ e * $p < 0,05$.

5.6 NÍVEIS DE ABSORÇÃO DE GLUTAMATO DE ASTRÓCITOS NA PRESENÇA DE SORO AQP4+ E IgG PURIFICADA

Após a exposição das culturas ao soro AQP4+ e a IgG purificada em diferentes concentrações, foi realizado o ensaio de captação de glutamato, a fim de avaliar se a exposição dos anticorpos afeta a capacidade dos astrócitos de captar de glutamato, contribuindo para o processo de excitotoxicidade. O teste consistiu avaliar a quantidade em nMols/mg de proteína de glutamato captado pelos astrócitos durante um tempo de incubação de 7 minutos. Os dados apresentados no histograma a seguir estão em porcentagem (Figura 10).

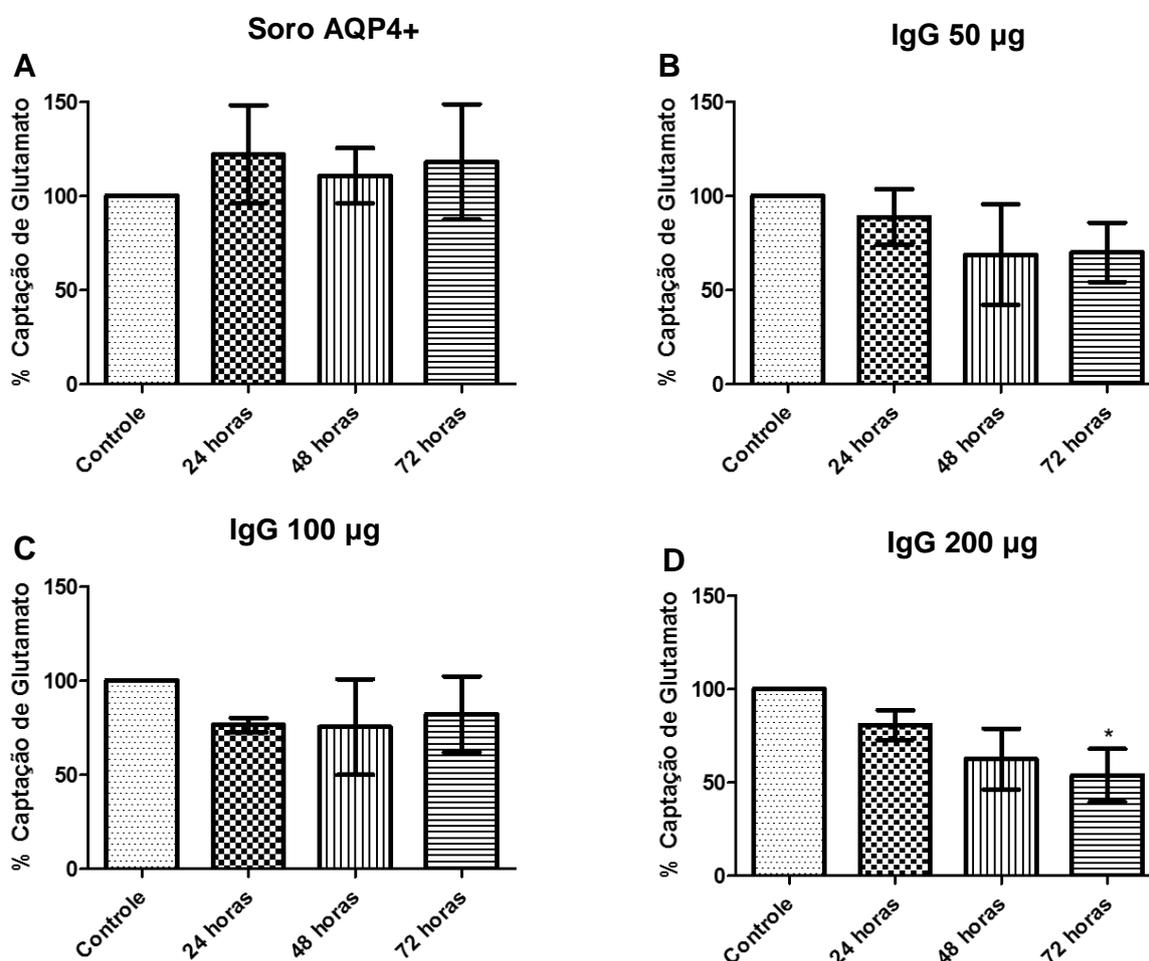
As culturas expostas as amostras de soro AQP4+ e IgG purificada apresentaram dois comportamentos distintos. Nas células expostas ao soro AQP4+ os astrócitos captaram altas quantidades de glutamato, ultrapassando os níveis de captação do grupo controle (100%). Após 24 horas de exposição as células captaram 122,03% de glutamato, em 48 horas 110,73% e em 72 horas 118,10%. Os dados obtidos neste ensaio não corroboram com os dados obtidos no ensaio MTT, esperava-se que células menos viáveis captem pouco glutamato. Acredita-se que o glutamato radioativo que foi exposto as células para execução do teste, tenha ficado retido nos aglomerados celulares que se formam pelo descolamento da malha celular (Figura 11).

Já os astrócitos expostos a IgG purificada mostraram um prejuízo na sua capacidade de captar glutamato. Em 24 horas após a exposição a IgG 50 $\mu\text{g/ml}$ os astrócitos foram capazes de captar 88,86% de glutamato, em 48 horas ocorreu uma queda na captação para 68,87%, porém no período de 72 horas a capacidade das células de captar glutamato começa a aumentar, sendo de 70,03%. Este padrão experimental também ocorreu nos astrócitos exposto a IgG em 100 $\mu\text{g/ml}$. No período de 24 horas as células captaram 76,39% de glutamato, em 48 horas houve uma leve queda na capacidade de captação

para 75,40%. Assim como concentração de 50 $\mu\text{g/ml}$, na IgG 100 $\mu\text{g/ml}$ também ocorreu um aumento na capacidade da célula de reter glutamato para 82,13% no tempo de 72 horas.

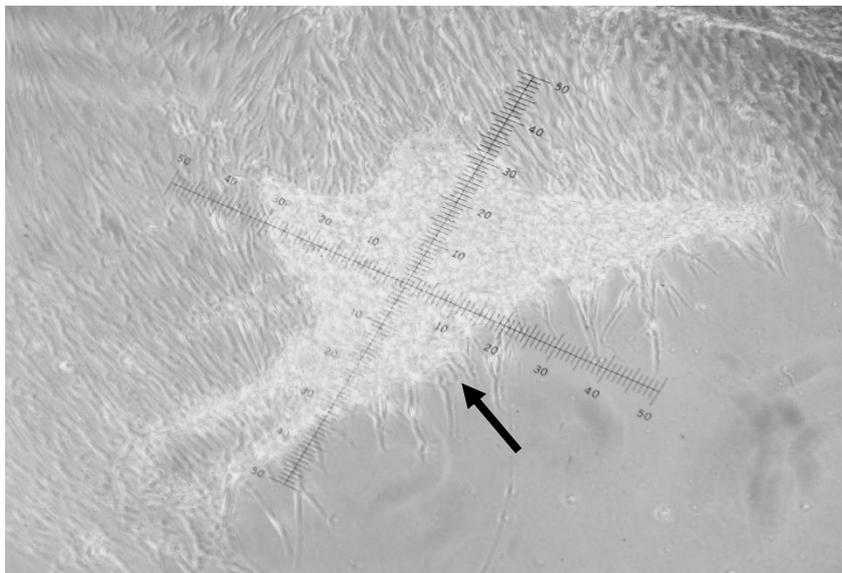
Entretanto, na exposição de IgG a 200 $\mu\text{g/ml}$ os astrócitos apresentaram uma queda gradual na captação de glutamato, conforme o tempo de exposição ao anticorpo aumentava, apresentando um percentual de captação de 80,79% em 24 horas, 62,50% em 48 horas e de 53,75% em 72 horas. A exposição das células a uma dose alta de IgG por um tempo prolongado diminui a capacidade das mesmas de reter glutamato, devido ao fato de que a interação de IgG e AQP4 interfere no desempenho das funções do transportador desta molécula. Os dados da IgG 200 $\mu\text{g/ml}$ corroboram com os resultados do MTT. Concentrações altas de IgG implicam no declínio da viabilidade astrocitária conforme aumenta o tempo de exposição da amostra nas células, reduzindo a capacidade dos astrócitos de metabolizar o glutamato.

Figura 10 – Histograma representando os níveis de captação de glutamato em astrócitos de ratos adultos tratados com soro AQP4+ e IgG purificada. (A) soro AQP4+, (B) IgG 50 $\mu\text{g/ml}$, (C) IgG 100 $\mu\text{g/ml}$ e (D) IgG 200 $\mu\text{g/ml}$.



Os resultados estão apresentados com média \pm e desvio padrão usando como parâmetro comparativo a porcentagem do controle, o qual foi determinado o valor de 100%. *Representa o grau de significância teste ANOVA seguido pelo teste Dunnett's, onde $*p < 0,05$.

Figura 11 – Cultivo celular mostrando um aglomerado de células derivadas de astrócitos de ratos adultos, causado pelo descolamento da malha celular (seta) (aumento de 100X).



5.7 PRODUÇÃO DE EROs POR ASTRÓCITOS EXPOSTOS AO SORO AQP4+ E IgG PURIFICADA

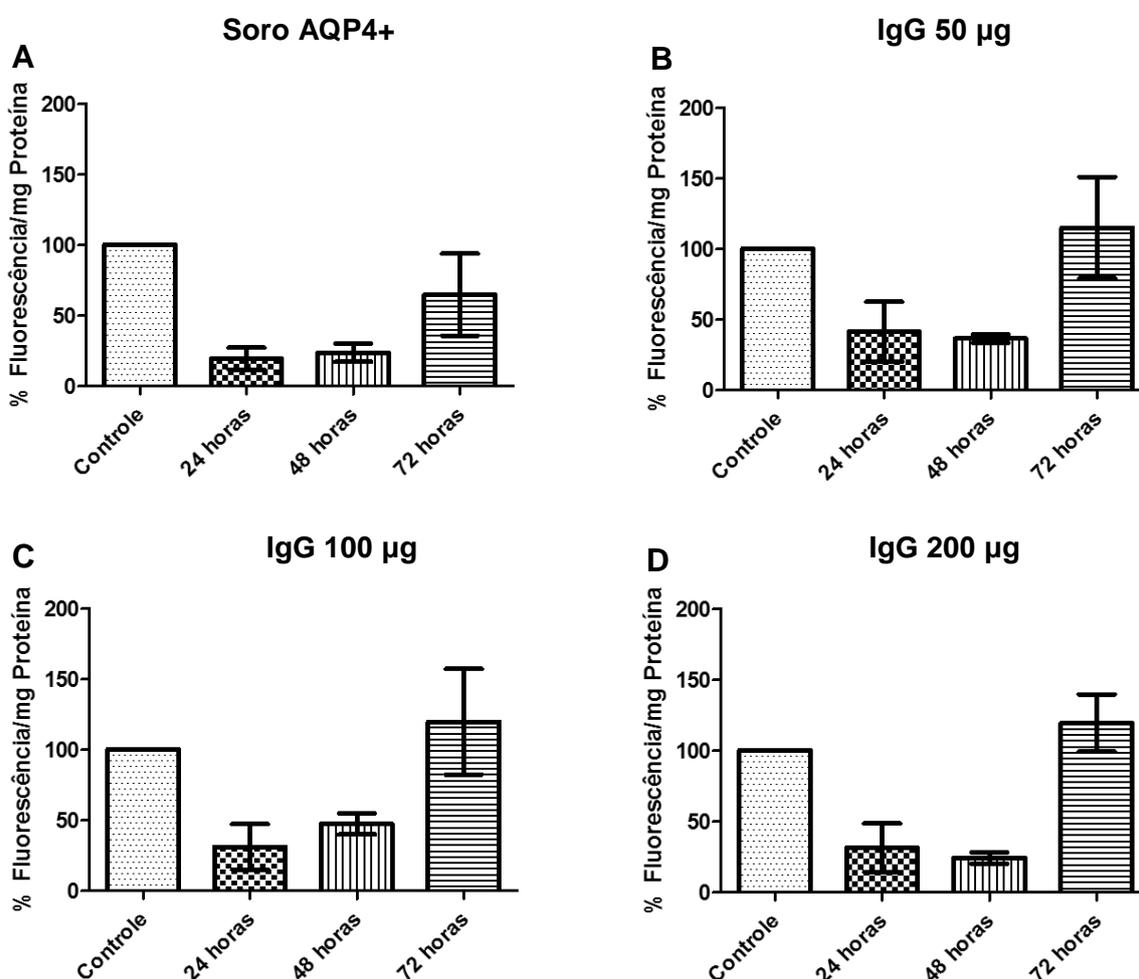
Após a exposição das culturas ao soro AQP4+ e a IgG purificada em diferentes concentrações, foi avaliado pelo o ensaio DCFHDA a produção de EROs após os períodos de 24, 48 e 72 horas de exposição dos tratamentos. O teste DCFHDA avalia a produção de EROs através de fluorescência/mg de proteína produzida pela célula, após um período de incubação de 30 minutos com DCFHDA. Os dados a seguir estão representados em porcentagem (Figura 12).

Foi possível verificar uma baixa intensidade de fluorescência emitida pelos astrócitos expostos ao soro AQP4+, indicando uma baixa produção de EROs. Em 24 horas, a porcentagem de fluorescência foi de 19,45%, em 48 horas de 23,66% e em 72 horas de 64,82%. Entretanto, as células apresentavam um padrão de aumento crescente na emissão de fluorescência, sugerindo que quanto mais tempo o soro AQP4+ fica em contato com as células, mais

oxidantes intracelulares elas produzem. Porém, o nível de oxidantes intracelulares produzidos pelos astrócitos expostos ao soro AQP4+ ficou abaixo do grupo controle (100%), e esperava-se que a porcentagem de fluorescência das células tratadas ultrapassasse o grupo controle (< que 100%). Logo, nossos resultados não foram considerados estatisticamente significativos.

Nas células expostas a IgG purificada foi possível observar resultados diferentes do grupo soro AQP4+. Os astrócitos expostos a concentração de 50 µg/ml, produziram após 24 horas em contato com o anticorpo 41,31% de oxidantes intracelulares, em 48 horas os níveis de EROs reduziram para 36,55% e em 72 horas houve um aumento de EROs para 115,13%. No grupo exposto a IgG em 100 µg/ml, em 24 horas houve uma produção de 31,05% de EROs, em 48 horas de 47,34% e em 72 horas de 119,70%. E na concentração de 200 µg/ml, a produção de EROs foi de 31,38%, 24,32% e 119,49% nos períodos de 24, 48 e 72 horas de exposição ao anticorpo, respectivamente.

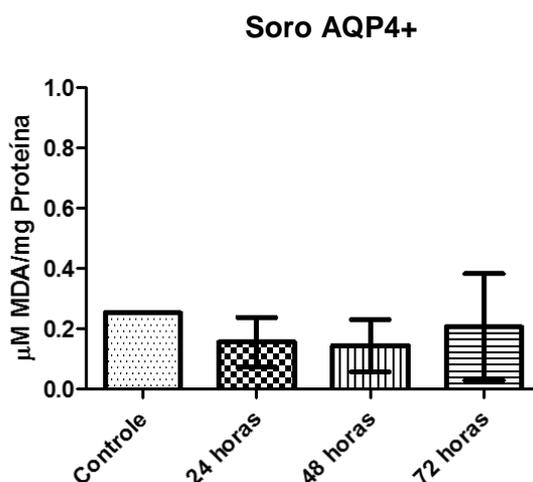
Figura 12 – Histograma representando a porcentagem de EROs produzidos por astrócitos de ratos adultos tratados com soro AQP4+ e IgG purificada. (A) soro AQP4+, (B) IgG 50 µg/ml, (C) IgG 100 µg/ml e (D) IgG 200 µg/ml.



Os resultados estão apresentados com média \pm e desvio padrão usando como parâmetro comparativo a porcentagem do controle, o qual foi determinado o valor de 100%. O valor de p desta análise não foi considerado significativo, assim $p > 0,05$.

Além do teste DCFHDA, realizamos um teste complementar para verificar se este apresentaria um padrão semelhante ao teste com DCFHDA no grupo de células expostas ao soro AQP4+, a fim de identificar se o resultado inesperado do teste era de fato uma consequência da redução de viabilidade celular. Aplicando o teste TBARS para avaliar a produção de MDA (em μM), um subproduto da peroxidação lipídica e indicador de danos em membranas celulares, verificou-se que após 24 horas de exposição ao soro AQP4+ as células produziram $0,155 \mu\text{M}$ de MDA, em 48 horas $0,143 \mu\text{M}$ e em 72 horas $0,205 \mu\text{M}$ (Figura 13). Assim como no teste DCFHDA, no teste TBARS os astrócitos tratados com soro AQP4+ tendem a aumentar a peroxidação lipídica conforme o tempo de exposição do tratamento aumenta. Entretanto, aqui ocorreu o mesmo padrão experimental do primeiro teste, a produção de MDA pelos astrócitos é inferior a do grupo controle ($0,253 \mu\text{M}$) e esperava-se que a produção de MDA ultrapassasse o controle.

Figura 13 – Histograma representando os níveis de peroxidação lipídica em astrócitos de ratos adultos tratados com soro AQP4+. Representação da produção de MDA em $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína após a exposição ao soro AQP4+.



Os resultados estão apresentados com média \pm e desvio padrão usando como parâmetro comparativo o controle em $\mu\text{M}/\text{mg}$, o qual foi determinado o valor de $0,253$. O valor de p desta análise não foi considerado significativo, assim $p > 0,05$.

