



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**



FIOCRUZ

Curso de Pos-Graduação em Patologia

TESE DE DOUTORADO

**INTERAÇÃO PARÁCRINA ENTRE CÉLULAS ENDOTELIAIS
CEREBRAIS E GLIAIS EM MODELOS *IN VITRO* DE BARREIRA
HEMATOENCEFÁLICA**

JULITA MARIA PEREIRA BORGES

**Salvador - Bahia
2018**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

Curso de Pós-Graduação em Patologia

**INTERAÇÃO PARÁCRINA ENTRE CÉLULAS ENDOTELIAIS
CEREBRAIS E GLIAIS EM MODELOS *IN VITRO* DE BARREIRA
HEMATOENCEFÁLICA**

JULITA MARIA PEREIRA BORGES

Orientador: Prof. Dr. Ramon dos Santos El-Bachá

Tese apresentada ao Curso de
Pós-Graduação em Patologia para
obtenção do grau de Doutor.

**Salvador - Bahia
2018**

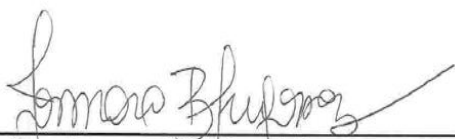
Título da Tese: "INTERAÇÃO PARÁCRINA ENTRE CÉLULAS ENDOTELIAIS CEREBRAIS E GLIAIS EM MODELOS *IN VITRO* DE BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA."

JULITA MARIA PEREIRA BORGES

FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 24 de abril de 2018

COMISSÃO EXAMINADORA



Dra. Josmara Bartolomei Fregoneze
Pesquisadora
UFBA



Dr. Bruno Solano de Freitas Souza
Pesquisador
IGM/Fiocruz



Dr. Fábio Rocha Formiga
Pesquisador
IGM/Fiocruz



Dra. Clarissa Araujo Gurgel Rocha
Pesquisadora
IGM/Fiocruz



Dr. Ramon dos Santos El-Bachá
Professor
UFBA

FONTE DE FINANCIAMENTO

CNPq

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais,
Matheus P. Neno e Matildes Borges Pereira
(Tezinha), símbolos de um amor incondicional.*

*Aos meus parceiros de estrada:
minha amada filha Lis P. Borges e o meu esposo amado,
Osmar Borges, pelo cuidado, compreensão e apoio.*

AGRADECIMENTOS

Muita gratidão a Deus, que detém a fórmula da vida e do amor, elementos essenciais à força da minha alma.

Aos professores que Deus colocou no meu caminho para ensinar-me a viver, sobreviver e a buscar incessantemente o conhecimento. Guardo-os no "meu coração".

Em oração peço a Deus saúde e proteção a todos.

Um agradecimento muito especial ao meu querido orientador prof. Dr Ramon dos Santos El-Bachá, portador de uma sabedoria brilhante, de um talento científico invejável e uma alma conhecedora das fraquezas e virtudes humanas. Sou muito grata pela confiança, pelos diálogos científicos e principalmente pela convivência na pesquisa.

À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia pela oportunidade da qualificação. Um lugar que traduz trabalho em energia na construção do conhecimento.

À Universidade Federal da Bahia e ao Instituto de Pesquisa Gonçalo Moniz - FIOCRUZ - BA, pelo programa PGPAT e pela busca contínua da excelência na formação de novos pesquisadores. Muito obrigada a todos os docentes do programa por apostarem em jovens cientistas. Meus cordiais agradecimentos à equipe da Biblioteca do IGM - Fiocruz Bahia, especialmente à Ana Maria F. V. Sampaio pela eficiência e cuidado com texto da tese. Agradeço também à Ana Carolina Sodré e Simone Farias Silva Fortunato por todo apoio na "linha de frente" do PGPAT.

Agradeço aos Neuroquímicos do LabNq: prof. Dr. Ramon El-Bachá, profa. Dra Maria de Fátima Costa, profa. Dra Silvia Costa, profa. Dra Elisabete Freire e prof. Dr Victor Diógenes. Estendo os meus agradecimentos a toda "família" LabNq. Muito obrigada pela acolhida, pelos ensinamentos, pela parceria e pela oportunidade de convivência num grupo de grandes pesquisadores. Com vocês aprendi que mentes diferentes constroem melhor o conhecimento. Não dá para separar porque cada um tem uma distinta contribuição no conjunto da obra.

Agradeço, em especial, aos meus amigos da UESB: o Dr Raphael Ferreira Queiroz, o Dr Daniel Melo e Dra Solange Di Paula, pelo incentivo e apoio.

Agradeço ao Claudio (plataforma de microscopia da FIOCRUZ) pela disponibilidade, conhecimento e companheirismo durante as análises e ao prof. Dr Jorge Clarêncio (Plataforma de citometria de fluxo - FIOCRUZ) por embarcar conosco nesta séria aventura chamada pesquisa.

Aos "meninos e meninas" do meu grupo de pesquisa, por tudo que aprendi convivendo com as adversidades e diferenças individuais: agradeço ao meu grande amigo Pietro Araújo, Isis Costa (a minha "pupila" querida, pelo apoio constante), Florisvaldo Ramos (nosso Beto), Verônica Sousa (por todo apoio na rotina do lab. e pela amizade), Jamile Conceição (uma amiga para longas jornadas), Daniela Amorim, Vanessa Freitas, Alana Farias e Mila Rosário. Cada um de vocês teve um importante papel na minha evolução profissional, espiritual e pessoal. Sou muito grata.

A Alessandra Bispo, Cleide Sousa, Eduardo Muniz, Monique Carneiro, Deivison Argolo, Socorro Granjeiro e Erica Novais, parceiros de pesquisa que Deus colocou no meu caminho. Eu tenho um verdadeiro amor e gratidão por vocês. Um agradecimento especial a Felipe Mendes e Rafael Short, meus mestres do *Wb*, pesquisadores brilhantes.

Ao grupo de estudo da patologia, liderado por Valdomiro Moitinho, por todo apoio durante as disciplinas, pelas descontrações nas horas difíceis, pelas festas no "zap" a cada conclusão no curso. Um grupo que significa união e apoio.

Um agradecimento aos pesquisadores do grupo da profa. Josmara Fragoneze pelo apoio durante a pesquisa. Com muito carinho a Daniele Ozório, José Silva, Lucilene Souza e Andrei Moiteiro.

À Lucia Fonseca, em especial, por ensinar-me a ter equilíbrio emocional e espiritual diante das forças desestabilizadoras. Um agradecimento ao Sr Carlos Tuche pela convivência e amizade. Com muito carinho, agradeço a Vanusa dos Santos por tanta dedicação em manter o ambiente sempre agradável e pelo sorriso largo de todas as manhãs.