6 DISCUSSÃO

A NMOSD é uma doença mediada por respostas imune-humorais contra o canal de água AQP4 presente em astrócitos. Ao se ligarem na AQP4, os anticorpos IgG desestabilizam a barreira hematoencefálica promovendo a entrada de células inflamatórias e causando uma lesão astrócitária com perda de AQP4 e GFAP, além de destruir o tecido nervoso. Sabe-se que a IgG é altamente danosa para os astrócitos, pois ao atacar a AQP4 a célula internaliza a proteína e fica incapaz de realizar o balanço hídrico celular, fazendo com que a célula aumente de tamanho, gerando um edema, por conta do excesso de água intracelular (ASAVAPANUMAS et al., 2014; PEREIRA et al., 2015; WEIL et al., 2016; GUO et al., 2017; HÖFTBERGER; LASSMANN, 2018; KAWACHI; LASSMANN, 2017; BRUSCOLINI et al., 2018).

Diversos grupos de pesquisa têm investigado o papel patogênico dos autoanticorpos IgG na NMOSD. Muitos modelos *in vivo* desenvolvidos ao longo dos anos se basearam em conceitos estabelecidos por modelos *in vitro*. Estes modelos pregam que a IgG é altamente específica para interagir com a proteína alvo AQP4, de modo que quando há a ligação do anticorpo ao antígeno o fluxo de líquido é perturbado, prejudicando o funcionamento do que atualmente chamamos de sistema glinfático (YANG, et al., 2016). Na NMOSD cada vez mais se acredita que a IgG é altamente citotóxica para seu alvo, comprometendo a atividade astrocitária principalmente pela ação do complemento. Além do complemento, acredita-se que o neurotransmissor glutamato esteja relacionado com a destruição celular e tecidual na NMOSD, por conta da sua toxicidade em concentrações extracelulares elevadas (YANG et al., 2016).

Os astrócitos têm em sua membrana moléculas importantes responsáveis por regular as sinapses glutamatérgicas, estas moléculas são os transportadores de glutamato, como o EAAT2. Já está bem descrito que os astrócitos são as principais células que regulam os níveis de glutamato extracelular, podendo retirá-lo da fenda sináptica quando está em excesso ou de liberá-lo quando há uma carência do neurotransmissor. Em condições normais, essa manutenção é feita pelo transportador EAAT2 em humanos e GLT-1 em roedores, que depende de um gradiente de concentração,

principalmente de Na⁺. Membranas íntegras com concentrações de íons normais podem reduzir a concentração de glutamato, promovendo uma ligação imediata, em milissegundos, de glutamato aos transportadores. Sabe-se que a AQP4 pode se agregar com outras proteínas de membrana como o EAAT2, por exemplo, logo ela exerce uma ação regulatória sobre o transportador. Por conta disso, acredita-se que o dano na AQP4 causado pela ligação de IgG compromete a função do EAAT2 o que resulta em uma excitotoxicidade prejudicando as células que compõe o SNC (ZENG et al., 2007; FANG et al., 2012; HARIKU et al., 2013; LEWERENZ; MAHER, 2015; YANG, et al., 2016). Este processo, pode gerar a produção de EROs, que contribui para a gravidade das lesões da NMOSD (PENTÓN-ROL et al., 2009; ADIELE; ADIELE, 2017; MATSCHKE et al., 2018).

Neste trabalho, avaliamos a citotoxicidade dos autoanticorpos derivados de pacientes com NMOSD (soro AQP4+/IgG purificada) sobre culturas primárias de astrócitos de ratos adultos, bem como as alterações na morfologia celular astrocitária. Além disso, analisamos a capacidade destas células de captar glutamato após serem expostas as amostras de soro AQP4+ e IgG purificada em diferentes concentrações, e avaliamos a produção de EROs. As análises foram realizadas por meio do ensaio MTT, do ensaio de captação de L-[2,3- ³H] glutamato e dos testes DCFHDA e TBARS, tanto em células expostas às amostras biológicas quanto para o grupo controle.

Os primeiros trabalhos *in vitro* mostraram que os autoanticopos produzidos na NMOSD são altamente específicos e patogênicos, pois além de quebrar a homeostase da barreira hematoencefálica, induzem a internalização do seu antígeno alvo pela célula, impedindo que a proteína consiga executar suas funções. Isto induz uma resposta inflamatória, lesão astrocitária, desmielinização e desequilíbrio da homeostase glutamatérgica (LI; YAN, 2015). Logo, os modelos *in vitro* possibilitaram uma melhor compreensão dos mecanismos celulares envolvidos na patogênese da NMOSD.

Neste estudo utilizamos animais experimentais, para extrair do tecido cerebral dos mesmos, as células de interesse, os astrócitos. Para obtenção das células específicas seguiu-se um protocolo específico para isolamento de

astrócitos de ratos adultos, descrito por Souza e colaboradores (2013). As células obtidas foram mantidas sob condições de temperatura e umidade recomendadas, bem como conservadas em meio de cultivo e suplementação diferenciais. O isolamento celular foi bem-sucedido. As células apresentaram características morfológicas típicas de astrócitos conforme o esperado e visualizado por imunocitoquímica com marcação para S-100 β (proteína que difere neurônios e astrócitos), AQP4 (proteína transmembrana relacionada com o balanço hídrico) e GLT-1 (transportador de glutamato específico de roedores) caracterizando o perfil astrocitário.

As primeiras pesquisas *in vitro* demonstraram que além de causar morte astrocitária em culturas de roedores, os autoanticorpos específicos para AQP4 são citotóxicos e capazes de modular a morfologia e o fenótipo destas células (LI; YAN, 2015). Como observado neste estudo, o soro AQP4+ é altamente prejudicial para culturas primárias de astrócitos de ratos adultos, bem como a IgG purificada em altas concentrações (200 μ g/ml) quando comparado ao controle. No soro AQP4+ não houve inativação do sistema complemento, logo ele se encontrava ativado, sendo bem provável, que por este motivo, o soro AQP4+ seja mais deletério para as células, uma vez que a porcentagem de viabilidade celular diminuiu abruptamente nas culturas de astrócitos expostos ao soro AQP4+ se comparado a exposição com a IgG purificada, onde o complemento está ausente. Nossos dados corroboram com os apresentados por Sabater e colaboradores (2009), em que as células cultivadas também mostraram uma sobrevida astrocitária reduzida.

Astrócitos expostos somente a IgG purificada também mostraram uma redução na viabilidade celular, porém em concentrações baixas, como a de 50 μ g/ml, o declínio da viabilidade celular foi sutil de apenas 36,69% em um período de exposição de 24 horas. Conforme o tempo de exposição aumenta ocorre um aumento na viabilidade celular de 63,31% para 70,22% no período de 48 horas e para 87,13% em 72 horas de exposição. As células expostas a IgG em 100 μ g/ml também apresentam um perfil de viabilidade semelhante, onde no período de 24 horas para 48 horas ocorre um declínio de 60,27% para 50,18%, respectivamente. Porém, em 72 horas também há um aumento na viabilidade celular que passa ser de 63,45%. Aqui podemos observar que em

primeiro momento, os astrócitos sofrem com a exposição da IgG purificada, mas logo se recuperam, sugerindo que doses baixas de IgG não são suficientes para causar um dano massivo nas células, e que de alguma forma elas conseguem se recuperar. Porém, em astrócitos expostos a concentração de 200 µg/ml de IgG observamos um declínio gradual da viabilidade celular conforme o tempo de exposição aumentava, onde nos períodos de 24, 48 e 72 horas a viabilidade foi de 53,99%, 44,93% e de 36,80%, respectivamente.

Com base nos resultados apresentados podemos inferir que o dano astrocitário causado pela citotoxicidade da IgG purificada é dose-dependente, pois concentrações baixas de IgG não causam uma redução abrupta da viabilidade celular. Conforme passa o tempo de exposição, ocorre um aumento da porcentagem de células viáveis, sugerindo que em concentrações baixas os astrócitos ainda conseguem desviar dos efeitos causados pela IgG, talvez desenvolvendo um mecanismo de defesa. O contrário ocorre com a IgG em altas concentrações causando uma perda celular muito pronunciada com o aumento do tempo de exposição. Resumindo, em altas doses de IgG as células são afetadas de tal maneira que não são mais capazes de se defender contra a ação do anticorpo.

Como relatado por Li & Yan (2015) os autoanticorpos específicos alteram a morfologia e o fenótipo de astrócitos. De fato, foi visto que as culturas expostas tanto ao soro AQP4+ quanto a IgG pura sofrem mudanças em sua morfologia. Astrócitos saudáveis da porção cinzenta do cérebro apresentam uma morfologia estrelar-fusiforme, possuem prolongamentos delicados, numerosos e muito ramificados (BEAR; CONNORS; PARADISO, 2008, p. 46; RODNIGHT; GOTTFRIED, 2013; CIAPPELLONIA et al., 2017). Após a exposição ao soro AQP4+ os astrócitos apresentaram uma morfologia disforme com redução no corpo celular e diminuição na quantidade de prolongamentos. Agregado a isto, também há indícios de morte astrocitária pelas falhas presentes na malha celular, não sendo uma malha uniforme, indicando que naquela região existiam células que se desprenderam da placa, possivelmente células mortas. O mesmo ocorre com a IgG purificada, porém os danos celulares têm um grau menor do que causado pelo soro AQP4+. As células mostram alterações no corpo celular, bem como redução de prolongamentos.

Como mostrado no teste de viabilidade celular, as células que mais sofrem são as células submetidas ao soro AQP4+, logo, é esperado que as alterações morfológicas sejam mais pronunciadas nestas culturas do que nas expostas a IgG purificada.

Ao contrário de Haruki e colegas (2013) que menciona que os autoanticorpos isolados de pacientes com NMOSD não são tóxicos para astrócitos de roedores, nós demonstramos que células derivadas de roedores expostas tanto a amostras de soro AQP4+ quanto de IgG purificada são danificadas, apresentando alterações na sua morfologia e redução na viabilidade. Sabe-se que há diferenças entre espécies de roedores e humanos, porém pelo que foi descrito até o momento, os autoanticorpos também interagem com a AQP4+ de células não humanas.

Há alguns anos, levantou-se a hipótese de que astrócitos que possuem a proteína AQP4 ausente ou danificada apresentam uma redução da expressão de transportadores de glutamato, em especial o EAAT2, na membrana plasmática astrocitária, o que pode comprometer a homeostase glutamatérgica. Como este transportador capta cerca de 90% do glutamato da fenda sináptica é fundamental que o EAAT2 se mantenha íntegro na membrana de astrócitos, uma vez que a presença de glutamato extracelular em altas concentrações pode afetar neurônios e oligodendrócitos negativamente contribuindo de forma indireta na patologia da NMOSD (HINSON et al., 2008).

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório cerebral e exerce função em praticamente todas as atividades do SNC. Desde sua descoberta, cientistas tem investigado o seu papel como neurotransmissor e sua ação no metabolismo energético cerebral. Durante a sinapse glutamatérgica, o glutamato é concentrado em vesículas sinápticas, no terminal pré-sináptico, devido à ação dos transportadores de aminoácidos vesiculares. Quando ocorre a despolarização da membrana pré-sináptica, o glutamato é liberado e se liga aos iGluRs da membrana pós-sináptica, desencadeando um potencial excitatório que irá gerar um potencial de ação nos terminais axonais. A sinapse glutamatérgica é monitorada por mecanismos astrocitários, pois nestas células há uma alta expressão de transportadores de glutamato, os EAATs. Até o

momento, cinco transportadores já foram identificados, sendo que os principais transportadores de glutamato de alta afinidade no SNC são, EAAT1 (GLAST), EAAT2 (GLT-1) estando predominantemente expressos em astrócitos e EAAT3 em neurônios (LEWERENZ; MAHER, 2015; HAYASHI, 2018; PÁL, 2018; ROSE et al., 2018; SCHOUSBOE, 2018).

Os transportadores de glutamato fazem com que o neurotransmissor se acumule em astrócitos, permitindo que o cérebro mantenha concentrações baixas de glutamato. Além disso, os astrócitos também fazem a reciclagem do glutamato convertendo-o para glutamina por meio da enzima glutamina sintetase que será transferida para os neurônios, através dos transportadores de aminoácidos neutros ligado a sódio, e convertida em glutamato novamente para ser utilizado na neurotransmissão (LEWERENZ; MAHER, 2015; HAYASHI, 2018; PÁL, 2018). Portanto, qualquer lesão celular que acarrete na perda destes transportadores, principalmente do EAAT2, pode prejudicar a condução do sinal nervoso, bem como levar a uma destruição tecidual por conta de o glutamato, em excesso, ser tóxico para as células que compõe o SNC (LEWERENZ; MAHER, 2015; DANBOLT et al., 2016; HAYASHI, 2018).

Como relatado nesta investigação, as culturas de astrócitos expostas a amostras de soro AQP4+ e IgG purificada de pacientes com NMOSD em concentrações elevadas apresentam uma redução acentuada na viabilidade celular, mas em relação a captação de glutamato, o comportamento celular após a exposição difere entre os tratamentos. No grupo exposto ao soro AQP4+, foi possível observar um aumento na captação de glutamato em todos os tempos de exposição, ultrapassando o grupo controle (100%). Com base nos resultados do teste de viabilidade das células expostas ao soro AQP4+, esperava-se que este grupo celular apresentasse uma menor capacidade de captação de glutamato, visto que são as células menos viáveis conforme mostra o ensaio MTT, porém o resultado obtido aqui foi oposto. Não há uma explicação definida para as células apresentarem uma maior capacidade de captação em relação ao grupo controle, acredita-se que o glutamato radioativo incubado nas células ficou retido nos grupos celulares que são formados pelo descolamento dos astrócitos da placa após a exposição de soro AQP4+. Este aglomerado celular não é observado nas células expostas a IgG purificada nas

diferentes concentrações. Além disso, os resultados do grupo exposto ao soro AQP4+ não exclui a possibilidade de que os anticorpos, ali presentes, terem causado danos no transportador GLT-1. Análises de expressão de proteínas podem ser aplicadas futuramente para identificar a expressão e funcionalidade do GLT-1 após o tratamento com soro AQP4+.

Diferente dos astrócitos expostos ao soro AQP4+, os astrócitos expostos a diferentes concentrações de IgG purificada tiveram uma redução na sua capacidade de captar glutamato. Após a exposição à 50 µg/ml de IgG, as células apresentaram um comportamento oscilante na captação de glutamato, onde em 24 horas estavam com a capacidade elevada, em 48 horas houve uma leve redução e em 72 horas ocorre um aumento no percentual de captação. O mesmo comportamento celular também foi observado nos astrócitos expostos a IgG na concentração de 100 µg/ml. Entretanto, os astrócitos expostos a concentração de 200 µg/ml apresentaram um declínio gradual na capacidade de captação de glutamato entre os três tempos. Esses resultados corroboram com os apresentados no teste de viabilidade celular (MTT). Com base nisto, podemos inferir que além do dano a AQP4, as células expostas a IgG também apresentam um comprometimento no transportador GLT-1, pois estão perdendo a capacidade de capturar o glutamato livre, sugerindo assim, que no processo de desenvolvimento da doença existem outros fatores além da perda da proteína AQP4 e do sistema complemento que desencadeiam o processo de destruição do tecido nervoso e a necrose celular. Este mecanismo é chamado de excitotoxicidade glutamatérgica, proposto por Olney em 1986 (OLNEY, 1986; HARUKI et al. 2013).

Haruki e colaboradores (2013) descreveram que o transportador EAAT2 tem expressão reduzida em linhagens de astrócitos humanos expostos ao soro AQP4+, devido à associação com a regulação negativa pela AQP4, bem como em lesões ativas de NMOSD. Por meio de um ensaio Western blot, ele confirmou-se que houve uma redução na expressão de EAAT2 em astrócitos humanos após o tratamento com soro AQP4+. Zeng e colegas (2007) também mostraram que culturas de astrócitos de roedores knockout para a AQP4 apresentam uma menor expressão de GLT-1. Além disso, a captação de glutamato nas culturas deficientes também foi reduzida, quando comparadas

com astrócitos que expressam AQP4 (ZENG et al., 2007). Porém, em nosso estudo não foi possível confirmar estas evidências, uma vez que o percentual de captação estava elevado nas culturas expostas ao soro AQP4+.

Entretanto, Marignier e colaboradores (2010), postularam que a IgG purificada, derivada de amostras de pacientes com NMOSD, reduz significativamente o número de células positivas para AQP4. Além disso, por meio de citometria de fluxo, mostrou que as células exibem uma redução do transportador de glutamato devido a exposição da IgG purificada e poucas células ainda apresentavam o transportador intacto na sua membrana. Em nosso estudo, foi possível observar que culturas expostas a IgG purificada em concentrações elevadas (200 µg/ml) mostram um declínio gradual na capacidade de captar glutamato, sugerindo que esta molécula fique livre circulante no parênquima cerebral tendo um grande potencial degenerativo. A diminuição dos transportadores de glutamato em astrócitos na NMOSD desencadeia a ruptura da homeostase do glutamatérgica, bem como danos neuronais e em oligodendrócitos, uma vez que estas células são altamente sensíveis a concentrações elevadas de glutamato extracelular (MARIGNIER et al., 2010; HARUKI et al. 2013).

A captação e reciclagem do glutamato realizada pelos astrócitos é acoplada a moléculas de água, portanto a AQP4 parece ser co-expressa com transportadores de glutamato, levantando a hipótese de que há uma relação direta entre AQP4 e os transportadores de glutamato. Conforme mostrou Zeng e colegas (2007) a ausência de AQP4 compromete a captação de glutamato, sugerindo que esta proteína exerce um papel controlador sobre os transportadores. Alguns trabalhos relatam que a exposição do soro AQP4+ em astrócitos induz a internalização da proteína pela célula e que a captação de glutamato é paralela à perda de AQP4, portanto é baixa (HINSON et al., 2008; HINSON et al., 2017). Assim, a AQP4 regula o transportador de glutamato de forma negativa. Em nosso trabalho não avaliamos a expressão da proteína AQP4, nem de GLT-1. Entretanto, os dados obtidos no teste de viabilidade celular (MTT) e na captação de L-[2,3- ³H] glutamato correspondem aos resultados mostrados por outros pesquisadores. Culturas expostas a altas concentrações de IgG (200µg/ml) apresentam uma viabilidade celular reduzida,

bem como uma diminuição na capacidade de absorver o glutamato radioativo. Logo, podemos inferir que quando há um comprometimento nas funções da AQP4, o GLT-1 perde sua funcionalidade, indicando que há uma interação entre o canal de água AQP4 e o transportador GLT-1.

A toxicidade do glutamato frequentemente é associada a doenças neurológicas. Os efeitos citotóxicos em células nervosas são muito prejudiciais, oligodendrócitos, em especial, são altamente sensíveis a concentrações elevadas de glutamato. É sugestivo que a toxicidade do glutamato contribui no processo de desmielinização dos axônios por intermédio a um efeito secundário exercido em oligodendrócitos. Na NMOSD, os oligodendrócitos dos nervos ópticos e da medula espinhal perdem a bainha de mielina, o que pode ser uma consequência do déficit na captação de glutamato pelos astrócitos, pois uma pequena elevação nos níveis de glutamato circulante pode ser crucial para lesionar estas células (HINSON et al., 2008).

A visão sobre o papel dos astrócitos no tecido neural está evoluindo. Por muito tempo estas células foram classificadas como células que apenas dão suporte as demais células do SNC, como os neurônios, que sempre foram o foco de investigações na neurociência básica. Hoje, muitos trabalhos mostram que os astrócitos são tão importantes quanto os neurônios e outras células da glia, especialmente no que diz respeito à sinapse glutamatérgica (ROSE et al., 2018). Estas células regulam a quantidade de glutamato livre nas sinapses neurais. Sem elas, a concentração do neurotransmissor aumentaria exacerbadamente na fenda sináptica, conseqüentemente não haveria a remoção do glutamato em excesso nas sinapses nem a proteção do cérebro contra a excitabilidade excessiva (ROSE et al., 2018). Estudos com animais knockout para o transportador GLT-1 mostram que os animais apresentam anomalias e desorganização cortical, morrendo poucos dias após seu nascimento, devido ao desenvolvimento de quadros convulsivos (DANBOLT et al., 2016; CIAPPELLONIA et al., 2017; ROSE et al., 2018). Isto comprova que qualquer comprometimento das funções do transportador GLT-1 tem uma relevância vital na captação de glutamato pelos astrócitos, desestabilizando a homeostase deste neurotransmissor (ROSE et al., 2018).

Além da excitotoxicidade, o estresse oxidativo, é um processo metabólico que também pode contribuir significativamente para degeneração axonal e desmielinização na NMOSD. O estresse oxidativo é um distúrbio celular que gera a produção de EROs intracelulares. Este processo desempenha um papel importante no que diz respeito ao quadro desmielinizante na NMOSD. O estresse oxidativo pode causar danos lipídicos, proteicos e em ácidos nucleicos das células e em suas mitocôndrias, contribuindo para a morte celular (PENTÓN-ROL et al., 2009).

Nas células do SNC, as mitocôndrias estão em abundância, pois contribuem ativamente para comunicação celular e formação de potenciais de ação. Por este motivo as células nervosas são as que mais produzem EROs. Este processo é inevitável, o produto final de geração de ATP pelas mitocôndrias sempre irá gerar EROs. Qualquer distúrbio cerebral que demande mais trabalho para as mitocôndrias, conseqüentemente irá produzir mais EROs que podem danificar as células do parênquima nervoso (ADIELE; ADIELE, 2017). Sabe-se que disfunções mitocondriais contribuem negativamente em diferentes patologias, incluindo distúrbios autoimunes do SNC devido ao processo inflamatório (ADIELE; ADIELE, 2017; MATSCHKE et al., 2018). Isto ocorre não somente porque as mitocôndrias geram energia para células neuronais e gliais, mas também pela alta produção de EROs, com o metabolismo de esteróides, metabolismo de aminoácidos e ácidos graxos, vias de manipulação de cálcio e apoptose. Portanto, são críticas para a viabilidade de células cerebrais (ADIELE; ADIELE, 2017).

Neste presente trabalho, avaliamos a produção de EROs dos astrócitos após a exposição dos mesmos aos tratamentos com soro AQP4+ e IgG purificada. Para tal avaliação, empregamos dois testes distintos para mensurar a produção de oxidantes intracelulares. O primeiro ensaio realizado foi o teste com DCFHDA, um composto que quando metabolizado pelas células é hidrolisado por oxidantes intracelulares e convertido em um composto fluorescente, o DCF. Através da porcentagem de emissão de fluorescência conseguimos mensurar a quantidade de EROs produzida pela célula. Após os períodos de exposição pré-determinados observamos que as células expostas ao soro AQP4+ apresentaram um padrão crescente na emissão de

fluorescência, indicando a formação de EROs após exposição do tratamento, porém como a depleção astrócitária é exacerbada pela ação do soro AQP4+, nenhum dos resultados dos três tempos (24, 48 e 72 horas) apresentaram valores esperados, que seriam acima da porcentagem de fluorescência/mg de proteína do grupo controle (100%). Apesar da porcentagem de produção de oxidantes estar abaixo do esperado é possível identificar que as células aumentam gradualmente a produção de oxidantes.

Apesar dos dados não apresentarem significância estatística, não podemos interpretar os resultados como negativos, pois o teste com DCFHDA sofreu uma interferência do tratamento com soro AQP4+ exposto aos astrócitos. Para obter um bom desempenho do teste é necessário que as células que são incubadas com DCFHDA estejam minimamente viáveis para metabolizarem o composto e convertê-lo na molécula fluorescente, para que a quantificação de EROs produzida pela célula seja realizada sem interferência. Como o tratamento com o soro AQP4+ é altamente deletério para os astrócitos, tornando uma grande parcela das células inviáveis, como observado pelo ensaio MTT, o DCFHDA foi absorvido somente por uma parcela pequena de células viáveis e como a porcentagem destas células estava entre 27,32 e 10,58%, a quantidade de EROs produzida foi baixa.

Com base nos resultados do teste com DCFHDA, realizamos um ensaio alternativo para verificar a os níveis de peroxidação lipídica dos astrócitos, uma vez que a peroxidação lipídica pode ser desencadeada pela presença de EROs (MATSCHKE et al., 2018). O teste TBARS consiste em avaliar a produção de MDA gerado pela peroxidação lipídica. Sabe-se que os subprodutos da oxidação lipídica podem estar associados com o desenvolvimento de diversas doenças, incluindo as que atingem o SNC (GHANI et al., 2017). Assim, este teste foi escolhido visando verificar se os resultados do teste DCFHDA não foram significativos porque o teste não foi adequadamente realizado, ou devido a quantidade de soro AQP4+ que foi exposto aos astrócitos, ou por consequência de alterações nos processos metabólicos de astrócitos desencadeado após o tratamento.

Após a exposição ao soro AQP4+, verificamos que os astrócitos apresentaram o mesmo padrão experimental do teste com DCFHDA, conforme o tempo de exposição aumentava as células elevavam a sua produção de MDA. Logo, aumentavam a produção de oxidantes. Porém, as células tratadas com soro AQP4+ apresentaram níveis de peroxidação lipídica inferior ao grupo controle, como ocorreu no primeiro teste, indicando que há uma baixa produção de EROs. Com base nisto, acreditamos que o tratamento com soro AQP4+ interferiu no desempenho dos testes DCFHDA e TBARS. Para corrigir este impasse em ambos os testes, é necessário reavaliar a quantidade de amostra de soro AQP4+ exposta aos astrócitos, bem como o tempo de incubação nas células. Talvez com uma quantidade menor de soro AQP4+ e um tempo menor de exposição, seja possível obter um resultado mais satisfatório e significativo.

O comportamento das células expostas a IgG purificada difere das células tratadas com soro AQP4+ em relação ao teste com DCFHDA. Os astrócitos expostos as concentrações de 50 e 200 µg/ml de IgG apresentam um comportamento oscilante na produção de oxidantes intracelulares, onde identificamos um declínio sutil na produção de EROs no período de 24 horas para o de 48 horas, e que após as 72 horas de exposição ao tratamento, as células aumentam abruptamente a produção de EROs. Entretanto, somente as células tratadas com uma concentração de 100 µg/ml de IgG manifestaram um padrão crescente na produção de EROs, conforme aumenta o tempo de exposição, a produção de oxidantes intracelulares também se eleva.

Como relatado nos resultados, nos períodos de 24 e 48 horas de exposição aos tratamentos nas concentrações de 50, 100 e 200 µg/ml, os astrócitos produziram uma porcentagem menor de oxidantes quando comparadas ao grupo controle. Esperávamos que nas diferentes concentrações de IgG houvesse uma produção de EROs maior que o controle em todos os períodos de exposição de modo gradual, conforme o tempo de exposição aumentava, porém isto não ocorreu. Curiosamente, percebemos que após o período de 72 horas de exposição aos tratamentos (50, 100 e 200 µg/ml) as células elevam bruscamente a produção de EROs. Este resultado foi surpreendente, pois esperava-se que as células apresentassem um aumento

crescente na produção de oxidantes. Esses dados nos induzem a pensar que o período de 72 horas possa ser o ápice de produção de EROs pelos astrócitos, após a exposição dos tratamentos.

Alguns estudos mostram que os astrócitos são células menos sensíveis a ação do estresse oxidativo do que oligodendrócitos, por exemplo, devido ao fato de os oligodendrócitos apresentarem uma capacidade menor de defesa contra os oxidantes intracelulares do que os astrócitos (PENTÓN-ROL et al., 2009). Isto pode, em partes, explicar os resultados que obtivemos nos ensaios para avaliar o estresse oxidativo, uma vez que os astrócitos possuem mais defesas contra agentes oxidantes, se tornam mais resistentes aos danos. Além disso, os níveis de ATP em astrócitos são monitorados pelo processo de glicólise, portanto não é produzido ATP em excesso o que mantém os níveis de EROs estáveis.

Sabemos que na NMOSD ocorre um dano astrocitário primário com recrutamento de macrófagos e ativação da microglia conferindo o perfil inflamatório da doença. Como consequência ao dano primário, ocorrem prejuízos aos oligodendrócitos e neurônios pela excitotoxicidade, mas também pela produção de EROs destas células. Por serem mais sensíveis ao estresse oxidativo, os oligodendrócitos morrem devido a oxidação o que irá contribuir para o quadro desmielinizante da NMOSD. Aditivamente, a microglia ativada e o recrutamento de macrófagos também geram grandes quantidades de EROs devido a atividade de enzimas como mieloperoxidase, xantina oxidase e NADPH oxidases que contribuem significativamente para a peroxidação de proteínas, lipídios e DNA (ADIELE; ADIELE, 2017; MATSCHKE et al., 2018). Logo, podemos pensar que os danos causados pelo estresse oxidativo na NMOSD possam ser desencadeados pelos danos secundários aos oligodendrócitos e não pelos danos primários aos astrócitos. Um sistema de co-cultura de astrócitos e oligodendrócitos, por exemplo, poderia confirmar esta hipótese.

Compilando os dados obtidos neste estudo juntamente com os dados da literatura, de fato os autoanticorpos IgG produzidos na NMOSD são deletérios para os astrócitos, pois alteram sua morfologia e interferem na função da

proteína canal de água AQP4. Assim como incapacitam as células na absorção de glutamato, uma molécula que em excesso é altamente citotóxica e possivelmente está relacionada com a fisiopatologia da NMOSD. Além disso, o estresse oxidativo também é atuante nesta doença. Entretanto, a produção de EROs afeta os astrócitos de modo tardio. Nossos resultados sugerem que as lesões astrocíticas características da NMOSD são iniciadas através da ligação de IgG a AQP4 e pela ativação do sistema complemento. Esses eventos resultam em uma regulação negativa do transportador GLT-1, o principal transportador glutamatérgico, e na produção de oxidantes intracelulares. Logo, estes dois processos podem interferir negativamente no tamanho e extensão das lesões de mielite longitudinalmente extensa e de neurite óptica observadas em pacientes com NMOSD por consequência de um dano astrocítico primário que secundariamente causará danos em oligodendrócitos e neurônios.

7 CONCLUSÕES

Dentre as doenças neuroimunológicas que acometem o SNC, o Distúrbio do Espectro da Neuromielite Óptica é uma das patologias que ainda carece de informações referente a sua fisiopatologia, principalmente ao nível celular, molecular e bioquímico. A descoberta de um autoanticorpo para um alvo celular específico, nos proporcionou investigar quais são os mecanismos atuantes nesta doença, e quando se tratando de SNC sabemos que não são poucos e simples, e sim numerosos e complexos. Neste trabalho, procuramos estabelecer um modelo *in vitro* de NMOSD utilizando astrócitos derivados de ratos adultos, expostos a amostras de soro AQP4+ e IgG purificada derivadas de pacientes doentes para avaliar as alterações causadas pelos autoanticorpos a nível celular, molecular e bioquímico.

Com base nos dados apresentados neste estudo, podemos concluir que:

1. O modelo *in vitro* utilizando astrócitos derivados do córtex de ratos adultos, expostos a amostras de soro AQP4+ e IgG purificada em diferentes concentrações foi exitoso, desde a execução da cultura celular, até o estabelecimento do perfil inflamatório e citotóxico observado na NMOSD.
2. Os autoanticorpos produzidos na NMOSD são altamente deletérios para os astrócitos, tanto associados com o complemento, como é o caso do soro AQP4+, quanto do anticorpo isolado, como a IgG purificada. Mostramos que os autoanticorpos são capazes de induzir citotoxicidade em culturas primárias de astrócitos de ratos adultos, e que culturas expostas ao soro AQP4+ são as mais prejudicadas em relação à viabilidade celular quando comparadas com a IgG purificada, devido a presença do sistema complemento ativado.
3. O anticorpo isolado (IgG purificada) com complemento ausente também causa danos para as células, porém em menor grau. Assim, demonstramos que o anticorpo isolado também tem ação deletéria sozinho, sem a presença de complemento, principalmente quando está em altas concentrações. Isto nos indica que o dano astrocitário é dose-dependente, quanto maior a concentração, piores são os danos.

4. A exposição tanto do soro AQP4+ quanto da IgG purificada em altas concentrações causaram alterações morfológicas e fenotípicas nos astrócitos, tornando-os células disformes, com corpo celular estreito, prolongamentos reduzidos com pouca ramificação.
5. A ação dos autoanticorpos também prejudica a captação de glutamato pelos astrócitos, principalmente em culturas expostas a altas concentrações do anticorpo. Isso provavelmente pode ser explicado pelo fato de que a AQP4 forma complexos com o transportador GLT-1 exercendo uma regulação negativa do transportador.
6. Observamos que o estresse oxidativo também pode ser um fator que contribui negativamente na fisiopatologia da NMOSD, através da produção de EROs. Este processo provoca danos em astrócitos expostos por um período prolongado aos anticorpos. Consequentemente, isso causa a morte de células nervosas adjacentes aos astrócitos como oligodendrócitos e neurônios.
7. A citotoxicidade provocada pelos autoanticorpos, bem como a excitotoxicidade glutamatérgica e o estresse oxidativo são fatores que contribuem diretamente na extensão das lesões características de NMOSD.

Desde a descoberta dos autoanticorpos específicos para a AQP4 muitos pesquisadores investigam a fisiopatologia da NMOSD, utilizando principalmente modelos *in vivo*. No entanto, estes modelos dificultam a identificação de alterações celulares e rotas bioquímicas que podem ocorrer nesta doença, essas características podem ser evidenciadas utilizando os modelos *in vitro*. Acreditamos que os dados apresentados possam contribuir para o desenvolvimento de pesquisas futuras sobre a influência da excitotoxicidade glutamatérgica e do estresse oxidativo na patogênese da NMOSD.

8 PERSPECTIVAS

Futuramente pretende-se complementar este estudo avaliando se astrócitos expostos aos autoanticorpos também apresentam a capacidade de captar de glicose dependente de glutamato alterada, uma vez que um prejuízo na captação de glutamato pode desencadear redução na captação de glicose pela célula. Determinar a atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH), bem como aprimorar análises de identificação de EROs, visto que deficiência de glicose pode aumentar a produção de oxidantes intracelulares. Realizar análises do metabolismo do cálcio, pois a excitotoxicidade glutamatérgica está fortemente relacionada ao alto influxo de íons de Ca_2^+ intracelular e com a morte de células nervosas. Além de analisar a expressão de proteínas como AQP4, GFAP, GLT-1 e S100 β por meio de Western Blot ou PCR em tempo real nas culturas expostas ao soro AQP4+ e IgG purificada. Estes ensaios complementaríamos os resultados apresentados neste trabalho. Com o intuito de identificar e compreender os danos causados pelo excesso de glutamato em astrócitos e em demais células do SNC, poderíamos utilizar um sistema de culturas de células mistas contendo neurônios e oligodendrócitos, para avaliar lesões secundárias aos astrócitos causadas pelo excesso de glutamato extracelular. Além disso, poderíamos utilizar organoides cerebrais, também conhecidos como “mini-brains” desenvolvidos *in vitro*, para avaliar os efeitos da exposição do soro AQP4+ e IgG purificada, do processo de excitotoxicidade glutamatérgica e ações do estresse oxidativo, em miniestruturas cerebrais, bem como a expressão de genes e proteínas que podem estar relacionadas com a patogênese da NMOSD. Compreendendo melhor os aspectos fisiopatológicos da NMOSD, no que diz respeito à excitotoxicidade e estresse oxidativo, abriremos as portas para investigações e desenvolvimento de novas drogas neuroprotetoras para o tratamento desta patologia, evitando uma piora no quadro clínico dos pacientes com NMOSD, principalmente no que diz respeito a extensão das lesões de mielite longitudinalmente extensa e neurite óptica.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADIELE, R. C.; ADIELE C. A. Metabolic defects in multiple sclerosis. **Mitochondrion**, p. 1-8, Dec. 2017.
- AKHA, A. A. S. Aging and the immune system: An overview. **Journal of Immunological Methods**, v. 463, p. 21-26, Dec. 2018.
- ALLEN, N. J.; BARRES, B. A. Glia — more than just brain glue. **Nature**, v. 457, p. 675-677, Feb. 2009.
- ALVARENGA, M. P.; SCHIMIDT, S.; ALVARENGA, R. P. Epidemiology of neuromyelitis optica in Latin America. **Multiple Sclerosis Journal - Experimental, Translational and Clinical**, v. 3, n. 3, p. 1-8, Sep. 2017.
- ASAVAPANUMAS, N.; RATELADE, J.; VERKMAN, A. S. Unique neuromyelitis optica pathology produced in naïve rats by intracerebral administration of NMO-IgG. **Acta Neuropathologica**, v. 127, n. 4, p.539-551, Apr. 2014.
- BAGHBANIAN, S. M. et al. A comparison of pediatric and adult neuromyelitis optica spectrum disorders: A review of clinical manifestation, diagnosis, and treatment. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 388, p. 222-231, May. 2018.
- BARTON, M. J. et al. The Glia Response after Peripheral Nerve Injury: A Comparison between Schwann Cells and Olfactory Ensheathing Cells and Their Uses for Neural Regenerative Therapies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 2, p. 1-19, Jan. 2017.
- BEAR, M. F.; CONNORS, B. W.; PARADISO, M. A. **Neurociências**. 3ª Edição. Porto Alegre: Editora ARTMED S.A., 2018. 857 p.
- BRADL, M. et al. Neuromyelitis Optica: Pathogenicity of Patient Immunoglobulin In Vivo. **American Neurological Association**, v. 66. n. 5, p. 630-643, Jul. 2009.
- BRADL, M; LASSMANN, H. Experimental Models of Neuromyelitis Optica. **Brain Pathology**, v. 24, n. 1, p. 74-82, Dec. 2014.
- BRUSCOLINI, A. et al. Diagnosis and management of neuromyelitis optica spectrum disorders - An update. **Autoimmunity Reviews**, v. 17, n. 3, p. 195-200, Mar. 2018.
- CASSERLY, C. S. et al. Neutrophil perversion in demyelinating autoimmune diseases: Mechanisms to medicine. **Autoimmunity Reviews**, v. 16, n. 18, p. 294-307, Mar. 2017.
- CASTELO-BRANCO, C.; SOVERAL, I. The immune system and aging: a review. **Gynecological Endocrinology**, v. 30, n. 1, p. 16-22, Jan. 2014.
- CIAPPELLONI, S. et al. Dynamics of surface neurotransmitter receptors and transporters in glial cells: Single molecule insights. **Cell Calcium**, v. 67, p. 46-52, Nov. 2017.