À Léia Alexandre, por todo apoio, incentivo e preciosa amizade.

Sou muito grata aos meus irmãos (José Luis, Carlos Aparecido, Ana Irene (sempre presente no meu coração), Verônica Lília, Celeste Mônica, Mércia Ariane, Thiago Aurélio e Ana Tayná), cunhados(as) e sobrinhos(as) amados(as). Em especial a Verônica Lília, por todo apoio à minha filha durante a primeira etapa deste trabalho. Vocês são o gatilho da minha motivação.

À Maria Nilsa Borges, pelas orações.

BORGES, Julita Maria Pereira. Interação parácrina entre células endoteliais cerebrais e gliais em modelos *in vitro* de barreira hematoencefálica. 166 f. il. Tese (Doutorado em Patologia Humana) - Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2018.

RESUMO

INTRODUÇÃO: Células endoteliais cerebrais (CEC) e astrócitos são as principais células que compõem a barreira hematoencefálica (BHE) e conferem seletividade à entrada de substâncias no cérebro por ação da barreira metabólica. O desequilíbrio nesta seletividade predispõe o SNC às doenças neurodegenerativas e câncer. **OBJETIVO:** Este trabalho objetivou avaliar a interação parácrina entre CEC e células gliais modulando os mecanismos detoxificadores da BHE *in vitro*, em condições fisiológicas e patológicas. **METODOLOGIA:** Foi verificada a toxicidade do catecol sobre CEC, astrócitos e microglia. Foi analisada a modulação do meio condicionado por astrócitos (MCAst) sobre as CEC, por CEC (MCCEC) sobre astrócitos e por microglia (MCMG) sobre os astrócitos. Foi avaliada a interação parácrina entre CEC e células gliais, na diferenciação e proliferação de CEC. Foi verificada a interação parácrina entre CEC e astrócitos na citotoxicidade induzida pelo catecol, observando-se a expressão de isoformas das enzimas UDP-glucuroniltransferase 1A6 (UGT1A6) e glutation-S-transferase pi (GSTpi), e da glicoproteína P de efluxo (gpP) através de análises por citometria de fluxo, imunocitoquímica e *Western Blotting*. Propôs-se avaliar a espoliação de glutation reduzido (GSH) pelo catecol em CEC na presença de MCAst e em células GL-15 de glioblastoma humano interagindo com CEC. Foi avaliada a genotoxicidade pelo catecol sobre astrócitos e CEC e sua modulação por meio condicionado por CEC e astrócitos respectivamente. **RESULTADOS:** Os resultados demonstraram que o MCAst, o meio condicionado por células C6 de glioma de ratos (MCC6) e MCMG induzem a proliferação e alterações morfológicas em CEC quiescentes. As CEC são resistentes ao dano pelo catecol. Catecol é citotóxico para os astrócitos. O MCCEC confere citoproteção aos astrócitos frente ao dano pelo catecol, aumentando a expressão de GSTpi e diminuindo as lesões de DNA. As CEC protegem as GL-15 contra a espoliação de GSH pelo catecol. O meio condicionado pelos astrócitos aumenta a expressão de GSTpi e protege as CEC da espoliação de GSH induzida pelo catecol. Astrócitos infectados por *N. caninum* (*Nc*) apresentaram aumento na expressão dos genes das citocinas (IL10 e TNF) e do gene do fator de crescimento de nervos (NGF), diminuição dos genes do fator neurotróficos derivado do cérebro (BDNF) e fator neurotrófico derivado da glia (GDNF). O meio condicionado por astrócitos infectados por *Nc* levou a superexpressão de TNF e supressão gênica de BDNF, GDNF e NGF em CEC. **CONCLUSÕES:** Entende-se que as CEC e astrócitos interagem entre si independente do dano, porém resulta em citoproteção quando há agressão. Os mecanismos detoxificadores são ativados nas células, induzidos por moléculas presentes no meio condicionado. Esta interação existe independente do contato físico, uma perspectiva no entendimento da BHE e doenças que atingem o SNC.

Palavras-chave: Astrócitos; célula endotelial cerebral; barreira hematoencefálica; microglia

BORGES, Julita Maria Pereira. Paracrine interaction between endothelial cerebral cells and glial cells in models of blood-brain barrier in vitro. 166 f.il. Tese (Doutorado em Patologia Humana) – Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2018.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Cerebral endothelial cells (CEC) and astrocytes confer selectivity in the entry of harmful substances into the brain through the blood-brain barrier (BBB), mainly by the action of a metabolic barrier. The imbalance in this selectivity predisposes the CNS to neurodegenerative diseases and cancer. **OBJECTIVE:** The objective of this work was to evaluate the paracrine interaction between CEC and glial cells modulating the detoxifying mechanisms of the BBB in vitro, under physiological and pathological conditions. **METHODOLOGY:** The paracrine interaction between CEC and glial cells was tested by observing morphological alterations and proliferation of CEC. The catechol toxicity to CEC, astrocytes and microglia was also verified. The modulation of CEC by astrocyte-conditioned medium (MCAst), of astrocytes by CEC-conditioned medium (MCCEC), and by microglia-conditioned medium (MCMG) was analyzed. We verified the interaction of CEC and astrocytes on the expression of the isoforms of the enzymes UDP-glucuronyltransferase 1A6 (UGT1A6), and glutathione-S-transferase pi (GSTpi), and on the efflux glycoprotein P (gpP) during catechol-induced damages, by flow cytometry, immunocytochemistry and Western Blotting. The depletion of GSH by catechol in CEC in the presence of MCAst and in human glioblastoma GL-15 cells interacting with CEC was evaluated. Catechol genotoxicity to astrocytes and CEC and its modulation by MCCEC and MCAst were also evaluated. **RESULTS:** The results demonstrated that MCAst, rat glioma C6 cells-conditioned medium (MCC6), and MCMG induce proliferation and morphological alterations in quiescent CEC. Catechol is cytotoxic to astrocytes. However, CEC is resistant to catechol-induced damages. The MCCEC leads to cytoprotection of astrocytes against catechol-induced damages, increasing the expression of GSTpi and UGT1A6 isoforms, and protected against increased DNA damages. MCCEC also protected GL-15 cells against GSH depletion induced by catechol. MCAst increases the expression of GSTpi and protects CEC against GSH depletion induced by catechol. Astrocytes infected by *Neospora caninum* (Nc) increased the expression of cytokines (IL10 and TNF) and nerve growth factor (NGF), but decreased the expression of the neurotrophic factors BDNF and GDNF. Infected astrocytes-conditioned medium lead to overexpression of TNF and reduction of BDNF, GDNF and NGF in CEC. **CONCLUSION:** Although CEC and astrocytes interact in physiological conditions, this interaction results in cytoprotection in the presence of damages. In damage conditions, molecules that are present in the conditioned medium activate detoxifying mechanisms. This interaction exists independent of physical contact, giving a new perspective on the understanding of BBB and diseases affecting the CNS.

Key words: Astrocytes, Cerebral endothelial cell, Blood Brain-Barrier, microglia

LISTA DE FIGURAS.

Figura 1	Formação do catecol, quinonas e superóxidos a partir do benzeno. Modificado de Melikian et al., 2013.....	41
Figura 2	Caracterização do grau de lesão dos Cometas.....	66
Figura 3	Padrão de medidas do cometa. Imagem obtida por microscópio de fluorescência do cometa formado pelos núcleos, de astrócitos, marcados com Gel red.	66
Figura 4	Alteração morfológica e proliferação de CEC induzidas por meio condicionado por astrócitos. A e E - células quiescentes, no vigésimo dia de cultivo em meio DMEM HAM F12. B - CEC no sétimo dia após modulação com MCAst 50% (v/v); C - CEC no décimo quarto dia após modulação com MCAst 50% (v/v); D - CEC no décimo quinto dia após modulação com MCAst 50% (v/v). Setas brancas mostram células livres, com volume celular aumentado. Setas pretas apontam células diferenciadas. Microscópio de contraste de fase, Barra equivalente a 100 μ m.....	73
Figura 5	Alteração morfológica e proliferação de CEC induzidas por meio condicionado por astrócitos. A - células quiescentes, no vigésimo dia de cultivo em meio DMEM HAM F12. B - CEC no sétimo dia após modulação com MCAst100% (v/v); C - CEC no décimo quarto dia após modulação com MCAst 100% (v/v); D - CEC no décimo quinto dia após modulação com MCAst 100% (v/v). Setas brancas mostram células livres, com volume celular aumentado. Setas pretas apontam células diferenciadas. Microscópio de contraste de fase, Barra equivalente a 100 μ m.....	74
Figura 6	Alteração morfológica e proliferação de CEC induzidas pelo meio condicionado por glioma murino (MCC6). A - CEC quiescentes, após 20 dias de cultivo em DMEM HAM F12. B - CEC no oitavo dia após modulação com MCC6 a 50% (v/v); C - CEC no décimo quarto dia após modulação com MCC6 a 50% (v/v); D - CEC no décimo quinto dia após modulação com MCC6 a 50% (v/v). Setas brancas mostram células livres, com volume celular aumentado. Setas pretas apontam células diferenciadas. Microscopia de contraste de fase. Barra equivalente a 100 μ m.....	75
Figura 7	Alteração morfológica e proliferação de CEC induzidas pelo meio condicionado por glioma murino (MCC6). A - CEC quiescentes, após 20 dias de cultivo em DMEM HAM F12. B - CEC no oitavo dia após modulação com MCC6 a 100% (v/v); C - CEC no décimo quarto dia após modulação com MCC6 a 100% (v/v); D - CEC no décimo quinto dia após modulação com MCC6 a 100% (v/v). Setas brancas mostram células livres, com volume celular aumentado. Setas pretas apontam	

	células diferenciadas. Microscopia de contraste de fase. Barra equivalente a 100 μm	76
Figura 8	Alteração morfológica de CEC por estímulo dos meios condicionados por astrócitos e glioma. A e B - CEC em meio de cultivo DMEM HAM F12 nos aumentos de 20 e 40x; C - CEC em MCAst a 50% (v/v); D - CEC em MCAst a 100%; E - CEC em MCC6 a 50% (v/v); F - CEC em MCC6 a 100%. Imunomarcção para Fator VIII de vonWillebrand (verde), marcação de núcleos com DAPI (azul). Barra equivalente a 100 μm	77
Figura 9	Alteração morfológica de CEC induzida pelo meio condicionado por microglia. A - CEC em DMEM HAM F12 no 20º dia de cultivo após isolamento; B - CEC após 3º dia em cultivo em MCMG 50% (v/v); C - CEC após 19º dia de cultivo em MCMG a 50% (v/v). Imagens obtidas por microscópio de contraste de fase. Barra equivalente a 100 μm	79
Figura 10	Alteração morfológica de CEC em meio EGM-2 a 50% (v/v) em DMEM HAM F12. A - CEC em DMEM HAM F12 no 20º dia de cultivo após isolamento; B - CEC após 3º dia de cultivo em meio EGM-2 a 50% (v/v) em DMEM HAM F12; C - CEC após 19º dia de cultivo meio EGM-2 a 50% (v/v) em DMEM HAM F12. Imagens obtidas por microscópio de contraste de fase. Barra equivalente a 100 μm	80
Figura 11	Cultura primária de CEC positivas para fator VIII. Imunomarcção para GFAP (vermelho), fator VIII (verde) e marcação de núcleos com DAPI. Imagem obtida em microscópio de fluorescência. Barra equivalente a 100 μm	81
Figura 12	Evolução da cultura primária de CEC em meio EGM a 50% (v/v) em DMEM HAM F12. A - CEC no terceiro dia após o isolamento celular; B - CEC no 7º dia de cultivo; C - CEC no 9º dia de cultivo. Imagens obtidas em microscópio de contraste de fase. Setas brancas (\rightarrow) apontando células diferenciadas. Barra equivalente a 100 μm	82
Figura 13	Subcultivo de CEC em meio EGM a 50% (v/v) em DMEM HAM F12. A - Cultura primária de CEC antes da tripsinização. B - Cultura de CEC no terceiro dia de cultivo após tripsinização; C - Cultura de CEC no 5º dia de cultivo após tripsinização. Imagens obtidas em microscópio de contraste de fase Barra equivalente a 100 μm	83
Figura 14	Efeito do catecol sobre astrócitos isolados e formação de quinonas. A - Protocolo de cultivo 1 (P1): Astrócitos isolados de cultivo com remoção precoce da microglia. B - Protocolo de cultivo 2 (P2) – Astrócitos isolados de cultivo com remoção tardia da microglia (após 7 dias de cultivo). As células foram incubadas com catecol (10 - 2000 μM) por 72 h nas duas condições. Os gráficos representam o experimento com valor de EC50 próximo às medianas que foram de 82 μM (variação: 11-122	

µM) para o protocolo P1 e de 229 µM (variação: 143 - 873 µM) para o protocolo P2. (●) Viabilidade celular e (■) formação de quinonas. Os dados representam distribuição não normal, representados por mediana e variação, analisados por Kruskal-Wallis seguido por teste de comparação Dunns. Significância estatística: (*) p<0,01; (**) p<0.001; (***) p<0.0001 comparada com o controle do solvente (5 × 10⁻⁴ M de HCl).....