- CRAWFORD, D. C. et al. Astrocyte-derived thrombospondins mediate the development of hippocampal presynaptic plasticity *in vitro*. **Journal of Neuroscience**, v. 32, n. 38, p. 13100-13110, Sep. 2012.
- DANBOLT, N. C.; FURNESS, D. N.; ZHOU, Y. Neuronal vs glial glutamate uptake: Resolving the conundrum. **Neurochemistry International**, v. 98, p. 29-45, Sep. 2016.
- DAVOUDI, V. et al. Immunology of neuromyelitis optica during pregnancy. **Neurology: Neuroimmunology & Neuroinflammation**, v. 3, n. 6, p. 1-11, Dec. 2016.
- DOMINGUES, H. S. et al. Oligodendrocyte, Astrocyte, and Microglia Crosstalk in Myelin Development, Damage, and Repair. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 4, n. 71, p. 1-16, Jun. 2016.
- DOSSI, E.; VASILE, F.; ROUACH, N. Human astrocytes in the diseased brain. **Brain Research Bulletin**, v. 136, p. 139-156, Jan. 2018.
- FANG, J. et al. The chemokine, macrophage inflammatory protein-2 γ , reduces the expression of glutamate transporter-1 on astrocytes and increases neuronal sensitivity to glutamate excitotoxicity. **Journal of Neuroinflammation**. v. 9, p. 267, p. 1-12, Dec. 2012.
- FLANAGAN, E. P.; WEINSHENKER, B. G. Neuromyelitis Optica Spectrum Disorders. **Current Neurology and Neuroscience Reports**, v. 14, n. 9, p. 1-12, Sep. 2014.
- FOUGÈRE, B. et al. Chronic Inflammation: Accelerator of Biological Aging. **Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 72, n. 9, p. 1218-1225, Sep. 2017.
- GHANI, M. A. et al. Measurement of antioxidant activity with the thiobarbituric acid reactive substances assay. **Food Chemistry**, v. 230, p. 195-207, Sep. 2017.
- GUO, Y. et al. Pathogenic implications of cerebrospinal fluid barrier pathology in neuromyelitis optica. **Acta Neuropathologica**, v. 133, n. 4, p. 597-612, Apr. 2017.
- HARUKI, H. et al. NMO sera down-regulate AQP4 in human astrocyte and induce cytotoxicity independent of complement. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 331, n. 1-2, p. 136-144, Aug. 2013.
- HAYASHI, M. K. Structure-Function Relationship of Transporters in the Glutamate-Glutamine Cycle of the Central Nervous System. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 1177, p. 1-18, Apr. 2018.
- HERTZ, L.; PENG, L.; LAI, J.C. Functional studies in cultured astrocytes. **Methods**, v. 16, n. 3, p. 293-310, Nov. 1998.
- HINSON, S. R. et al. Aquaporin-4-binding autoantibodies in patients with neuromyelitis optica impair glutamate transport by down-regulating EAAT2. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 205, n. 11, p. 2473-2481, Oct. 2008.

HINSON, S. R. et al. Autoantibody-induced internalization of CNS AQP4 water channel and EAAT2 glutamate transporter requires astrocytic Fc receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 21, p. 5491-5496, May. 2017.

HÖFTBERGER, R.; LASSMANN, H. Inflammatory demyelinating diseases of the central nervous system. **Handbook of Clinical Neurology**, v. 145, p. 263-283, 2018.

HUBBARD, J. A.; SZU, J. I.; BINDER, D. K. The role of aquaporin-4 in synaptic plasticity, memory and disease. **Brain Research Bulletin**, p. 1-12, Mar. 2017.

IACOVETTA, C.; RUDLOFF, E.; KIRBY, R. The role of aquaporin 4 in the brain. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 41, n. 1, p. 32-44, Mar. 2012.

IKESHIMA-KATAOKA, H. Neuroimmunological Implications of AQP4 in Astrocytes. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 8, p. 1-16, Aug. 2016.

JARIUS, S.; WILDEMANN, B.; PAUL, F. Neuromyelitis optica: clinical features, immunopathogenesis and treatment. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 176, n. 2, p. 149-164, May. 2014.

KANDEL, E.R. et al. **Princípios de Neurociências**. 5ª Edição. Porto Alegre: AMGH Editora LTDA, 2014. 1496p.

KAWACHI, I.; LASSMANN, H. Neurodegeneration in multiple sclerosis and neuromyelitis optica. **Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry**, v. 88, p. 137-145, Mar. 2017.

KUROSAWA, K. et al. Severely exacerbated neuromyelitis optica rat model with extensive astrocytopathy by high affinity anti-aquaporin-4 monoclonal antibody. **Acta Neuropathologica Communications**, v. 3, n. 82, p. 1-15, Dec. 2015.

LANGE, S.C. et al. Primary cultures of astrocytes: their value in understanding astrocytes in health and disease. **Neurochemical Research**, v. 37, n. 11, p. 2569-2588, Nov. 2012.

LEWERENZ, J.; MAHER, P. Chronic Glutamate Toxicity in Neurodegenerative Diseases—What is the Evidence?. **Frontiers in Neuroscience**, v. 9, n. 469, p. 1-20, Dec. 2015.

LI, M.; YAN, Y. Experimental models of neuromyelitis optica: current status, challenges and future directions. **Neuroscience Bulletin**, v. 31, n. 6, p. 735-744, Dec. 2015.

LUDWIG, R. J. et al. Mechanisms of Autoantibody-Induced Pathology. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. 603, p. 1-42, May. 2017.

MARIGNIER, R. et al. Oligodendrocytes are damaged by neuromyelitis optica immunoglobulin G via astrocyte injury. *Brain*, v. 133, p. 2578-2591, Sep. 2010.

MATSCHKE, V.; THEISS, C.; MATSCHKE, J. Oxidative stress: the lowest common denominator of multiple diseases. **Neural Regeneration Research**, v. 14, n. 2, p. 238-241, Feb. 2018.

MINATO, N. T Cell Senescence and Autoimmunity. **Innovative Medicine**, p. 119-128, Jan. 2015.

NAGELHUS, E. A.; OTTERSEN, O. P. Physiological roles of aquaporin-4 in brain. **Physiological Reviews**, v. 93, n. 4, p. 1543-1562, Oct. 2013.

NAKADA, T. The Molecular Mechanisms of Neural Flow Coupling: A New Concept. **Journal of Neuroimaging**, v. 25, n. 6, p. 861-865, Dec. 2015.

OBERHEIM, N. A. et al. Uniquely hominid features of adult human astrocytes. **Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 10, p. 3276-3287, Mar. 2009.

OHL, K.; TENBROCK, K.; KIPP, M. Oxidative stress in multiple sclerosis: Central and peripheral mode of action. **Experimental Neurology**, v. 277, p. 58-67, Mar. 2016.

OLNEY, J. W. Inciting excitotoxic cytocide among central neurons. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, 1986.

PÁL, B. Involvement of extrasynaptic glutamate in physiological and pathophysiological changes of neuronal excitability. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 75, p. 2917-2949, May. 2015.

PAPADOPOULOS, M. C.; VERKMAN, A. S. Aquaporin water channels in the nervous system. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 14, n. 4, p. 265-277, Apr. 2013.

PATTERSON, S. L.; GOGLIN, S. E. Neuromyelitis Optica. **Rheumatic Disease Clinics of North America**, v. 43, n. 4, p. 579-591, Nov. 2017.

PENTÓN-ROL, G. et al. TNF-alpha and IL-10 downregulation and marked oxidative stress in Neuromyelitis Optica. **Journal of Inflammation**, v. 6, n. 18, p. 1-9, Jun. 2009.

PEREIRA, W. L.C.J. Epidemiological, clinical, and immunological characteristics of neuromyelitis optica: A review. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 355, n. (1-2), p. 7-17, Aug. 2015.

RAY, D.; YUNG, R. Immune senescence, epigenetics and autoimmunity. **Clinical Immunology**, v. 196, p. 59-63, Nov. 2018.

RODNIGHT, R. B.; GOTTFRIED, C. Morphological plasticity of rodent astroglia. **Journal of Neurochemistry**, v. 124, n. 3, p. 263-275, Feb. 2013.

ROSE, C. R. et al. Astroglial Glutamate Signaling and Uptake in the Hippocampus. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 10, n. 451, p. 1-20, Jan. 2018.

SABATER, L. et al. Cytotoxic effect of neuromyelitis optica antibody (NMO-IgG) to astrocytes: an in vitro study. **Journal of Neuroimmunology**, v. 215, n. 1-2, p. 31-35, Oct. 2009.

SATO, D.K. et al. Treatment of neuromyelitis optica: an evidence based review. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 70, n. 01, p. 59-66, Jan. 2012.

SATO, D.K. et al. Aquaporin-4 antibody-positive cases beyond current diagnostic criteria for NMO spectrum disorders. **Neurology**, v. 80, n. 24, p. 2210-2216, Jun. 2013.

SCHOUSBOE, A. Metabolic signaling in the brain and the role of astrocytes in control of glutamate and GABA neurotransmission. **Neuroscience Letters**, p. 1-3, Feb. 2018.

SILVA, A.P.B. et al. Role of Glutamatergic Excitotoxicity in Neuromyelitis Optica Spectrum Disorders. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 13, n. 142, p. 1-10, Apr. 2019.

SIMON, A.K.; HOLLANDER, G.A.; MCMICHAEL, A. Evolution of the immune system in humans from infancy to old age. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 282, n. 1821, p. 1-9, Dec. 2015.

SOUZA, D. G. et al. Characterization of adult rat astrocyte cultures. **Plos One**, v. 8, n. 3, p. 1-10, Mar. 2013.

SRISUPA-OLAN, T. et al. Beneficial effect of plasma exchange in acute attack of neuromyelitis optica spectrum disorders. **Multiple Sclerosis and Related Disorders**, v. 20, p. 115-121, Feb. 2018.

TORRES, K.C.L. et al. Imunossenescência. **Geriatrics & Gerontologia**, v. 5, n. 3, p. 163-169, Out. 2011.

VASILE, F.; DOSSI, E.; ROUACH, N. Human astrocytes: structure and functions in the healthy brain. **Brain Structure and Function**, v. 222, n. 5, p. 2017-2029, Jul. 2017.

VENTURA, M.T. et al. Immunosenescence in aging: between immune cells depletion and cytokines up-regulation. **Clinical and Molecular Allergy**, v. 15, n. 21, p. 1-8, Dec. 2017.

VERKMAN, A. S. et al. Biology of AQP4 and anti-AQP4 antibody: therapeutic implications for NMO. **Brain Pathology**, v. 23, n. 6, p. 684-695, Nov. 2013.

VERKMAN, A. S. et al. The aquaporin-4 water channel as a potential drug target in neurological disorders. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 21, n. 12, p. 1161-1170, Dec. 2017.

WATAD, A. et al. Autoimmunity in the Elderly: Insights from Basic Science and Clinics - A Mini-Review. **Gerontology**, v. 63, n. 6, p. 515-523, Jul. 2017.

WEIL, M. et al. Loss of Myelin Basic Protein Function Triggers Myelin Breakdown in Models of Demyelinating Diseases. **Cell Reports**, v. 16, n. 2, p. 341-322, Jul. 2016.

WEYAND, C. M.; GORONZY, J. J. Aging of the Immune System. Mechanisms and Therapeutic Targets. *Annals of the American Thoracic Society*, v. 13, n. 5, p. 422-428, Dec. 2016.

WU, Y.; ZHONG, L.; GENG, J. Neuromyelitis optica spectrum disorder: Pathogenesis, treatment, and experimental models. **Multiple Sclerosis and Related Disorders**, v. 27, p. 412-418, Jan. 2019.

YANG, X.; RANSOM, B. R.; MA, J. F. The role of AQP4 in neuromyelitis optica: More answers, more questions. **Journal of Neuroimmunology**, v. 298, p. 63-70, Sep. 2016.

YANG, Y. et al. Comparison of efficacy and tolerability of azathioprine, mycophenolate mofetil, and lower dosages of rituximab among patients with neuromyelitis optica spectrum disorder. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 385, p. 192-197, Feb. 2018.

ZEKERIDOU, A.; LENNON, V. A. Aquaporin-4 autoimmunity. **Neurology: Neuroimmunology & Neuroinflammation**, v. 2, n. 4, p. 1-10, Aug. 2015.

ZENG, X. N. et al. Aquaporin-4 deficiency down-regulates glutamate uptake and GLT-1 expression in astrocytes. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 34, n. 1, p. 34-39, Jan. 2007.

ZHOU, L. et al. MOG-antibody associated demyelinating disease of the CNS: A clinical and pathological study in Chinese Han patients. **Journal of Neuroimmunology**, v. 305, p. 19-28, Apr. 2017.

10 APÊNDICES

10.1 APÊNICE A – Cronograma

Atividades	2017/1	2017/2	2018/1	2018/2	2019/1
Revisão Bibliográfica	X	X	X	X	
Elaboração do Projeto	X				
Submissão para o CC e CEUA		X			
Preparação de anticorpos e soro		X			
Cultivo Celular			X	X	
Execução do Modelo <i>in vitro</i>			X	X	
Avaliação da Viabilidade Celular			X	X	
Avaliação de Excitotoxicidade			X	X	
Avaliação de Estresse Oxidativo				X	
Análise dos Resultados			X	X	
Artigo Submetido para Defesa				X	
Defesa de Mestrado					X
Submissão do Artigo do Mestrado					X

ANEXOS

ANEXO 1 – APROVAÇÃO PELA COMISSÃO CIENTÍFICA DO INSTITUTO DE GERIATRIA E GERONTOLOGIA



SIPESQ
Sistema de Pesquisas da PUCRS

Código SIPESQ: 8139

Porto Alegre, 6 de setembro de 2017.

Prezado(a) Pesquisador(a),

A Comissão Científica do INSTITUTO DE GERIATRIA E GERONTOLOGIA da PUCRS apreciou e aprovou o Projeto de Pesquisa "DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO EXPERIMENTAL DE NEUROMIELITE ÓPTICA". Este projeto necessita da apreciação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA). Toda a documentação anexa deve ser idêntica à documentação enviada ao CEUA, juntamente com o Documento Unificado gerado pelo SIPESQ.

Atenciosamente,

Comissão Científica do INSTITUTO DE GERIATRIA E GERONTOLOGIA

ANEXO 2 – APROVAÇÃO PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



SIPESQ Sistema de Pesquisas da PUCRS

Código SIPESQ: 8139

Porto Alegre, 26 de janeiro de 2018

Prezado(a) Pesquisador(a),

A Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCRS apreciou e aprovou o Projeto de Pesquisa "DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO EXPERIMENTAL DE NEUROMIELITE ÓPTICA" coordenado por DENISE CANTARELLI MACHADO.

Sua investigação, respeitando com detalhe as descrições contidas no projeto e formulários avaliados pela CEUA, está autorizada a partir da presente data.

Informamos que é necessário o encaminhamento de relatório final quando finalizar esta investigação. Adicionalmente, ressaltamos que conforme previsto na Lei no. 11.794, de 08 de outubro de 2008 (Lei Arouca), que regulamenta os procedimentos para o uso científico de animais, é função da CEUA zelar pelo cumprimento dos procedimentos informados, realizando inspeções periódicas nos locais de pesquisa.

Duração do Projeto: 26/01/2018 - 26/03/2018

Nº de Animais	Espécie
34	Rattus norvegicus
Total de Animais: 34	

Atenciosamente,

Comissão de Ética no Uso de Animais(CEUA)

ANEXO 3 – ARTIGO CIENTÍFICO SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO EM REVISTA INDEXADA

Role of Glutamatergic Excitotoxicity in Neuromyelitis Optica Spectrum Disorders

Ana Paula Bornes da Silva^{1,2}, Débora Guerini Souza³, Diogo Onofre Gomes de Souza³, Denise Cantarelli Machado^{1,2}, Douglas Kazutoshi Sato^{1*}.