85

Figura 15 Comparação da resposta dos astrócitos, isolados por protocolos de cultivo P1 e P2, ao catecol. Protocolo de cultivo 1 (P1) – Astrócitos em cultivo com remoção precoce da microglia (cada 48 h). Protocolo de cultivo 2 (P2) – Astrócitos em cultivo com remoção tardia da microglia (após 7 dias de cultivo). As células foram expostas ao catecol entre 10-2000 µM, por 72 h. Os dados representam a mediana da EC₅₀, os percentis 25 e 75 limitando o quadrilátero e a variação representada pelos extremos das barras (n = 8). Os grupos foram comparados com Mann-Whitney, teste não paramétrico. Significância estatística: (***) p < 0,0001.....

86

Figura 16 Glutamina Sintetase em astrócitos cultivados em diferentes protocolos. **A** - Protocolo de cultivo 1 (P1) – Expansão de astrócitos em meio DMEM HAM F12, com remoção precoce da microglia (a cada 48 h). **B** - Protocolo de cultivo 2 (P2) – Expansão de astrócitos em meio DMEM HAM F12, com remoção tardia da microglia (após 7 dias de cultivo). Marcação de núcleos com DAPI. Barra equivalente a 100 µm.....

86

Figura 17 Alterações morfológicas induzidas por catecol em astrócitos P1. Astrócitos com remoção precoce da microglia (a partir de 48 h do isolamento) (P1). **A** - Controle; **B** - Astrócitos expostos a 100 µM de catecol; **C** - Astrócitos expostos a 300 µM de catecol; **D** - Astrócitos tratados com GSH a 3,5 mM; **E** - Astrócitos expostos a 100 µM de catecol e GSH a 3,5 mM; **F** - Astrócitos expostos a 300 µM de catecol e GSH a 3,5 mM. Tempo de exposição 72 h. Imunocitoquímica para GFAP (vermelho) e OX42 (verde), marcação de núcleos com DAPI (azul) Análises por microscopia confocal. Barra equivalente a 50.1 µm.....

87

Figura 18 Reatividade astrocitária induzida pelo catecol em astrócitos isolados em meio DMEM HAM F12, com remoção tardia da microglia (após 7 dias de cultivo) (P2). **A** - Controle; **B** - Astrócitos expostos a 100 µM de catecol; **C** - Astrócitos expostos a 300 µM de catecol; **D** - Astrócitos expostos a GSH a 3,5 mM; **E** - Astrócitos expostos a 100 µM de catecol e GSH a 3,5 mM; **F** - Astrócitos expostos a 300 µM de catecol e GSH a 3,5 mM. Tempo de exposição: 72 h. Imunocitoquímica para GFAP (vermelho) e OX42 (verde), marcação de núcleos com DAPI (azul). Análises por microscopia confocal. Barra equivalente a 50,1 µm.....

88

Figura 19 Citotoxicidade do catecol aos astrócitos P1 modulados por MCMG a

20% (v/v). Exposição celular por 72 h ao catecol nas concentrações entre 10 - 2000 μM em MCMG a 20% (v/v). A figura mostra os dados do experimento com EC50 correspondente à mediana de 656 μM (variação: 574 - 675 μM n = 3). (●) Viabilidade celular e (■) formação de quinonas. Os dados representam distribuição não normal, representados por mediana e variação, analisados por *Kruskal-Wallis* seguido por teste de comparação de Dunns. Experimento em triplicata. Significância estatística: (**) $p < 0,001$; (***) $p < 0,0001$ comparada com o controle do solvente (5×10^{-4} M de HCl).....

89

Figura 20 Citotoxicidade do catecol aos astrócitos P1 modulados por MCMG a 50% (v/v). Astrocitos do protocolo 1 (com remoção precoce da microglia) foram expostos ao catecol nas concentrações de 10-2000 μM em MCMG a 50% (v/v), por 72 h. Controle do solvente (5×10^{-4} M de HCl). (●) Viabilidade celular e (■) formação de quinonas. Os dados apresentam distribuição não normal, representados por mediana e variação, analisados por *Kruskal-Wallis* seguido por teste de comparação Dunns. O gráfico representa um dos experimentos realizados em triplicata.....

90

Figura 21 Influência do meio condicionado da microglia sobre morfologia dos astrócitos P1 expostos ao catecol. **A** - Cultura primária dos astrócitos cultivados sem microglia (P1) em DMEM HAM F12; **B** - Astrócitos em DMEM HAM F12 com 100 μM de catecol; **C** - Astrócitos em DMEM HAM F12 com 300 μM de catecol; **D** - Astrócitos em MCMG a 20% (v/v); **E** - Astrócitos em MCMG 20% (v/v) com 100 μM de catecol; **F** - Astrócitos em MCMG 20% (v/v) com 300 μM de catecol. Tempo de exposição 72 h. Imunocitoquímica para GFAP (vermelho) e OX42 (verde), marcação de núcleos com DAPI (azul). Seta branca aponta célula com citoesqueleto desorganizado. Análises por microscopia confocal. Barra equivalente a 50,1 μm

91

Figura 22 Expressão dos genes da β -actina e HPRT em astrócitos isolados do protocolo P1 e P2. **A** - Expressão do gene da β -actina. **B** - Expressão do gene da HPRT. Análise por qRT-PCR (n= 3).....

92

Figura 23 Efeito do catecol sobre a expressão gênica dos fatores neurotróficos em cultura de astrócitos isolados do protocolo P1 e P2. **A** - Expressão do gene de GDNF; **B** - Expressão do gene de BDNF; **C** - Expressão do gene de NGF; Exposição do catecol em 100 e 300 μM por 72 h. Análise por qRT-PCR. Os dados são mostrados em mediana e variação de $2^{-\Delta\text{CT}}$ (n = 3). A expressão dos níveis gênicos é normalizada pela expressão dos genes de HPRT.....

93

Figura 24 Expressão dos genes de IL-1 β e IL-10 em astrócitos isolados do P1 e P2. **A** - Expressão gênica de IL-1 β e **B** - Expressão gênica de IL-10. Modulação pelo catecol nas concentrações de 100 μM ou 300 μM por 72 h. Análise por qRT-PCR. Dados são mostrados como mediana e variação de $2^{-\Delta\text{CT}}$ (n = 3). Expressão dos níveis gênicos normalizados por HPRT.....