¹Molecular and Cellular Biology Laboratory, Brain Institute, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS, Brazil.

²Medical School, Institute of Geriatrics and Gerontology, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS, Brazil.

³Graduate Program in Biological Sciences: Biochemistry, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil.

***Correspondence:**

Douglas Kazutoshi Sato

douglas.sato@pucrs.br

Address:

Molecular and Cellular Biology Laboratory, Brain Institute, PUCRS Building 60 – 2nd floor, Av. Ipiranga 6690, Porto Alegre – Rio Grande do Sul – Brazil, Zip code 90610-000.

Keywords: Neuromyelitis optica spectrum disorders, Aquaporin-4, Antibody, Astrocytes, Glutamate, Excitotoxicity.

Abstract

Neuromyelitis optica spectrum disorder (NMOSD) is an inflammatory disorder mediated by immune-humoral responses directed against central nervous system (CNS) antigens. Most patients are positive for specific IgG auto-antibodies for aquaporin-4 (AQP4), a water channel present in astrocytes. Antigen-antibody binding promotes complement system cascade activation, immune system cell infiltration, IgG deposition, loss of AQP4 and excitatory amino acid transporter 2 (EAAT2) expression on the astrocytic plasma membrane, triggering necrotic destruction of spinal cord tissue and optic nerves. Astrocytes are very important cells in the CNS and, in addition to supporting other nerve cells, they also regulate cerebral homeostasis and control glutamatergic synapses by modulating neurotransmission in the cleft through the high-affinity glutamate transporters present in their cell membrane. Specific IgG binding to AQP4 in astrocytes blocks protein functions and reduces EAAT2 activity. Once compromised, EAAT2 cannot take up free glutamate from the extracellular space, triggering excitotoxicity in the cells, which is characterized by overactivation of glutamate receptors in postsynaptic neurons. Therefore, the longitudinally extensive myelitis and optic neuritis lesions

observed in patients with NMOSD may be the result of primary astrocytic damage triggered by IgG binding to AQP4, which can activate the immune-system cascade and, in addition, downregulate EAAT2. All these processes may explain the destructive lesions in NMOSD secondary to neuroinflammation and glutamatergic excitotoxicity. New or repurposed existing drugs capable of controlling glutamatergic excitotoxicity may provide new therapeutic options to reduce tissue damage and permanent disability after NMOSD attacks.

1 Introduction

The central nervous system (CNS) is the target of several pathologies, including CNS autoimmune diseases, a diversified class of disorders that target neuronal and glial antigens. These disorders may be syndromes associated with auto-antibodies that attack intracellular neural antigens or surface antigens. Among the surface antigens, the membrane proteins present on the neuronal or glial surface might be important targets. In the CNS, the antigen-antibody interaction compromises the homeostasis of the system and may cause damage to neural cells (Höftberger, 2015; Zettl et al., 2012).

Neuromyelitis optica spectrum disorder (NMOSD) is an inflammatory disorder mediated by immune-humoral responses directed against CNS antigens (Sato et al., 2013). Most patients are positive for serum antibodies that target the water channel aquaporin-4 (AQP4-immunoglobulin G [IgG]), a water channel expressed in the end-feet of astrocytes (Wingerchuk et al., 2006, 2015). This inflammatory context is signaled by activated T cells, which cross the cerebral vascular endothelium and impair blood-brain barrier (BBB), promoting the migration of other inflammatory cells, such as macrophages and granulocytes, into the brain and spinal cord tissue (Kurosawa et al., 2015). Moreover, the binding between IgG and AQP4 triggers exacerbation of astrocytic lesions characterized by massive loss of AQP4 and consequent tissue damage that can lead to secondary demyelination due to oligodendrocyte destruction (Kurosawa et al., 2015; Li and Yan, 2015; Zeka et al., 2015; Zekeridou and Lennon, 2015). The lesions are predominantly localized on the optic nerves and spinal cord, compromising the visual and motor capacity of NMOSD patients (Zeka et al., 2015; Zekeridou and Lennon, 2015).

Astrocytes are the main cells regulating glutamatergic homeostasis and, once injured, their ability to perform physiological functions becomes impaired (Haruki et al., 2013; Yang et al., 2016; Zeng et al., 2007). Some studies suggest that the death of oligodendrocytes and secondary demyelination lesions after astrocyte injury, may be related to high extracellular concentrations of the neurotransmitter glutamate in the CNS tissue (reviewed by Yang et al., 2016). Neurons are also highly sensitive to high glutamate concentrations, and glutamate excitotoxicity may promote neuronal death, increasing the risk of disability (Haruki et al., 2013; Marignier et al., 2010). The aim of this review is to discuss the relationship between astrocyte damage and glutamatergic excitotoxicity in AQP4-IgG-positive NMOSD.

2 The role of astrocytes in the brain

The CNS is composed of neurons and glial cells (Figure 1). Glial cells perform critical functions in the CNS, such as modulating and eliminating synapses, supporting neurons with energetic sources and playing an immune role (Allen and Barres, 2009). Glial cells are as numerous as neurons (Allen and Barres, 2009; Gutiérrez Aguilar et al., 2017). This group of cells includes microglia, oligodendrocytes and astrocytes. Their unique biochemical and molecular features allow them to play pivotal roles in CNS physiology (Domingues and Socodato, 2016).

Astrocytes are particularly important among the glial cells, since they participate in information processing in the brain from the early stages of development and throughout adult life (Allen and Barres, 2009). They perform various functions in the brain, such as controlling the balance of extracellular ions and water through specialized transmembrane proteins, including AQP4 and ion channels (Papadopoulos and Verkman, 2013; Verkman et al., 2014). Astrocytes can act in CNS repair, maintain BBB homeostasis and regulate the extracellular ionic content to allow an action potential to occur (Domingues and Socodato, 2016; Hubbard et al., 2017; Iacovetta et al., 2012; Maragakis and Rothstein, 2006). Additionally, they secrete growth factors that stimulate surrounding cells, such as molecules that directly influence synapse formation, which are essential in synaptic modulation and synaptic plasticity (Crawford et al., 2012; Fang et al., 2012).

Astrocytes are anatomically associated with neuronal cell bodies and synapses. Therefore, they can regulate the chemical content of the extracellular space and restrict the diffusion of neurotransmitters released into the synaptic cleft (Allen and Barres, 2009; Gutiérrez Aguilar et al., 2017; Tritsch and Bergles, 2007). The classical example is modulation of the glutamate extracellular concentration through excitatory amino acid transporters (EAATs)/high-affinity glutamate transporters expressed in astrocytic cell membranes (Danbolt, 2001; Danbolt et al., 2016). These cells are responsible for removing glutamate from the extracellular space to promote cerebral homeostasis and prevent excitotoxicity (Benediktsson et al., 2012; Vasile et al., 2017). Therefore, they can regulate extracellular concentrations of substances that can potentially interfere in normal brain functions (Domingues and Socodato, 2016; Hubbard et al., 2017). Recent findings suggest that glial cells are target of several pathologies. The role of glial cells in health and disease is slowly being elucidated, and the interactions of glia with other CNS cells seem to play fundamental roles in brain performance during normal development and disease states (Domingues and Socodato, 2016).

3 Cerebral glutamate

Glutamate is the most abundant CNS excitatory molecule and the main neurotransmitter in mammalian brain (Rose et al., 2018). Glutamate excites nerve cells, especially neurons, thus playing a key role in cell signaling (Zhou and Danbolt, 2014). Glutamate is known to be active in several brain processes, such as cognition, memory and learning. In addition, it plays an important role in the induction and elimination of synapses and contributes to cell migration, differentiation and death (Danbolt, 2001). Glutamate also participates in the synthesis of proteins, peptides, and purines (Hackett and Ueda, 2015) and plays a fundamental role in amino acid metabolism (Skytt et al., 2012). Glutamate signaling has been extensively studied, specially due to its vital role in brain normal function and due to its association with pathologies that affect the CNS (Fang et al., 2012; Lewerenz et al., 2015).

Glutamate is stored in vesicles at the presynaptic terminal through the action of vesicular glutamate transporters (vGLUTs) and released in the synaptic cleft after presynaptic membrane depolarization. When glutamate is released, it binds to ionotropic glutamate receptors (iGluRs), such as N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors, α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid (AMPA) receptors, kainate receptors and metabotropic receptors on the postsynaptic membrane, as well as metabotropic receptors on the presynaptic membrane (Reiner and Levitz, 2018). This depolarization excites the postsynaptic neuron, generating an action potential in the axon to carry the nerve signal (Hayashi, 2018; Lewerenz et al., 2015; Zhou and Danbolt, 2014).

The interaction of glutamate with its specific receptors produces postsynaptic excitatory potentials in a precise and controlled manner (Danbolt, 2001; Reiner and Levitz, 2018). The glutamate extracellular concentrations must be well controlled because high glutamate concentrations excessively activate its receptors, generating oxidative stress that may lead to cell death, a process known as excitotoxicity, which impairs both neurons and glial cells (Stojanovic et al., 2014; Zhou and Danbolt, 2013, 2014), causing synaptic transmission dysfunction and interfering in synaptic plasticity (Pál, 2018). For such modulation, glutamate concentrations are controlled by astrocytes through cellular reuptake since these cells present specific proteins in their cell membranes that take up free glutamate as we discuss below (Benarroch, 2010; Danbolt, 2001; Larsson et al., 2004). Glutamate present in the extracellular space cannot be metabolized by any other mechanism (Zhou and Danbolt, 2013). Therefore, astrocytes are essential in the modulation of the glutamatergic system, and any impairment in their highly coordinated action may contribute to the onset of pathologies (Miladinovic et al., 2015).

4 Astrocytes and glutamate transporters

Astrocytes express excitatory amino acid transporters (EAATs) in their cell membranes, which are also known as glutamate transporters (Al Awabdh et al., 2016; Lewerenz et al., 2015). These transporters can retain excess glutamate from the extracellular space inside the cell, thus potentially avoiding excitotoxicity (Gasparini and Griffiths, 2013). Therefore, they transport glutamate in cells against their intra- and extracellular concentration gradients,

contributing to the low extracellular glutamate concentration (Gutiérrez Aguilar et al., 2017; Lewerenz et al., 2015; Underhill et al., 2015). Glutamate transporters also contribute to physiological synaptic plasticity and function (Rose et al., 2018) and can function as chloride channels (Wadiche et al., 1995a; Wadiche et al., 1995b; Wadiche and Kavanaugh, 1998) and water transporters (MacAulay et al., 2001; MacAulay et al., 2004). Five glutamate transporters belonging to the solute-1 carrier family have been identified (Benarroch, 2010; Jiang and Amara, 2011). These transporters are expressed in various tissues, but their main contribution is control of excitatory neurotransmission in brain tissue (Grewer et al., 2015). EAAT1 and EAAT2 are highly expressed in astrocytes, EAAT3 is expressed in neurons (Hayashi, 2018; Lewerenz et al., 2015; Schousboe, 2018), EAAT4 is present in the dendritic spines of Purkinje cerebellar cells, and EAAT5 is the retinal glutamate transporter (Gutiérrez Aguilar et al., 2017; Pál, 2018).

Astrocytes are well documented to be the cells responsible for detoxification of metabolic waste and extracellular ions and molecules, such as glutamate (Rose et al., 2018). When glutamate enters in the astrocytic compartment, it can be degraded, recycled or transported out of the brain through the blood or gliolymphatic system (Rose et al., 2018). In the adult brain, approximately 80-90% of extracellular glutamate is captured by EAAT2 (Danbolt et al., 2016). In addition to glutamate, these transporters cotransport three Na^+ molecules and one proton (H^+) with each glutamate molecule. Additionally, this system is coupled to the reverse transport of one K^+ (Zerangue and Kavanaugh, 1996). Thus, an electrochemical gradient is created on the plasma membrane, allowing transporters to maintain low concentrations of extracellular glutamate (Bergles et al., 2002; Larsson et al., 2004; Lewerenz et al., 2015).

Astrocytes also convert glutamate into glutamine through the glutamine synthetase reaction (Jayakumar and Norenberg, 2016; Norenberg and Martinez-Hernandez, 1979), and glutamine is later transported to neurons and converted back to glutamate to be used again in neurotransmission in a process known as the “glutamate-glutamine cycle” (Grewer et al., 2015; Hayashi, 2018; Lewerenz et al., 2015; Pál, 2018; Schousboe, 2018) (Figure 2). Since they regulate glutamatergic signaling, glutamate transporters are essential to brain metabolism (Fang et al., 2012; Grewer et al., 2015; Lewerenz et al., 2015). As EAAT2 plays an important role in the physiological functioning of the brain, it is believed to also play a role in the development of chronic and acute CNS disorders (Grewer et al., 2015; Soni et al., 2014). Studies with simultaneous EAAT1- and EAAT2-knockout animals show that they are nonviable because of brain abnormalities and cortical disorganization (Ciappelloni et al., 2017; Rose et al., 2018). Animals deficient only in EAAT2 die after birth due to seizures (Al Awabdh et al., 2016; Danbolt et al., 2016; Tanaka et al., 1997). In adults, impairment in EAAT2 function has been observed to compromise cerebral glutamatergic homeostasis (Hayashi, 2018; Rose et al., 2018). Taken together, the loss of glutamate transporters in astrocytes may contribute to CNS dysfunction and increase neuronal damage in focal inflammatory lesions.

Considering the aforementioned roles of astrocytes and glutamate transporters, understanding astrocyte injury in NMOSD and these entities'

contributions to the glutamatergic excitotoxicity observed in this condition is vital since astrocytic impairment can cause serious consequences in brain homeostasis and reduce synaptic function, contributing to the NMOSD pathophysiology (Hinson et al., 2008). For these reasons, astrocytic damage in NMOSD is believed to trigger an imbalance in glutamatergic homeostasis, which may contribute to the formation of longitudinally extensive myelitis and optic neuritis lesions (Haruki et al., 2013; Yang et al., 2016).

5 Glutamate in NMOSD

Most patients with NMOSD produce IgG auto-antibodies that are highly specific for AQP4, but the cellular and molecular mechanisms of this interaction are still not clear. Damage occurring in other cells of the CNS, such as neurons and oligodendrocytes, is assumed to be due to a primary astrocytic lesion (Hinson et al., 2008). Astrocytes have been studied for a few decades in both *in vivo* and *in vitro* models of various diseases. Cultivation of astrocytes as primary cultures and lineages represents a powerful tool to explore specific information provided by these cells and to reveal mechanisms related to their function (Hertz et al., 1998). The brain is a complex system in which several cell types interact. While some regions are enriched in a specific cell subtype, an isolated cell type does not occur naturally. Regardless, the use of *in vitro* models of specific cell types has been very helpful in the progress of the neuroscience field (Lange et al., 2012). *In vitro* models of NMOSD have shown that auto-antibodies against AQP4 protein trigger a phenomenon known as antigenic modulation because when such auto-antibodies bind to their targets, a specific IgG alters the functions of AQP4 through its degradation or internalization by astrocytes and interferes in sodium-potassium-dependent glutamate uptake (Hinson et al., 2010). For this reason, *in vitro* NMOSD models are important for identifying cellular interactions that cause nerve tissue damage in this disease.

Such models basically consist of rodent/human astrocyte cultures or immortalized lineages that are exposed to AQP4+ serum samples or only purified IgG, with or without the addition of a human complement, which are used to evaluate the possible deleterious effects of related conditions (Haruki et al., 2013). *In vitro* assays have shown that auto-antibodies present in serum derived from NMOSD patients are cytotoxic and harmful to astrocytes, modifying their morphology and function (Li and Yan, 2015). These conditions induce the internalization of AQP4 protein and consequently other membrane proteins, such as EAAT2, since AQP4 protein forms complexes with other membrane proteins, including glutamate transporters (Haruki et al., 2013; Yang et al., 2016; Zeng et al., 2007).

Haruki and colleagues showed that when astrocyte cultures are exposed to AQP4-IgG+ human serum or purified IgG, these cells undergo morphological alterations, with compression of their cell bodies and reduction of cell processes, both in the presence and absence of a human complement. This finding has been confirmed by cell viability assays showing that cells treated with NMOSD patient samples have reduced survival rates compared to cells treated with serum from healthy controls. Astrocyte cultures exposed to AQP4-IgG+ NMOSD patient samples showed reduced EAAT2 transporter expression on cell membranes, suggesting that under these conditions, the AQP4-IgG

complex exerts an indirect negative effect on this transporter, impairing its physiological role (Haruki et al., 2013).

NMOSD is characterized by astrocyte death due to binding of the AQP4-IgG complex to AQP4 in astrocyte membranes (Wingerchuk et al., 2015). For this reason, astrocytes cannot capture free glutamate from the extracellular space, causing excitotoxicity and damaging other nerve cells and their cellular structures, such as the myelin sheath, as observed in longitudinally extensive myelitis lesions and optic neuritis (Hinson et al., 2008). Therefore, impairment in glutamatergic homeostasis induces excitotoxicity in neurons and oligodendrocytes, promoting the destruction of myelin (Stojanovic et al., 2014) (Figure 3).

Excitotoxicity is evident in important CNS disorders and may also be present in NMOSD (Lewerenz et al., 2015). *In vitro* studies show that after IgG binding to AQP4, a decrease in the EAAT2 content occurs in the cell membrane, with a consequent decrease in the ability of cells to take up glutamate (Hinson et al., 2017). Since astrocytes are damaged in NMOSD lesions and EAAT2 is not functional, these cells are unable to take up glutamate. Thus, the lesions of longitudinally extensive myelitis and optic neuritis observed in patients with NMOSD may contribute to excess extracellular glutamate since astrocytes are damaged and lose their functionality (Hinson et al., 2008, 2017). Oligodendrocytes and neurons are highly sensitive to extracellular glutamate accumulation, and lesions in NMOSD are characterized by loss of the myelin sheaths that line the neurons, which are produced by oligodendrocytes. Excess glutamate in the extracellular space may contribute to neurotoxic events that lead to oligodendrocyte dysfunction and consequent demyelination (Hinson et al., 2008, 2010; McDonald et al., 1998).

6 AQP4-IgG downregulates EAAT2

Aquaporins are membrane proteins responsible for cellular water balance (Nakada, 2015; Papadopoulos and Verkman, 2013; Verkman et al., 2014). Thirteen proteins have been identified in various mammalian species and are distributed throughout the organism, including the brain (Iacovetta et al., 2012). In the brain, the most expressed aquaporin is AQP4, which can be found in the cerebral cortex, corpus callosum, retina, optic nerves, cerebellum, hypothalamus magnocellular nucleus and brainstem (Ikeshima-kataoka, 2016; Papadopoulos and Verkman, 2013). AQP4 is vital for the brain since it also regulates potassium uptake and release by astrocytes and facilitates cell migration, glial scar formation and cellular communication (Hubbard et al., 2017; Papadopoulos and Verkman, 2013; Verkman et al., 2014). Studies using AQP4-knockout animals have shown that this protein facilitates the movement of water into and out of the CNS. In the absence of AQP4, animals show cytotoxic brain edema due to an osmotic imbalance (Verkman et al., 2014, 2017).

AQP4 forms complexes with other membrane proteins, such as glutamate transporters, especially EAAT2, and can regulate this transporter

positively when it is functional or negatively when it is damaged (Chaudhry et al., 1995; Hinson et al., 2008; MacAulay et al., 2002; Queen et al., 2007; Xing et al., 2016; Zeng et al., 2007). Thus, the interaction between IgG and AQP4, which is known as the “antigen-antibody complex” (AQP4-IgG), compromises EAAT2 function, resulting in excitotoxicity and impaired CNS cell function (Fang et al., 2012; Haruki et al., 2013; Lewerenz et al., 2015; Yang et al., 2016; Zeng et al., 2007). The AQP4-IgG complex induces downregulation of EAAT2, resulting in high concentrations of glutamate in the brain (Hinson 2010; Mattson, 2003; Park et al., 2004). This process increases extracellular glutamate concentrations, aggravating typical NMOSD lesions associated with the complement system, and provides a cytotoxic environment for neurons and oligodendrocytes (Hinson et al., 2010).

Accordingly, Haruki and colleagues showed that EAAT2 has diminished expression in human adult astrocyte lineages exposed to specific IgG, suggesting that the AQP4-IgG complex downregulates this transporter in NMOSD (Haruki et al., 2013). Astrocyte cultures derived from AQP4-knockout animals show low EAAT2 expression as well as a low astrocytic ability to take up glutamate (Zeng et al., 2007). Marignier et al. (2010) observed that purified IgG from patients with NMOSD reduces the number of AQP4+ cells, and the remaining cells exhibit low glutamate uptake. Therefore, in this model, we can conclude that the AQP4-IgG complex results in the loss of EAAT2 and consequently impacts glutamatergic homeostasis. Subsequently, damage to neurons and oligodendrocytes is observed, causing the classic lesions that characterize NMOSD (Haruki et al., 2013; Marignier et al., 2010).

In a glutamate uptake assay, Hinson et al. (2008) observed that cells take up little glutamate (less than 50%) after AQP4+ serum exposure, and EAAT2 expression is as low as AQP4 expression, undetectable by immunofluorescence, after serum exposure. In addition, immunohistochemical assays of human CNS tissue (the cortex and spinal cord) showed that EAAT2 is normally colocalized with AQP4 protein in astrocytes of the gray matter (Chaudhry et al., 1995). The same type of colocalization has also been observed in rodents (Queen et al., 2007), corroborating the hypothesis that AQP4 can form protein complexes and exerts regulatory action on GLT-1 (EAAT2 analogous in rodents) due to the action of the specific IgG (Hinson et al., 2008, 2017).

Under normal physiological conditions, EAAT2 is known to be enriched in the spinal cord (Nakamura et al., 2008). In NMOSD, this tissue is extensively damaged, and the resultant lesions can be explained when considering the theory that AQP4-IgG downregulates EAAT2 (Hinson et al., 2008); therefore, the loss of this transporter may contribute to the destructive lesions of the spinal cord observed in patients with NMOSD. Since the lesions are necrotic, NMOSD lesions may emerge not only from complement activation but also due to the

negative control exerted by AQP4-IgG on EAAT2, preventing glutamatergic homeostasis (Hinson et al., 2008, 2010; Newcombe et al., 2008; Wingerchuk et al., 2007). Therefore, impairment of AQP4 functions through AQP4-IgG binding decreases EAAT2's regulation of extracellular glutamate, resulting in glutamatergic excitotoxicity that promotes the death of other nerve cells and contributes to the formation of lesions characteristic of NMOSD (Yang et al., 2016).

7 Therapeutic Interventions

The drug therapies developed to date to treat autoimmune diseases such as NMOSD aim to reduce the inflammatory process through immunosuppression. However, new oral therapies using small molecules that are directly permeable to the BBB may be promising for neuroprotection (Luchtman et al., 2016), so both immunosuppressive and neuroprotective drugs may be combined to treat patients. Therefore, investigating drugs that modulate astrocyte function and glutamate uptake and have a protective effect on other cells may contribute to the treatment of several CNS neuroinflammatory pathologies, such as NMOSD.

Antigen-antibody binding in NMOSD promotes the loss of important astrocyte functions associated with AQP4 and EAAT2, which leaves glutamate at high concentrations in the extracellular space. Considering that excess glutamate contributes to the formation of spinal cord and optic nerve lesions, a therapy that regulates glutamatergic excitotoxicity could be useful to prevent such lesions in NMOSD. Studies with rodents show that ceftriaxone, a beta-lactam antibiotic that increases EAAT2 expression, thus facilitating the removal of free glutamate and preventing glutamatergic excitotoxicity (Hsu et al., 2015), positively regulates EAAT2 acutely and chronically (Rothstein et al., 2005; Szu and Binder, 2016; Zimmer et al., 2017), thus providing neuroprotection under excitotoxic stress conditions. In *in vitro* models derived from spinal cord cultures, ceftriaxone reduces neuronal loss by increasing EAAT2 expression (Bajrektarevic and Nistri, 2017).

Bajrektarevic et al. (2017) observed that excitotoxic stress induction with 100 μ M kainate promotes EAAT2 immunoreactivity in astrocyte cultures pretreated with ceftriaxone for 3 days, suggesting that ceftriaxone confers neuroprotection against an excitotoxic stimulus/challenge when administered prior to treatment with a glutamate uptake inhibitor (Bajrektarevic and Nistri, 2017). In an experimental model of Parkinson's disease, ceftriaxone has been shown to increase EAAT2 expression in the hippocampus, regardless of whether the treatment started before or after the injury. This drug crosses the BBB and can penetrate into the CNS at therapeutic levels. In the context of NMOSD, ceftriaxone may be studied to determine whether it can reduce acute

longitudinally extensive myelitis and optic neuritis lesions based on reduced cell damage secondary to excess glutamate (Hsu et al., 2015).

The deleterious effect of glutamate has already been elucidated in several neurodegenerative diseases such as Alzheimer's. Memantine is a neuroprotective drug recommended for the treatment of Alzheimer's disease, and as a noncompetitive NMDA receptor antagonist, this drug reduces receptor affinity for glutamate (Matsunaga et al., 2018). Memantine may confer neuroprotection through more potent inhibition of extrasynaptic NMDA receptors (Léveillé et al., 2008; Milnerwood et al., 2010; Okamoto et al., 2009; Xia et al., 2010; Zhao et al., 2006) without significantly affecting physiologic glutamatergic transmission. In addition, this drug has few undesirable drug interactions or adverse effects and is a well-tolerated medication for neurological disorders (Seyedsaadat and Kallmes, 2018). Several studies have investigated the effects of memantine on neurons, and the drug is known to increase the release of glial cell neurotrophic factors, contributing to neuronal survival (Wu et al., 2009). Further, the anti-inflammatory action of memantine reduces pro-inflammatory factors (reactive oxygen species and tumor necrosis factor- α), inhibiting the activation of microglia, and may provide neuroprotection (Maciulaitiene et al., 2017).

In addition to Alzheimer's disease, in retinal crush models (a classic glaucoma model), astrocytes treated with intravitreal memantine have been found to exhibit improved survival (Maciulaitiene, 2017). Memantine preserves retinal astrocytes by exerting a glioprotective effect. In glaucoma models, an altered ion concentration in cells causes cellular damage due to high sodium influx and elevated intracellular calcium, causing glutamate release and cell death. Under memantine treatment, this process is attenuated, preventing excitotoxicity-induced damage to nerve cells. Memantine, as a noncompetitive NMDA receptor blocker, can reduce the optic neuritis observed in patients with NMOSD as well as retinal damage in some cases (Bradl et al., 2018; Maciulaitiene et al., 2017). In addition to its protective effect, memantine can induce cellular proliferation and increase the production of neural progenitors by up to 2-3 times, which may contribute to regeneration of injured tissues in NMOSD (Cahill et al., 2018).

Another drug that may be helpful in the treatment of NMOSD is dimethyl fumarate (DMF or BG-12). DMF is used to treat relapsing-remitting multiple sclerosis (MS) (Hoftberger and Lassmann, 2017; Mills et al., 2018). DMF mainly modulates the immunological profiles of patients in terms of cellular composition and inflammation, reducing the number of peripheral T and B lymphocytes and modulating their inflammatory state to engender an anti-inflammatory profile. Further, DMF has a protective effect on cells that suffer from oxidative stress through activation of nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) and can increase the proliferation of neural progenitors *in vitro* since DMF increases self-

renewal and protects neural progenitors, oligodendrocytes and therefore myelin against oxidative stress, reducing death by apoptosis (Hammer et al., 2018; Mills et al., 2018). Although some studies show that DMF plays a neuroprotective role, its mechanism of action is still obscure and requires further clarification because many immunomodulatory drugs used in MS treatment may actually worsen NMOSD. Therefore, any trial with DMF should be performed only after strong experimental evidence is found showing that the beneficial effects observed in MS are also observed in NMOSD (Popiel et al., 2018; Yamout et al., 2017).

8 Conclusions

The concept that AQP4-IgG auto-antibodies are deleterious to astrocytes is well established. Protein-antibody binding not only activates the immune system but also modulates AQP4 function and induces its internalization by astrocytes. Some pathological features observed in longitudinally extensive myelitis and optic neuritis lesions may be associated with glutamatergic excitotoxicity since the AQP4-IgG/AQP4 complex downregulates the main astrocytic glutamate transporter EAAT2. Consequently, neurons and glial cells may be exposed to excitotoxicity, oxidative stress and neuroinflammation. These three aspects may influence the formation and extension of NMOSD lesions. Drugs to control the deleterious effects of excess glutamate in the CNS may provide innovative neuroprotective therapy to reduce NMOSD attacks and their severity. Therefore, promoting future studies with such drugs in monotherapy or in association with currently used immunotherapies is critical to evaluate the safety and efficacy of these strategies in NMOSD.

FIGURE LEGENDS

Figure 1 – Cellular organization of the CNS. The CNS is composed of neuronal and glial cells (microglia, oligodendrocytes, and astrocytes). Each cell performs a specific function in the CNS. Neurons transmit chemical and electrical signals to other nerve cells. Microglia are immune system cells responsible for the defense of the CNS. Oligodendrocytes form the myelin sheaths of the axons, facilitating saltatory nervous signal conduction. Finally, astrocytes are multifunctional cells that control ion and neurotransmitter diffusion in the nervous parenchyma, in addition to actively participating in the synapses and providing metabolic support to the other cells.

Figure 2 – Cerebral glutamate flow. Glutamate is stored presynaptically in vesicles by vesicular glutamate transporters (vGLUT). It is released after presynaptic membrane depolarization, binds to ionotropic glutamate receptors (iGluR) like NMDA and AMPA receptors in the postsynaptic membrane and generates an action potential. The excess glutamate released into the synaptic

cleft is regulated by astrocytes through the EAAT1 and EAAT2 transporters against a concentration gradient. In astrocytes, glutamate is recycled and converted to glutamine, which is transported to neurons and converted into glutamate again to be used in a new synapse.

Figure 3 – Glutamatergic toxicity in NMOSD. Aquaporin-4 (AQP4)-IgG auto-antibodies binding to AQP4 may promote the internalization of the water channel, thus affecting cellular hydric homeostasis. Antigen-antibody binding promotes immune activation but also affects glutamatergic homeostasis because of reduced glutamate transporter (EAAT2) activity due to its internalization together with AQP4. In the absence of EAAT2, glutamate remains free in the extracellular space, promoting glutamatergic toxicity, which affects other cells, such as neurons and oligodendrocytes.

9 Conflict of Interest

The authors declare that this research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

APBS has received a scholarship from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/Brazil).

DKS has received a scholarship from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology (MEXT) of Japan; a Grants-in-Aid for Scientific Research from the Japan Society for the Promotion of Science (KAKENHI 15K19472); research support from CNPq/Brasil (425331/2016-4), FAPERGS/MS/CNPq/SESRS (17/2551-0001391-3) PPSUS/Brazil, TEVA (research grant for EMOCEMP Investigator Initiated Study), and Euroimmun AG (Neuroimmunological Complications associated with Arboviruses); and speaker honoraria from Biogen, Novartis, Genzyme, TEVA, Merck-Serono, Roche, and Bayer and has participated in advisory boards for Shire, Roche, TEVA, Merck-Serono and Quest/Athena Diagnostics.

10 Author Contributions

All authors contributed to the manuscript preparation and wrote, read and approved the submitted version.

11 Funding

This review is based on research supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq Universal/Brazil grant 425331/2016-4), the Instituto Nacional de Ciências e Tecnologia em Exitotoxicidade e Neuroproteção (INCT-EN) and the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS/CAPES/DOCFIX 18/2251-0000504-5).

12 Acknowledgments

The authors would like to acknowledge the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) Finance Code 001 - Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education (PROEX Program) and the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

13 References

- Al Awabdh, S., Gupta-Agarwal, S., Sheehan, D. F., Muir, J., Norkett, R., Twelvetrees, A. E., et al. (2016). Neuronal activity mediated regulation of glutamate transporter GLT-1 surface diffusion in rat astrocytes in dissociated and slice cultures. *Glia* 64, 1252–1264. doi:10.1002/glia.22997.
- Allen, N. J., and Barres, B. A. (2009). Glia — more than just brain glue. 457, 1–3.
- Bajrektarevic, D., and Nistri, A. (2017). NeuroToxicology Ceftriaxone-mediated upregulation of the glutamate transporter GLT-1 contrasts neurotoxicity evoked by kainate in rat organotypic spinal cord cultures. *Neurotoxicology* 60, 34–41. doi:10.1016/j.neuro.2017.02.013.
- Benarroch, E. E. (2010). Glutamate transporters: Diversity, function, and involvement in neurologic disease. *Neurology* 74, 259–264. doi:10.1212/WNL.0b013e3181cc89e3.
- Benediktsson, A. M., Marrs, G. S., Tu, J. C., Worley, P. F., Rothstein, J. D., Bergles, D. E., et al. (2012). Neuronal activity regulates glutamate transporter dynamics in developing astrocytes. *Glia* 60, 175–188. doi: 10.1002/glia.21249.
- Bergles, D. E., Tzingounis, A. V., Jahr, C.E. (2002). Comparison of coupled and uncoupled currents during glutamate uptake by GLT-1 transporters. *J Neurosci.* 22, 10153–10162. doi: 10.1523/JNEUROSCI.22-23-10153.2002.
- Bradl, M., Reindl, M., and Lassmann, H. (2018). Mechanisms for lesion localization in neuromyelitis optica spectrum disorders. *Curr. Opin. Neurol.* 31, 325–333. doi:10.1097/WCO.0000000000000551.
- Cahill, S. P., Cole, J. D., Yu, R. Q., Clemans-Gibbon, J., and Snyder, J. S. (2018). Differential Effects of Extended Exercise and Memantine Treatment on Adult Neurogenesis in Male and Female Rats. *Neuroscience* 390, 241–255. doi:10.1016/j.neuroscience.2018.08.028.
- Chaudhry, F. A., Lehre, K. P., Lookeren Campagne, M. van, Ottersen, O. P., Danbolt, N. C., and Storm-Mathisen, J. (1995). Glutamate transporters in glial plasma membranes: Highly differentiated localizations revealed by quantitative ultrastructural immunocytochemistry. *Neuron* 15, 711–720. doi:10.1016/0896-6273(95)90158-2.
- Ciappelloni, S., Murphy-royal, C., Dupuis, J. P., and Oliet, S. H. R. (2017). Dynamics of surface neurotransmitter receptors and transporters in glial

- cells : Single molecule insights. *Cell Calcium* 67, 46–52. doi:10.1016/j.ceca.2017.08.009.
- Crawford, D. C., Jiang, X., Taylor, A., and Mennerick, S. (2012). Astrocyte-derived thrombospondins mediate the development of hippocampal presynaptic plasticity in vitro. *J Neurosci.* 32, 01–23. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2604-12.2012.
- Danbolt, N. C. (2001). Glutamate uptake. *Prog. Neurobiol.* 65, 1–105. doi:10.1016/S0301-0082(00)00067-8.
- Danbolt, N. C., Furness, D. N., and Zhou, Y. (2016). Neurochemistry International Neuronal vs glial glutamate uptake: Resolving the conundrum. *Neurochem. Int.* 98, 29–45. doi:10.1016/j.neuint.2016.05.009.
- Domingues, H. S., and Socodato, R. (2016). Microglia Crosstalk in Myelin Development, Damage, and Repair. *Front Cell Dev Biol.* 4, 1–16. doi:10.3389/fcell.2016.00071.
- Fang, J., Han, D., Hong, J., Tan, Q., and Tian, Y. (2012). The chemokine , macrophage inflammatory protein-2 γ , reduces the expression of glutamate transporter-1 on astrocytes and increases neuronal sensitivity to glutamate excitotoxicity. *J. Neuroinflammation* 9, 01–12. doi:10.1186/1742-2094-9-267.
- Gasparini, C. F., and Griffiths, L. R. (2013). The biology of the glutamatergic system and potential role in migraine. *Int. J. Biomed. Sci.* 9, 1–8.
- Grewer, C., Gameiro, A., and Rauen, T. (2015). SLC1 Glutamate Transporters. *Pflugers Arch* 466, 3–24. doi:10.1007/s00424-013-1397-7.SLC1.
- Gutiérrez Aguilar, G. F., Alquisiras-Burgos, I., Espinoza-Rojo, M., and Aguilera, P. (2017). Glial Excitatory Amino Acid Transporters and Glucose Incorporation. *Adv. Neurobiol.* 16, 269–282. doi:10.1007/978-3-319-55769-4_13.
- Hackett, J. T., and Ueda, T. (2015). Glutamate Release. *Neurochem. Res.* 40, 2443–2460. doi:10.1007/s11064-015-1622-1.
- Hammer, A., Waschbisch, A., Kuhbandner, K., Bayas, A., Lee, D., Duscha, A., et al. (2018). The NRF2 pathway as potential biomarker for dimethyl fumarate treatment in multiple sclerosis. *Ann Clin Transl Neurol.* 5, 668–676. doi:10.1002/acn3.553.
- Haruki, H., Sano, Y., Shimizu, F., Omoto, M., Tasaki, A., Oishi, M., et al. (2013). NMO sera down-regulate AQP4 in human astrocyte and induce cytotoxicity independent of complement. *J. Neurol. Sci.* 331, 136–144. doi:10.1016/j.jns.2013.05.035.
- Hayashi, M. K. (2018). Structure-Function Relationship of Transporters in the Glutamate – Glutamine Cycle of the Central Nervous System. *Int J Mol Sci.* 19, 01–18. doi: 10.3390/ijms19041177
- Hertz, L., Peng, L., and Lai, J. C. K. (1998). Functional studies in cultured astrocytes. *Methods A Companion to Methods Enzymol.* 16, 293–310. doi:10.1006/meth.1998.0686.
- Hinson, S. R., Clift, I. C., Luo, N., Kryzer, T. J., and Lennon, V. A. (2017).