94

- Figura 25** Modulação do meio condicionado de CEC na citotoxicidade do catecol (10 - 2000 μ M) em astrócitos após 72 h. A - Controle: astrócitos cultivados em meio DMEM HAM F12; B - Astrócitos cultivados em MCCEC 50% (v/v); e C - Astrócitos em 100% MCCEC; Os gráficos representam os dados do experimento com EC50 próxima à mediana. Os dados apresentam distribuição não normal, representados por mediana e variação, analisados por Kruskal-Wallis seguido por teste de comparação Dunns. Significância estatística mostrada como (*) $p < 0,01$; (**) $p < 0,001$; (***) $p < 0,0001$ comparada com o controle tratado com 5×10^{-4} M de HCl..... 96
- Figura 26** Meio condicionado de CEC confere resistência à toxicidade pelo catecol em astrócitos. Os dados são representados pelas medianas, percentis 75% e 25% e variações para os grupos em meio DMEM HAM F12 (n = 8), em 50% de meio condicionado por CEC (n = 8) e em 100% de meio condicionado por CEC (n = 9). O tempo de exposição foi de 72 h. Comparações entre dois grupos foram feitas com o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Significância (***) $p < 0,0001$ comparada com o grupo exposto ao catecol em meio DMEM HAM F12..... 97
- Figura 27** Aspectos morfológicos das culturas primárias de astrócitos expostos ao catecol (100 μ M, 300 μ M e 2000 μ M) por 72 h: A - Astrócitos em meio DMEM HAM F12 com 5×10^{-4} M de HCl; B, C e D - Astrócitos em meio DMEM HAM F12 e catecol dissolvido em 5×10^{-4} M de HCl; E - Astrócitos em meio MCCEC 50% (v/v); F, G e H - Astrócitos em MCCEC a 50% (v/v) e catecol; I - Astrócitos em MCCEC a 100% com 5×10^{-4} M de HCl; J e K, L - Astrócitos em meio MCCEC 100% e catecol. Setas brancas mostram aglomerados celulares. Pontas de setas apontam fragmentos celulares. Microscopia de contraste de fase. Barra equivalente a 100 μ m..... 98
- Figura 28** Modulação de GFAP em astrócitos modulados com meio condicionado por CEC. A - Astrócitos em meio DMEM HAM F12 com 5×10^{-4} M de HCl; B - Astrócitos tratados com 20 μ M de catecol em meio DMEM HAM F12; C - Astrócitos tratados com 20 μ M de catecol em MCCEC 50% (v/v); D - Astrócitos tratados com 20 μ M de catecol em MCCEC100%. E - Intensidade de fluorescência da marcação de GFAP por número de astrócitos. Dados obtidos de teste em triplicata. Análise pelo teste de "Kruskal-Wallis", seguido do teste de "Dunn's" para múltiplas comparações. Significância (*) $p < 0,01$. Imunomarcador para microglia (verde) OX42, para astrócitos (vermelho) GFAP e DAPI é um marcador de núcleos (em azul). Imagens obtidas por Microscopia confocal após imunocitoquímica. Barra correspondente a 50,1 μ m..... 99
- Figura 29** Tipo de morte celular induzida por catecol em astrócitos. À esquerda observa-se astrócitos (controle), não tratados; à direita astrócitos expostos

a 40 μM de catecol, por 72 h. As células foram marcadas com Anexina V/Iodeto de Propídio. No Q1 observa-se células em necrose; em Q2 à direita, observa-se células em apoptose tardia; em Q3, células viáveis; em Q4 células que morreram por apoptose. Análise por citometria de fluxo. Os experimentos foram realizados em triplicata..... 100

Figura 30 Efeito do catecol na atividade mitocondrial de CEC. ● CEC em meio de cultura DMEM HAM F12; ■ CEC em MCAst 50% (v/v) e catecol; ▲ CEC em MCAst 100%. Exposição ao catecol nas concentrações de 30 - 6000 μM , por 72 h. Os dados foram normalizados para os dados do controle negativo (dilúente do catecol, HCl a 5×10^{-4} M), cujas medianas foram consideradas como 100%. O experimento foi feito em triplicata com 8 repetições por concentração. Os dados têm distribuição não normal e estão expressos em medianas e variações. O teste de Kruskal-Wallis não demonstrou diferença significativa entre as concentrações testadas e o grupo controle..... 102

Figura 31 Produção de quinonas por CEC expostas ao catecol. ● CEC em meio de cultura DMEM HAM F12; ■ CEC em MCAst 50% (v/v) e catecol; ▲ CEC em MCAst 100%. Exposição ao catecol nas concentrações de 30 - 6000 μM , por 72 h. Os dados foram normalizados para o controle negativo (dilúente do catecol, HCl a 5×10^{-4} M) cujas medianas foram consideradas como 100%. O experimento foi feito em triplicata, com 8 repetições por concentração. Os dados têm distribuição não normal e estão expressos em medianas e variações. Análises foram feitas com o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Significância estatística * $P < 0,01$ entre grupo modulado pelo MCAst 50% e CEC em DMEM HAM F12..... 102

Figura 32 Aspectos morfológicos das culturas primárias de CEC expostas ao catecol em MCAst. Exposição a 100 μM , 1000 μM e 6000 μM de catecol, por 72 h. A - CEC em meio DMEM HAM F12 com 5×10^{-4} M de HCl; B, C e D - CEC em meio DMEM HAM F12 e catecol; E - CEC em meio MCAst 50% (v/v) com 5×10^{-4} M de HCl; F, G e H - CEC em meio MCAst 50% (v/v) e catecol; I - CEC em MCAst 100% com 5×10^{-4} de HCl; J e K, L - CEC em meio MCAst 100% e catecol. Aglomerados celulares mostrados pela seta branca e fragmentos celulares pela seta preta. Microscopia de contraste de fase. Barra equivalente a 100 μm 104

Figura 33 Tipo de morte celular induzida por catecol em CEC. À esquerda, células não tratadas (controle); à direita, CEC expostas a 3000 μM de catecol; As células foram marcadas com Anexina V/Iodeto de Propídio. No quadrante superior à esquerda células em necrose; no quadrante superior à direita células em apoptose tardia; no quadrante inferior à esquerda, células viáveis; no quadrante inferior à direita, células que morreram por apoptose. Análise por citometria de fluxo. Os experimentos foram realizados em triplicata..... 105