- Autoantibody-induced internalization of CNS AQP4 water channel and EAAT2 glutamate transporter requires astrocytic Fc receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 114, 5491–5496. doi:10.1073/pnas.1701960114.
- Hinson, S. R., McKeon, A., and Lennon, V. A. (2010). Neurological autoimmunity targeting aquaporin-4. *Neuroscience* 168, 1009–1018. doi:10.1016/j.neuroscience.2009.08.032.
- Hinson, S. R., Roemer, S. F., Lucchinetti, C. F., Fryer, J. P., Kryzer, T. J., Chamberlain, J. L., et al. (2008). Aquaporin-4 – binding autoantibodies in patients with neuromyelitis optica impair glutamate transport by down-regulating EAAT2. *J Exp Med*. 205, 2473–2481. doi:10.1084/jem.20081241.
- Höftberger, R. (2015). Neuroimmunology: an expanding frontier in autoimmunity. *Front Immunol*. 6, 1–5. doi:10.3389/fimmu.2015.00206.
- Höftberger, R. H., and Lassmann, H. (2017). Inflammatory demyelinating diseases of the central nervous system. *Handb Clin Neurol*. 145, 263–283. doi:10.1016/B978-0-12-802395-2.00019-5.
- Hsu, C., Hung, C., Chang, H., Liao, W., Ho, S. C., and Ho, Y. J. (2015). Ceftriaxone prevents and reverses behavioral and neuronal deficits in an MPTP-induced animal model of Parkinson's disease dementia. *Neuropharmacology* 91, 43–56. doi:10.1016/j.neuropharm.2014.11.023.
- Hubbard, J. A., Szu, J. I., and Binder, D. K. (2017). The role of aquaporin-4 in synaptic plasticity, memory and disease. *Brain Res. Bull.* 136, 118–129. doi:10.1016/j.brainresbull.2017.02.011.
- Iacovetta, C., Rudloff, E., and Kirby, R. (2012). The role of aquaporin 4 in the brain. *Vet Clin Pathol*. 41, 32–44. doi:10.1111/j.1939-165X.2011.00390.x.
- Ikeshima-kataoka, H. (2016). Neuroimmunological Implications of AQP4 in Astrocytes. *Int J Mol Sci*. 17, 1–16. doi:10.3390/ijms17081306.
- Jayakumar, A. R., and Norenberg, M. D. (2016). "Glutamine Synthetase: Role in Neurological Disorders," in *Advances in Neurobiology*, ed. Springer, 327–350. doi:10.1007/978-3-319-45096-4_13.
- Jiang, J., and Amara, S.G.(2011)New views of glutamate transporter structure and function: advances and challenges. *Neuropharmacology* 60, 172–181. doi: 10.1016/j.neuropharm.2010.07.019.
- Kurosawa, K., Misu, T., Takai, Y., Sato, D. K., Takahashi, T., Abe, Y., et al. (2015). Severely exacerbated neuromyelitis optica rat model with extensive astrocytopathy by high affinity anti-aquaporin-4 monoclonal antibody. *Acta Neuropathol. Commun*. 3, 1–15. doi:10.1186/s40478-015-0259-2.
- Lange, S. C., Bak, L. K., Waagepetersen, H. S., Schousboe, A., and Norenberg, M. D. (2012). Primary Cultures of Astrocytes: Their Value in Understanding Astrocytes in Health and Disease. *Neurochem. Res*. 37, 2569–2588. doi:10.1007/s11064-012-0868-0.
- Larsson, H. P., Tzingounis, A.V., Koch, H. P., Kavanaugh, M. P. (2004). Fluorometric measurements of conformational changes

- in glutamate transporters. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 101, 2569–2588. doi: 10.1073/pnas.0306737101.
- Léveillé, F., El Gaamouch, F., Gouix, E., Lecocq, M., Lobner, D., Nicole, O., et al. (2008). Neuronal viability is controlled by a functional relation between synaptic and extrasynaptic NMDA receptors. *FASEB J.* 22, 4258–4271. doi: 10.1096/fj.08-107268.
- Lewerenz, J., and Maher, P. (2015). Chronic Glutamate Toxicity in Neurodegenerative Diseases — What is the Evidence?. *Front Neurosci.* 9, 1–20. doi:10.3389/fnins.2015.00469.
- Li, M., and Yan, Y. (2015). Experimental models of neuromyelitis optica: current status, challenges and future directions. *Neurosci Bull.* 31, 735–744. doi:10.1007/s12264-015-1552-6.
- Luchtman, D., Gollan, R., Ellwardt, E., Birkenstock, J., Robohm, K., Siffrin, V., et al. (2016). In vivo and in vitro effects of multiple sclerosis immunomodulatory therapeutics on glutamatergic excitotoxicity. *J. Neurochem.* 136, 971–980. doi:10.1111/jnc.13456.
- MacAulay, N., Gether, U., Klærke, D. A., and Zeuthen, T. (2001). Water transport by the human Na⁺-coupled glutamate cotransporter expressed in *Xenopus* oocytes. *J Physiol.* 530, 367–378. doi: 10.1111/j.1469-7793.2001.0367k.x.
- MacAulay, N., Gether, U., Klærke, D. A., and Zeuthen, T. (2002). Passive water and urea permeability of a human Na⁺-glutamate cotransporter expressed in *Xenopus* oocytes. *J Physiol.* 542, 817–828. doi: 10.1113/jphysiol.2002.020586.
- MacAulay, N., Hamann, S., and Zeuthen, T. (2004). Water transport in the brain: role of cotransporters. *Neuroscience* 129, 1031–1044. doi: 10.1016/j.neuroscience.2004.06.045.
- Maciulaitiene, R., Pakuliene, G., Kaja, S., Pauza, D. H., Kalesnykas, G., and Januleviciene, I. (2017). Glioprotection of Retinal Astrocytes After Intravitreal Administration of Memantine in the Mouse Optic Nerve Crush Model. *Med Sci Monit.* 23, 1173–1179. doi:10.12659/MSM.899699.
- Maragakis, N. J., and Rothstein, J. D. (2006). Mechanisms of Disease: Astrocytes in neurodegenerative disease. *Nat. Clin. Pract. Neurol.* 2, 679–689.
- Marignier, R., Nicolle, A., Watrin, C., Touret, M., Cavagna, S., Varrin-Doyer, M., et al. (2010). Oligodendrocytes are damaged by neuromyelitis optica immunoglobulin G via astrocyte injury. *Brain* 133, 2578–2591. doi:10.1093/brain/awq177.
- Matsunaga, S., Kishi, T., Nomura, I., Sakuma, K., Okuya, M., Ikuta, T., et al. (2018). The efficacy and safety of memantine for the treatment of Alzheimer's disease. *Expert Opin. Drug Saf.* 17, 1053–1061. doi:10.1080/14740338.2018.1524870.
- McDonald, J. W., Althomsons, S. P., Hycr, K. L., Choi, D. W., and Goldberg, M. P. (1998). Oligodendrocytes from forebrain are highly vulnerable to AMPA/kainate receptor-mediated excitotoxicity. *Nat. Med.* 4, 291–297.

- Miladinovic, T., Nashed, M. G., and Singh, G. (2015). Overview of glutamatergic dysregulation in central pathologies. *Biomolecules* 5, 3112–3141. doi:10.3390/biom5043112
- Mills, E. A., Ogradnik, M. A., Plave, A., and Mao-Draayer, Y. (2018). Emerging Understanding of the Mechanism of Action for Dimethyl Fumarate in the Treatment of Multiple Sclerosis. *Front Neurol.* 9, 1–8. doi:10.3389/fneur.2018.00005.
- Milnerwood, A. J., Gladding, C. M., Pouladi, M. A., Kaufman, A. M., Hines, R. M., Boyd, J. D., et al. (2010). Early increase in extrasynaptic NMDA receptor signaling and expression contributes to phenotype onset in Huntington's disease mice. *Neuron* 65, 178–190. doi: 10.1016/j.neuron.2010.01.008.
- Nakada, T. (2015). The Molecular Mechanisms of Neural Flow Coupling: A New Concept. *J Neuroimaging.* 25, 861–865. doi:10.1111/jon.12219.
- Nakamura, M., Miyazawa, I., Fujihara, K., Nakashima, I., Misu, T., Watanabe, S., et al. (2008). Preferential spinal central gray matter involvement in neuromyelitis optica: An MRI study. *J. Neurol.* 255, 163–170. doi:10.1007/s00415-008-0545-z.
- Newcombe, J., Uddin, A., Dove, R., Patel, B., Turski, L., Nishizawa, Y., et al. (2008). Glutamate receptor expression in multiple sclerosis lesions. *Brain Pathol.* 18, 52–61. doi: 10.1111/j.1750-3639.2007.00101.x.
- Norenberg, M. D., and Martinez-Hernandez, A. (1979). Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain. *Brain Res.* 161, 303–310.
- Okamoto, S., Pouladi, M. A., Talantova, M., Yao, D., Xia, P., Ehrnhoefer, D. E., et al. (2009). Balance between synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor activity influences inclusions and neurotoxicity of mutant huntingtin. *Nat Med.* 15, 1407–1413. doi: 10.1038/nm.2056.
- Pál, B. (2018). Involvement of extrasynaptic glutamate in physiological and pathophysiological changes of neuronal excitability. *Cell Mol Life Sci.* 75, 2917–2949. doi:10.1007/s00018-018-2837-5.
- Papadopoulos, M. C., and Verkman, A. S. (2013). Aquaporin water channels in the nervous system. *Nat Rev Neurosci.* 14, 265–277. doi:10.1038/nrn3468.
- Popiel, M., Psujek, M., and Bartosik-Psujek, H. (2018). Severe disease exacerbation in a patient with neuromyelitis optica spectrum disorder during treatment with dimethyl fumarate. *Mult. Scler. Relat. Disord.* 26, 204–206. doi:10.1016/j.msard.2018.09.011.
- Queen, S. A., Kessler, J. P., and Bridges, R. J. (2007). Regional distribution of sodium-dependent excitatory amino acid transporters in rat spinal cord. *J. Spinal Cord Med.* 30, 263–271.
- Reiner, A., and Levitz, J. (2018). Glutamatergic Signaling in the Central Nervous System: Ionotropic and Metabotropic Receptors in Concert. *Neuron* 98, 1080–1098. doi:10.1016/j.neuron.2018.05.018.
- Rose, C. R., Felix, L., Zeug, A., Dietrich, D., Reiner, A., and Henneberger, C. (2018). Astroglial Glutamate Signaling and Uptake in the Hippocampus.

- Front Mol Neurosci.* 10, 1–20. doi:10.3389/fnmol.2017.00451.
- Rothstein, J. D., Patel, S., Regan, M. R., Haenggeli, C., Huang, Y. H., Bergles, D. E., et al. (2005). β -Lactam antibiotics offer neuroprotection by increasing glutamate transporter expression. *Nature* 433, 73–77. doi:10.1038/nature03180.
- Sato, D. K., Lana-Peixoto, M. A., Fujihara, K., and de Seze, J. (2013). Clinical Spectrum and Treatment of Neuromyelitis Optica Spectrum Disorders: Evolution and Current Status. *Brain Pathol.* 23, 647–660. doi:10.1111/bpa.12087.
- Schousboe, A. (2018). Neuroscience Letters Metabolic signaling in the brain and the role of astrocytes in control of glutamate and GABA neurotransmission. *Neurosci. Lett.*, 01–03. doi:10.1016/j.neulet.2018.01.038.
- Seyedsaadat, S. M., and Kallmes, D. F. (2018). Memantine for the treatment of ischemic stroke: experimental benefits and clinical lack of studies. *Rev Neurosci.* 01–18. doi: 10.1515/revneuro-2018-0025.
- Skytt, D. M., Klawonn, A. M., Stridh, M. H., Pajacka, K., Patruss, Y., Quintana-Cabrera, R., et al. (2012). siRNA knock down of glutamate dehydrogenase in astrocytes affects glutamate metabolism leading to extensive accumulation of the neuroactive amino acids glutamate and aspartate. *Neurochem. Int.* 61, 490–497. doi:10.1016/j.neuint.2012.04.014.
- Soni, N., Reddy, B. V. K., and Kumar, P. (2014). GLT-1 transporter: An effective pharmacological target for various neurological disorders. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 127, 70–81. doi:10.1016/j.pbb.2014.10.001.
- Stojanovic, I. R., Kostic, M., and Ljubisavljevic, S. (2014). The role of glutamate and its receptors in multiple sclerosis. *J. Neural Transm.* 121, 945–955. doi:10.1007/s00702-014-1188-0.
- Szu, J. I., and Binder, D. K. (2016). The Role of Astrocytic Aquaporin-4 in Synaptic Plasticity and Learning and Memory. *Front Integr Neurosci.* 10, 1–16. doi:10.3389/fnint.2016.00008.
- Tanaka, K., Watase, K., Manabe, T., Yamada, K., Watanabe, M., Takahashi, K., et al. (1997). Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. *Science* 276, 1699–1702. doi: 10.1126/science.276.5319.1699.
- Tritsch, N. X., and Bergles, D. E. (2007). Defining the Role of Astrocytes in Neuromodulation. *Neuron* 54, 497–500. doi: 10.1016/j.neuron.2007.05.008.
- Underhill, S. M., Wheeler, D. S., Amara, S. G. (2015). Differential regulation of two isoforms of the glial glutamate transporter EAAT2 by DLG1 and CaMKII. *J Neurosci.* 35, 5260–5270. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4365-14.2015.
- Vasile, F., Dossi, E., and Rouach, N. (2017). Human astrocytes: structure and functions in the healthy brain. *Brain Struct. Funct.* 222, 2017–2029. doi:10.1007/s00429-017-1383-5.
- Verkman, A. S., Phuan, P.-W., Asavapanumas, N., and Tradtrantip, L. (2014). Biology of AQP4 and anti-AQP4 antibody: therapeutic implications. *Brain*

- Pathol.* 23, 684–695. doi:10.1111/bpa.12085.Biology.
- Verkman, A. S., Smith, A. J., Phuan, P., Tradtrantip, L., Anderson, M. O. (2017). The aquaporin-4 water channel as a potential drug target in neurological disorders. *Expert Opin. Ther. Targets.* 21, 1161–1170. doi:10.1080/14728222.2017.1398236.
- Wadiche, J. I., Arriza, J. L., Amara, S. G., Kavanaugh, M. P. (1995a). Kinetics of a human glutamate transporter. *Neuron* 14, 1019–1027. doi: 10.1016/0896-6273(95)90340-2.
- Wadiche, J. I., Amara, S. G., Kavanaugh, M. P. (1995b). Ion fluxes associated with excitatory amino acid transport. *Neuron* 15, 721–728. doi: 10.1016/0896-6273(95)90159-0.
- Wadiche, J. I., and Kavanaugh, M. P. (1998). Macroscopic and microscopic properties of a cloned glutamate transporter/chloride channel. *J Neurosci.* 18, 7650–7661. doi: 10.1523/JNEUROSCI.18-19-07650.1998.
- Wingerchuk, D. M., Banwell, B., Bennett, J. L., Cabre, P., Carroll, W., Chitnis, T., et al. (2015). International consensus diagnostic criteria for neuromyelitis optica spectrum disorders. *Neurology* 85, 177–189. doi:10.1212/WNL.0000000000001729.
- Wingerchuk, D. M., Lennon, V. A., Lucchinetti, C. F., Pittock, S. J., and Weinshenker, B. G. (2007). The spectrum of neuromyelitis optica. *Lancet Neurol.* 6, 805–815. doi:10.1016/S1474-4422(07)70216-8.
- Wingerchuk, D. M., Lennon, V. A., Pittock, S. J., Lucchinetti, C. F., and Weinshenker, B. G. (2006). Revised diagnostic criteria for neuromyelitis optica. *Neurology* 66, 1485–1489. doi:10.1212/01.wnl.0000216139.44259.74.
- Wu, H. M., Tzeng, N. S., Qian, L., Wei, S. J., Hu, X., Chen, S. H., et al. (2009). Novel Neuroprotective Mechanisms of Memantine: Increase in Neurotrophic Factor Release from Astroglia and Anti-Inflammation by Preventing Microglial Activation. *Neuropsychopharmacology* 34, 2344–2357. doi:10.1038/npp.2009.64.
- Xia, P., Chen, H. S., Zhang, D., Lipton, S. A. (2010). Memantine preferentially blocks extrasynaptic over synaptic NMDA receptor currents in hippocampal autapses. *J Neurosci.* 30, 2344–2357. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2488-10.2010.
- Xing, H. Q., Zhang, Y., Izumo, K., Arishima, S., Kubota, R., Ye, X., et al. (2016). Decrease of aquaporin-4 and excitatory amino acid transporter-2 indicate astrocyte dysfunction for pathogenesis of cortical degeneration in HIV-associated neurocognitive disorders. *Neuropathology* 37, 25–34. doi: 10.1111/neup.12321.
- Yamout, B. I., Beaini, S., Zeineddine, M. M., and Akkawi, N. (2017). Catastrophic relapses following initiation of dimethyl fumarate in two patients with neuromyelitis optica spectrum disorder. *Mult. Scler. J.* 23, 1297–1300. doi:10.1177/1352458517694086.
- Yang, X., Ransom, B. R., and Ma, J. (2016). The role of AQP4 in neuromyelitis optica: More answers, more questions. *J. Neuroimmunol.* 298, 63–70. doi:10.1016/j.jneuroim.2016.06.002.

- Zeka, B., Hastermann, M., Hochmeister, S., Kögl, N., Kaufmann, N., Schanda, K., et al. (2015). Highly encephalitogenic aquaporin 4-specific T cells and NMO-IgG jointly orchestrate lesion location and tissue damage in the CNS. *Acta Neuropathol.* 130, 783-798. doi:10.1007/s00401-015-1501-5.
- Zekeridou, A., and Lennon, V. A. (2015). Aquaporin-4 autoimmunity. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.* 2, 1–10. doi:10.1212/NXI.0000000000000110
- Zeng, X., Sun, X., Gao, L., Fan, Y., Ding, J., and Hu, G. (2007). Aquaporin-4 deficiency down-regulates glutamate uptake and GLT-1 expression in astrocytes. *Mol Cell Neurosci.* 34, 34–39. doi:10.1016/j.mcn.2006.09.008.
- Zerangue, N., and Kavanaugh, M. P. (1996). Flux coupling in a neuronal glutamate transporter. *Nature* 383, 634–637. doi: 10.1038/383634a0.
- Zettl, U. K., Stüve, O., and Patejdl, R. (2012). Autoimmunity Reviews Immune-mediated CNS diseases: A review on nosological classification and clinical features. *Autoimmun. Rev.* 11, 167–173. doi:10.1016/j.autrev.2011.05.008.
- Zhao, X., Marszalec, W., Toth, P. T., Huang, J., Yeh, J. Z., Narahashi, T. (2006). In vitro galantamine-memantine co-application: mechanism of beneficial action. *Neuropharmacology* 51, 1181–1191. doi: 10.1016/j.neuropharm.2006.08.007.
- Zhou, Y., and Danbolt, N. C. (2013). GABA and glutamate transporters in brain. *Front. Endocrinol. (Lausanne).* 4, 1–14. doi:10.3389/fendo.2013.00165.
- Zhou, Y., and Danbolt, N. C. (2014). Glutamate as a neurotransmitter in the healthy brain. *J. Neural Transm.* 121, 799–817. doi:10.1007/s00702-014-1180-8.
- Zimmer, E. R., Parent, M. J., Souza, D. G., Leuzy, A., Lecrux, C., Kim, H. I., et al. (2017). [¹⁸F]FDG PET signal is driven by astroglial glutamate transport. *Nat. Neurosci.* 20, 393–395. doi:10.1038/nn.4492.

Figure 1

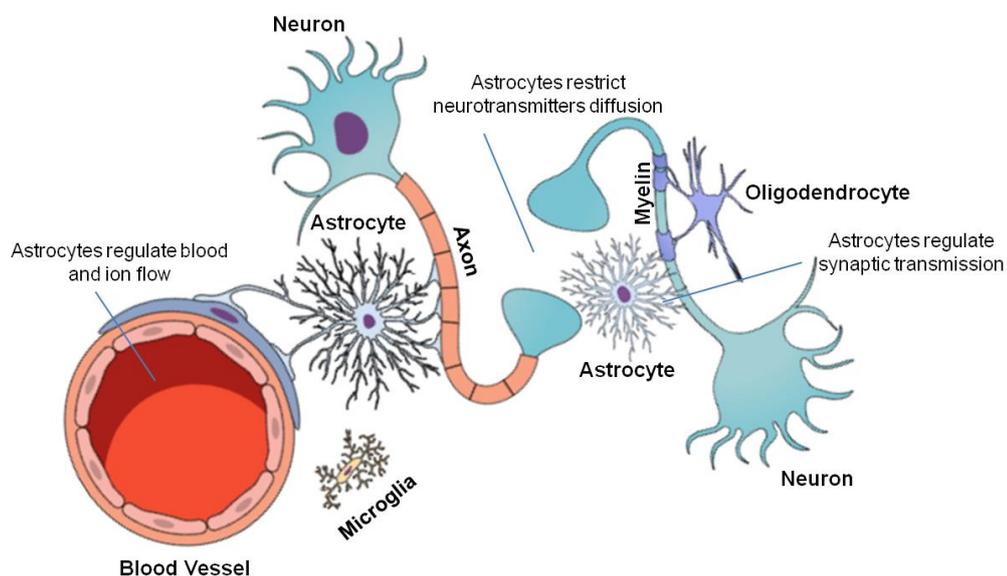


Figure 2

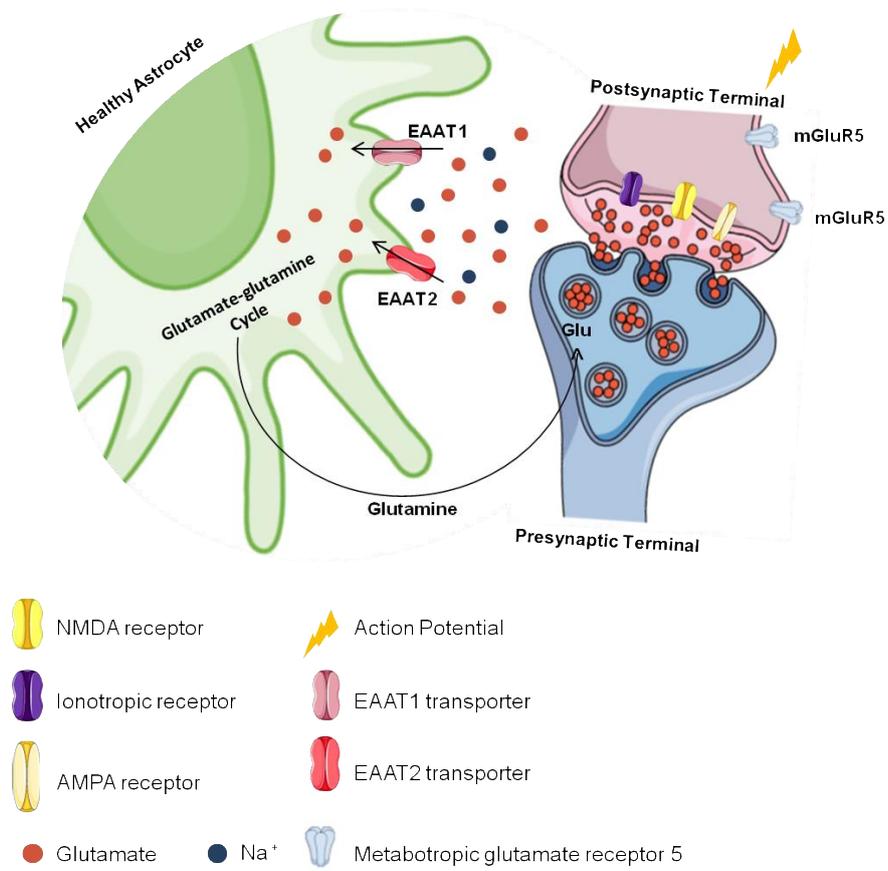
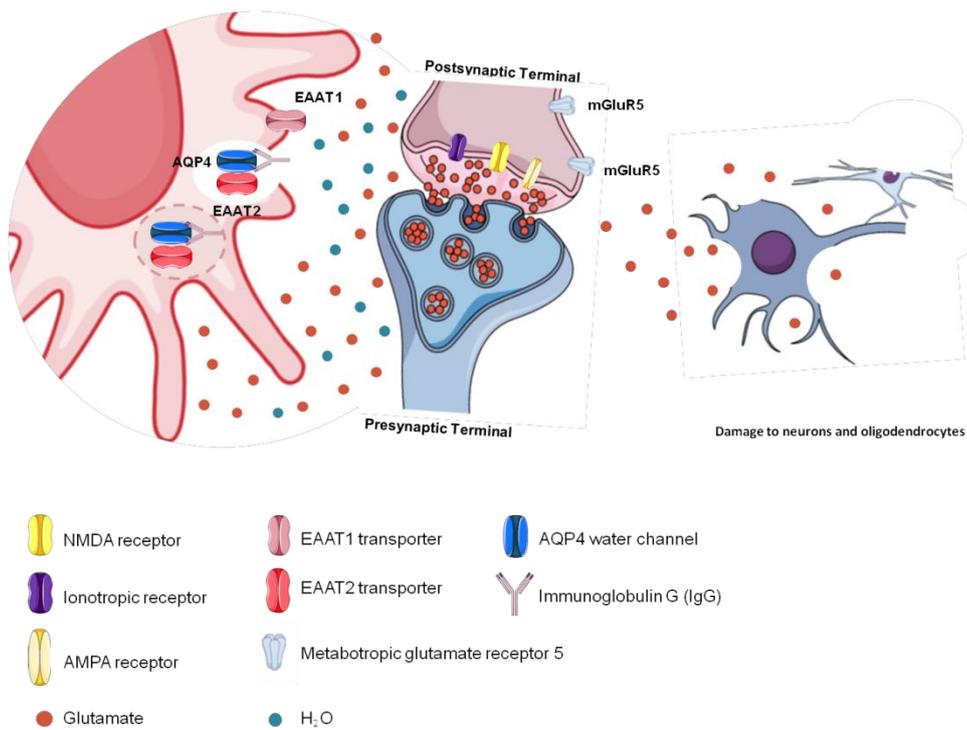


Figure 3



ANEXO 4 – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO

23/01/2019

E-mail de PUCRS - Frontiers: Your manuscript submission - 443612



Ana Paula Bornes Da Silva <ana.bornes@acad.pucrs.br>

Frontiers: Your manuscript submission - 443612

1 mensagem

Frontiers Cellular Neuroscience Editorial Office

17 de dezembro de 2018

<cellularneuroscience.editorial.office@frontiersin.org>

11:13

Responder a: Frontiers Cellular Neuroscience Editorial Office <cellularneuroscience.editorial.office@frontiersin.org>

Para: ana.bornes@acad.pucrs.br

Dear Dr Da Silva,

Frontiers Cellular Neuroscience Editorial Office has sent you a message. Please click 'Reply' to send a direct response

We are pleased to inform you that we have received the manuscript ""Role of Glutamatergic Excitotoxicity in Neuromyelitis Optica Spectrum Disorders"" to be considered for publication in Frontiers in Cellular Neuroscience.

You can access the review forum and track the progress of your manuscript using the following link:
<http://www.frontiersin.org/Journal/MySubmission.aspx?stage=100>

You will receive a notification as soon as the interactive review forum is activated and you receive access the review reports. You will then be able to interact directly with the reviewers in the interactive review forum and also re-submit a revised manuscript.

Best regards,

Your Frontiers in Cellular Neuroscience team

Frontiers | Cellular Neuroscience Editorial Office
www.frontiersin.org | twitter.com/FrontiersIn
 Avenue du Tribunal Fédéral 34
 1005 Lausanne, Switzerland | T +41 21 510 17 34

-----MANUSCRIPT DETAILS-----

Manuscript title: Role of Glutamatergic Excitotoxicity in Neuromyelitis Optica Spectrum Disorders

Manuscript ID: 443612

Submitted By: Douglas Kazutoshi Sato

Authors: Ana Paula Bornes Da Silva, Débora Guerini de Souza, Diogo Onofre Souza, Denise Cantarelli Machado, Douglas Kazutoshi Sato

Journal: Frontiers in Cellular Neuroscience

Research Topic: Glial Cells, Maladaptive Plasticity and Neurodegeneration: Mechanisms, Targeted Therapies and Future Directions

Article type: Review

Submitted on: 17 Dec 2018

-----ADDITIONAL INFORMATION-----

In order to enable a smooth and efficient review process, please familiarize yourself with the Frontiers review guidelines:

http://www.frontiersin.org/Journal/ReviewGuidelines.aspx?s=156&name=cellular_neuroscience

To take part in the Resource Identification Initiative please cite antibodies, genetically modified organisms, software tools, data, databases and services using the corresponding catalog number and RRID in the text of your article.

Please see here for more information: http://www.frontiersin.org/files/pdf/letter_to_author.pdf

ANEXO 5 – COMPROVANTE DE ACEITE DO ARTIGO



Ana Paula Bornes Da Silva <ana.bornes@acad.pucrs.br>

Frontiers: Congratulations! Your manuscript is accepted - 443612

1 mensagem

Frontiers Cellular Neuroscience Editorial Office

21 de março de 2019

<cellularneuroscience.editorial.office@frontiersin.org>

04:48

Responder a: Frontiers Cellular Neuroscience Editorial Office <cellularneuroscience.editorial.office@frontiersin.org>

Para: ana.bornes@acad.pucrs.br

Dear Dr Da Silva,

Frontiers Cellular Neuroscience Editorial Office has sent you a message. Please click 'Reply' to send a direct response

I am pleased to inform you that your manuscript Role of Glutamatergic Excitotoxicity in Neuromyelitis Optica Spectrum Disorders has been approved for production and accepted for publication in Frontiers in Cellular Neuroscience.

Manuscript title: Role of Glutamatergic Excitotoxicity in Neuromyelitis Optica Spectrum Disorders

Journal: Frontiers in Cellular Neuroscience

Article type: Review

Authors: Ana Paula Bornes Da Silva, Débora Guerini de Souza, Diogo Onofre Souza, Denise Cantarelli Machado,

Douglas Kazutoshi Sato

Manuscript ID: 443612

Edited by: Andrea Beatriz Cragnolini

Your manuscript is currently being prepared for production, and the abstract or introductory section is available online in provisional form. Please click here to access the final review reports and your manuscript directly:

<http://www.frontiersin.org/Review/EnterReviewForum.aspx?activationno=9065acd6-3a3c-48e6-a334-c03be6b7db8c>

You will be contacted as soon as the author proofs are ready for your revisions. Please do not communicate any changes until then.

As an author, it is important that you maintain your Frontiers research network (Loop) profile up to date, as your publication will be linked to your profile allowing you and your other publications to become more discoverable. You can update profile pages (profile pictures, short bio, list of publications) by clicking on this link:

<http://loop.frontiersin.org/people/>

Tell us what you think!

At Frontiers we are constantly trying to improve our Collaborative Review process and would like to get your feedback on how we did. Please complete our short 3-minute survey and we will donate \$1 to Enfants du Monde, a Swiss non-profit organization:

https://frontiers.qualtrics.com/jfe/form/SV_8q8kYmXRvxBH5at?survey=author&aid=443612&uid=633378

Thank you very much for taking the time to share your thoughts.

Best regards,

Your Frontiers in Cellular Neuroscience team

Frontiers | Cellular Neuroscience Editorial Office

www.frontiersin.org | twitter.com/FrontiersIn

Avenue du Tribunal Fédéral 34

1005 Lausanne, Switzerland | T +41 21 510 17 25

ANEXO 6 – COMPROVANTE DE PUBLICAÇÃO DO ARTIGO



Ana Paula Bornes Da Silva <ana.bornes@acad.pucrs.br>

Frontiers: Congratulations! Your article is published

1 mensagem

Frontiers Neuroscience Production Office <neuroscience.production.office@frontiersin.org> 12 de abril de 2019 05:20
 Responder a: Frontiers Neuroscience Production Office <neuroscience.production.office@frontiersin.org>
 Para: ana.bornes@acad.pucrs.br

Dear Ana Paula B. Da Silva,

Frontiers Neuroscience Production Office has sent you a message. Please click 'Reply' to send a direct response

Congratulations on the publication of your article: Role of Glutamatergic Excitotoxicity in Neuromyelitis Optica Spectrum Disorders, by Ana Paula Bornes Da Silva, Débora Guerini de Souza, Diogo Onofre Souza, Denise Cantarelli Machado, Douglas Kazutoshi Sato, published in Frontiers in Cellular Neuroscience, section Cellular Neuroscience Archive.

To view the online publication, please click here:

http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fncel.2019.00142/full?utm_source=Email_to_authors_&utm_medium=Email&utm_content=T1_11.5e1_author&utm_campaign=Email_publication&field=&journalName=Frontiers_in_Cellular_Neuroscience&id=443612

This article is an open access publication accessible to readers anywhere in the world. Share the link with your network and track the impact of your research with our Article and Author Impact Metrics. This includes metrics on citations, views and downloads, as well as the social media attention your article receives.

If you would like to order print copies of your article please check: <http://home.frontiersin.org/about/print-on-demand>

If you have not done so already, please update your Loop profile to maximise your readership:

http://loop.frontiersin.org/people/me/?utm_source=WFPOFAut&utm_medium=Email&utm_campaign=WF11.5E-1

Authors with fully populated profiles receive 4X more profile views and 6X more publication views.

We look forward to your future submissions!

Best regards,

Your Frontiers in Cellular Neuroscience Production team

Frontiers | Production Office
www.frontiersin.org | twitter.com/FrontiersIn
 Avenue du Tribunal Federal 34
 1005 Lausanne, Switzerland

For technical issues, please contact our IT Helpdesk - support@frontiersin.org

Can you take 30 seconds to respond to a quick survey so that we can continue to improve our service:

https://frontiers.eu.qualtrics.com/jfe/form/SV_eyw2LQ7Y4RSSokt