- Figura 34** Expressão de GSTpi em CEC na interação com meio condicionado por astrócitos e exposição a 3000 μM de catecol por 72 h. A - Histogramas dos grupos de tratamento: CEC em meio DMEM HAM F12 com 5×10^{-4} M de HCl (controle); CEC expostas a 3000 μM de catecol em DMEM HAM F12; CEC expostas a 3000 μM de catecol em MCAst 50% (v/v); CEC expostas a 3000 μM de catecol em MCAst 100%. B - Média da intensidade de fluorescência (MFI) da GSTpi. C - Percentual de CEC imunomarcadas para GSTpi. Análise por citometria de fluxo, (n = 3). Comparações entre grupos foram feitas com o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Significância * P < 0,01 comparada com Catecol a 3000 μM 107
- Figura 35** Expressão de GSTpi em astrócitos modulados por CEC no dano pelo catecol. A - Astrócitos em DMEM HAM F12 com 5×10^{-4} M de HCl (controle); B - Astrócitos em DMEM HAM F12 expostos a 20 μM de catecol; C - Astrócitos em MCCEC a 50% (v/v) expostos a 20 μM de catecol; D - Astrócitos em MCCEC a 100% expostos a 20 μM de catecol. E - Intensidade de fluorescência da imunomarcção para GSTpi por astrócitos. Comparações entre grupos foram feitas com o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Significância estatística (*) P < 0,01 comparada com o grupo tratado com o catecol sem o MCCEC. Imagens obtidas por microscopia confocal. Barra equivalente a 50,1 μm 108
- Figura 36** Imunomarcção de UGT1A6 em CEC moduladas com meio condicionado por astrócitos e expostas a 3000 μM de catecol por 72 h. A - Histogramas dos grupos de tratamento: CEC em DMEM HAM F12 com 5×10^{-4} M de HCl (controle); CEC em meio DMEM HAM F12 e catecol; CEC em MCAst 50% (v/v) e catecol; CEC em MCAst 100% e catecol. B - Média da intensidade de fluorescência (MFI) da UGT1A6. C - Porcentagem das CEC imunomarcadas para UGT1A6. Análise por citometria de fluxo. Comparações entre grupos foram feitas com o teste não paramétrico de Mann-Whitney (n = 3)..... 109
- Figura 37** Imunomarcção para UGT1A em astrócitos modulados por meio condicionados por CEC e expostos a 20 μM de catecol por 72 h. A - Astrócitos em meio DMEM HAM F12 com 5×10^{-4} M de HCl (controle); B - Astrócitos em meio DMEM HAM F12 e 20 μM de catecol; C - Astrócitos em MCCEC a 50% (v/v) e 20 μM de catecol; D - Astrócitos em MCCEC 100% e 20 μM de catecol; E- Intensidade de fluorescência (UGT1A6) por número de astrócitos. Comparações entre grupos foram feitas com o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Dados obtidos em triplicata. Setas amarelas (\rightarrow) apontando pontes cromossômicas e setas brancas apontando micronúcleos. Microscopia confocal. Barra equivalente a 50,1 μm 110
- Figura 38** Expressão de UGT1A6 em astrócitos. A: - Astrócitos em meio DMEM HAM F12 com 5×10^{-4} M de HCl (controle); Astrócitos em meio DMEMHAM F12 e 20 μM de catecol por 72 h; Astrócitos em MCCEC a

50% (v/v) e 20 µM de catecol; Astrócitos em MCCEC 100% tratados com 20 µM de catecol; B, Imagem do *western blotting* mostrando a expressão da UGT1A6 de astrócitos na exposição ao catecol e modulados por CEC (5 µg de proteínas/poço). A β-actina foi utilizada como proteína controle da deposição. Comparações entre grupos foram feitas com o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Os dados representam a mediana de cada grupo, obtida em testes independentes, n = 3. Significância estatística (*) p < 0,01 comparada com o controle.....

111

Figura 39 Expressão de gp-P em CEC moduladas com meio condicionado por astrócitos expostos a 3000 µM de catecol por 72 h. A - Histogramas dos grupos de tratamento: 1- CEC em DMEM HAM F12 com 5×10^{-4} M de HCl (controle); 2 - CEC em meio DMEM HAM F12 e catecol; 3 - CEC em MCAst 50% (v/v) e de catecol; 4 - CEC em MCAst 100% e 3000 µM de catecol. B - Média de intensidade de fluorescência; C- Frequência de células imunomarcadas para gp-P. Análise por citometria de fluxo. Teste realizado em triplicata, análise de distribuição não normal, teste de Mann-Whitney. Significância estatística mostrada (*) p < 0,01.....

112

Figura 40 Modulação de gp-P em CEC com meio condicionado por astrócitos expostos a 3000 µM catecol por 72 h. A - CEC em DMEM HAM F12; B- CEC em MCAst a 50%; C – CEC em MCAst a 100%; D – CEC e catecol em DMEM HAM F12; E – CEC em MCAst a 50% e catecol; F – CEC em McAst a 100% e catecol. Microscopia de fluorescência. Barra equivalente a 100 µm.....

113

Figura 41 Imunocitoquímica para gp-P em CEC modulada com MCC6. A – CEC em DMEM HAM F12; B – CEC em MCC6 50% (v/v); C – CEC em MCC6 100%; Modulação por 72 h. Barra equivalente a 100 µm.....

115

Figura 42 Imunomarcção de gp-P em astrócitos expostos a 20 µM de catecol. A - Histogramas dos grupos de tratamento: astrócitos em meio DMEM HAM F12 com 5×10^{-4} M de HCl (controle); astrócitos em meio DMEM HAM F12 e catecol; Astrócitos em MCCEC 50% (v/v) e catecol; Astrócitos em MCCEC100% e catecol em MCCEC100%. B - Média de intensidade de fluorescência da gp-P; C- Porcentagem dos astrócitos Imunomarcados para gp-P. Análise por citometria de fluxo. Teste realizado em triplicata, análise de distribuição não normal, teste de *Mann-Whitney*.....

115

Figura 43 Imunomarcção para gp-P em astrócitos induzida por catecol: A - Astrócitos em meio DMEM HAM F12 com 5×10^{-4} M de HCl; B - Astrócitos em meio DMEM HAM F12 com 20 µM de catecol; C - Astrócitos em MCCEC 50% (v/v) com 20 µM de catecol; D - Astrócitos em MCCEC 100% com 20 µM de catecol; E - Intensidade de fluorescência (gp-P) por número de células astrócitos - Análise por microscopia confocal. Dados obtidos em triplicata, distribuição não normal, teste de *Mann-Whitney*. Significância estatística (*) p < 0.01.....

116

- Figura 44** Espoliação de GSH pelo catecol a 3000 μM , por 72 h, em CEC. A - CEC em meio DMEM HAM F12 com 5×10^{-4} M de HCl (controle); B - CEC em meio DMEM HAM F12 e 1 mM de BSO; C- CEC exposta a catecol em meio DMEM HAM F12; D - CEC em MCAst a 50% (v/v) e catecol; E - CEC em MCAst a 100% e catecol. As imagens foram obtidas por microscopia de fluorescência e são representativas de diferentes campos da placa. Barra equivalente a 100 μm 117
- Figura 45** Espoliação de GSH pelo catecol a 600 μM por 72 h em GL-15 (teste MCB). A - Células GL-15 em meio DMEM HAM F12 com 5×10^{-4} M de HCl (controle negativo); B - Células GL-15 expostas a 1 mM de BSO em meio DMEM HAM F12 (controle positivo); C- GL-15 expostas a catecol em meio DMEM HAM F12; D - GL-15 expostas a catecol em MCCEC 50% (v/v); E - As GL-15 expostas a catecol em MCCEC a 100%. As imagens obtidas por microscopia de fluorescência são representativas de diferentes campos da placa. A barra corresponde a 100 μm 118
- Figura 46** Espoliação do GSH pelo catecol em GL15 na interação parácrina com CEC em cocultivo. A - GL15 em meio DMEM HAM F12 com 5×10^{-4} de M HCl (controle) na presença de CEC; B - GL-15 expostas a 1 mM de BSO, inserto sem CEC; C - GL-15 expostas a 600 μM de catecol, inserto sem CEC; D - GL-15 expostas a 600 μM de catecol, inserto com CEC. As imagens foram obtidas por microscopia de fluorescência e são representativas de diferentes campos. A barra corresponde a 100 μm 120
- Figura 47** Fragmentação nuclear em CEC expostas ao catecol. Núcleos marcados com Gel red (teste de cometa). A - CEC em DMEM HAM F12 com 5×10^{-4} M de HCl (controle); B - CEC em meio DMEM HAM F12 expostas a luz UV por 1 h (controle positivo); C - CEC em meio DMEM HAM F12 e 3000 μM de catecol; D - CEC em MCAst 50% (v/v) e 3000 μM de catecol; E - CEC em MCAst 100% e 3000 μM de catecol. Exposição por 72 h. Imagens obtidas por microscopia de fluorescência. Seta branca mostra ponte cromossômica; seta vermelha aponta aglomerados nucleares e seta amarela mostra formação de cometa. Barra equivalente a 100 μm 121
- Figura 48** Danos em DNA de astrócitos expostas ao catecol. Núcleos marcados com Gel red (teste de cometa). A - Astrócitos em meio DMEM HAM F12 expostos a luz UV por 1 h (controle positivo); B - Astrócitos em meio DMEM HAM F12 expostos a 50 μM de H_2O_2 por 1 h (controle positivo); C Astrócitos em DMEM HAM F12 com 5×10^{-4} M de HCl (controle); D - Astrócitos em meio DMEM HAM F12 expostos a 40 μM de catecol; E - Astrócitos em MCCEC 50% (v/v) expostos a 40 μM de catecol; F - Astrócitos em MCCEC 100% expostos a 40 μM de catecol. Exposição por 72 h. Imagens obtidas por microscopia de fluorescência. Barra equivalente a 100 μm 123

Figura 49	Genoproteção em astrócitos pelo MCCEC mediante danos pelo catecol. Astrócitos em DMEM HAM F12 com 5×10^{-4} M de HCl (controle); Astrócitos em meio DMEM HAM F12 expostos a 40 μ M de catecol; Astrócitos em MCCEC 50% (v/v) expostos a 40 μ M de catecol; Astrócitos em MCCEC 100% expostos a 40 μ M de catecol. Exposição por 72 h. Análise de distribuição não normal, teste de <i>Mann-Whitney</i> . Significância *** $P < 0,0001$ comparado com o grupo tratado com catecol em DMEM HAM F12.....	124
Figura 50	Medidas de TEER em CEC. ● CECs cultivadas em DMEM HAM F12/EGM; ■ CEC em MCast 50% e ▲ CEC em MCast 100%. n=3 experimentos de cultura de células independentes. Comparações entre dois grupos foram feitas com o teste não paramétrico de <i>Mann-Whitney</i> ...	125
Figura 51	Imunocitoquímica para Fator VIII de vonWillebrand em CEC moduladas com MCast e 3000 μ M de catecol por 72 h. A - CEC em DMEM HAM F12; B- CEC em DMEM HAM F12 e catecol; C – CEC em 50% em MCast 50% e catecol; D – CEC em MCast 100% e catecol.. Microscopia de fluorescência. Barra equivalente a 100 μ m.....	127
Figura 52	Catecol induz expressão de ocludina em CEC após 72 h. A – CEC cultivadas em DMEM HAM F12; B – CEC cultivadas em MCast 50% (v/v); C – CEC cultivadas em MCast 100%; D – CEC em 3000 μ M de catecol e DMEM HAM F12; E - CEC expostas a 3000 μ M de catecol em MCast 50% (v/v); F - CEC expostas a 3000 μ M de catecol em MCast 100%; Imunocitoquímica para ocludina (vermelho) e DAPI marcador de núcleos (azul). Microscopia de fluorescência. Barra equivalente a 100 μ m.....	128
Figura 53	Expressão dos genes da β -actina e HPRT em astrócitos controles ou infectados por <i>Nc</i> . A - Expressão gênica da β -actina e B - Expressão gênica da HPRT, Análise por qRT-PCR.....	130
Figura 54	Expressão relativa de gene do TNF e IL-10 em astrócitos, normalizada para a expressão mediana do gene de HPRT em astrócitos não infectados e astrócitos infectados com <i>Nc</i> . A - Expressão gênica de TNF e B - Expressão gênica de IL-10. Análise por qRT-PCR.....	130
Figura 55	Expressão dos genes dos fatores neurotróficos GDNF, NGF e BDNF em astrócitos. Expressão normalizada para a expressão mediana do gene da HPRT em astrócitos (controles ou contaminados com <i>Nc</i>). A - Expressão gênica de GDNF; B - Expressão gênica de NGF; C - Expressão gênica de BDNF. Análise por qRT-PCR.....	131
Figura 56	Expressão dos genes β -actina e HPRT em CEC de ratos. Células em meio condicionado de astrócitos infectados por <i>Nc</i> (MCast- <i>Nc</i>) comparando com células cultivadas em meio condicionado de astrócitos não infectados (MCast). A - Expressão gênica de HPRT; B - expressão	

	gênica de β -actina. Análise por qRT-PCR.....	132
Figura 57	Expressão relativa de gene de TNF em CEC. Células em meio condicionado de astrócitos infectados por <i>Nc</i> (MCAst- <i>Nc</i>), comparando com células cultivadas em meio condicionado de astrócitos não infectados (MCAst). Análise por qRT-PCR.....	132
Figura 58	Avaliação da expressão relativa dos genes de GDNF, NGF e BDNF. Células em CEC tratadas com meio condicionado de astrócitos infectados por <i>Nc</i> (MCAst- <i>Nc</i>) comparando com células cultivadas em meio condicionado de astrócitos não infectados (MCAst). A - Expressão gênica de GDNF; B - Expressão gênica de NGF; C - Expressão gênica de BDNF - Análise por qRT-PCR.....	133
Figura 59	Modulação de ocludina em CEC em meio condicionado de astrócitos infectados por <i>Nc</i> . A - CEC em 50% (v/v) em MCAst; B - CEC cultivada em 100% de MCAst; C - CEC cultivada em 50% (v/v) MCAst- <i>Nc</i> ; D - CEC cultivada em 100% MCAst- <i>Nc</i> ; Exposição por 72 h. Imunocitoquímica observada por microscopia de fluorescência. Barra equivalente a 100 μ m.....	134
Figura 60	Possíveis sítios de ligação da serina na alça externa da glicoproteína P de organismo <i>Mus musculus</i> (http://www.rcsb.org). Após ligação do anticorpo, a molécula muda de conformação e fecha a abertura intramembranar. A tripsina cliva a alça externa, dificultando a ligação do anticorpo (modificado de Loo and Clarke, 2016).....	144

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Anticorpos utilizados na imunocitoquímica	59
Tabela 2:	Genes alvos utilizados nas análises de qRT-PCR	70
Tabela 3:	Tipo de morte celular - CEC	101
Tabela 4:	Tipo de morte celular - Astrócitos	105
Tabela 5:	Classificação do padrão de fragmentação de DNA	124

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

2OHE2	2-hidroxiestradiol
4OHE2	4-hidroxiestradiol
ARTN	Artemina
ATP	Adenosina trifosfato
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
BHE	Barreira Hematoencefálica
BSA	Soro albumina bovina
BSO	Butionina <i>S</i> -sulfoxamina
CASK	Proteína Cinase com Serina Ca ²⁺ dependente
CEC	Células endoteliais cerebrais
COMT	Catecol-0-metiltransferase
CYP450	Citocromo P450
DAPI	4',6-Diamidino-2-fenilindol
DMEM	Eagle Modificado Por Dubelcco
EDTA	Ácido etilenediaminotetracético
EGM	Meio de Crescimento Endotelial
EGTA	Ácido etileno glicol-bis[2-aminoetileter]- <i>N,N,N',N'</i> -tetraacético
EROS	Espécies Reativa de oxigênio
FA	Fosfatase alcalina
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
GDNF	Fator Neutrófico Derivado da Glia
GDNFR- α 1	Receptor de GDNF alfa 1
GFAP	Proteína Glial Fibrilar Ácida
GFL	Família de Ligantes de GDNF
GL-15	Glioblastoma humano
gp-P	Glicoproteína P
GR	Glutaciona redutase
GS	Glutamina Sintetase
GSH	Glutaciona na forma reduzida
GSH-Px	Glutaciona peroxidase

GSSG	Glutation na forma oxidada
GST	Glutation S-Transferase
GST π	Glutationa S-transferase pi
HBSS	Solução Balanceada de Hank's
HCl	Ácido clorídrico
HEPES	Ácido 2-[4-(2-hidroxiethyl) piperazin-1-il] etanossulfonico
HPAs	Hidrocarbonetos Poliaromáticos
HPRT	Hipoxantina Fosforribosil Transferase
IL-10	Interleucina-10
IL-1 β	Interleucina 1beta
IP	Iodeto de propídio
IPASE	Inibidor de pretease
JAMs	Moléculas de Adesão Juncional
KCL	Cloreto de potássio
LAT1	Largos Aminoácidos Neutros
MAO	Monoamina oxidase
MCAst	Meio Condicionado por Astrócitos
MCAst- <i>Nc</i>	Meio Condicionado por Astrócitos infectados por <i>Neospora caninum</i>
MCB	Monoclorobimano
MCC6	Meio condicionado por glioma murino
MCCEC	Meio Condicionado por Células Endoteliais Cerebrais
MCMG	Meio Condicionado por Microglia
MIF	Média de intensidade de fluorescência
MgSO ₄	Sulfato de Magnésio
MTT	Brometo 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolina
NaCl	Cloreto de sódio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
NGF	Fator de Crescimento do Nervos
NGFR	Receptor de Fator de Crescimento do Nervos
NO	Oxido Nitrico
NRTN	Neurturina
NT	Neurotrofinas

PBS	Tampão salina fosfato
PD	Doença de Parkinson's
PFA	Paraformolaldeido
PSPN	Persefina
qRT-PCR	Cadeia da Polimerase em Tempo Real
RET	Receptor tirosine cinase
SDS	Duodesilsulfato de sódio
SST	Solução Salina Tamponada
TEER	Resistência elétrica trans endotelial
TGF- β	Fator de Crescimento Transformador beta
TNF- α	Fator de necrose tumoral-alpha.
Trks	Topomiosina relacionada a quinase
UDP	Uridina 5'-difosfato
UGT	Glucuronosiltransferases
UGT1A6	UDP-glucuronosiltransferase 1A6
UV	Ultra Violeta
VE-caderina	vascular endotelial caderina
vWfVIII	Fator VIII de vonWillebrand
ZO	Proteínas de zona de oclusão

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	30
1.1	A BARREIRA HEMATOENCEFALICA É MULTIFUNCIONAL	30
1.2	MECANISMOS DETOXIFICADORES DA BHE	33
1.3	FATORES NEUROTRÓFICOS	36
1.4	PERDA DA HOMEOSTASE E NEOPLASIAS CEREBRAIS	38
1.5	O CATECOL COMO MODELO DE DANO CEREBRAL	39
1.6	INFECÇÃO POR <i>NEOSPORA</i> COMO MODELO DE DANO CEREBRAL	42
1.7	CULTURA DE CÉLULAS ENDOTELIAIS CEREBRAIS E GLIAIS COMO MODELO DE BHE	43
2	OBJETIVOS	45
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	45
3	METODOLOGIA	46
3.1	MODELO E SÚMULA EXPERIMENTAL	46
3.2	ISOLAMENTO DO COLÁGENO DE CAUDA DE RATOS	47
3.3	CULTURA CELULAR	47
3.3.1	Meios de cultura e soluções	47
3.3.1.1	<i>Meio Eagle Modificado por Dubelcco (DMEM) HAM F12</i>	48
3.3.1.2	<i>Meio de crescimento endotelial (EGM)/DMEM HAM F12</i>	48
3.3.1.3	<i>Meio Eagle Modificado por Dubelcco (DMEM) suplementado</i>	48
3.3.1.4	<i>Solução de Hank's (HBSS) 1x concentrado</i>	48
3.3.1.5	<i>Gradiente de Percol</i>	49
3.3.1.6	<i>Solução de Lise</i>	49
3.3.1.7	<i>Solução Salina Tamponada (SST):</i>	49
3.3.2	Isolamento de células endoteliais cerebrais de ratos	49
3.3.2.1	<i>Padronização de cultura de CEC</i>	50
3.3.2.2	<i>Cultivo de células endoteliais cerebrais em EGM/DMEM HAM F12</i>	50
3.3.3	Isolamento de mistura Glial de ratos	51
3.3.3.1	<i>Cultura de astrócitos sem microglia (Protocolo 1)</i>	51
3.3.3.2	<i>Cultura glial para obtenção de astrócitos e microglia (Protocolo 2) e microglia</i>	51

3.3.4	Cultura de linhagem de glioma murino	52
3.3.5	Cultura da linhagem GL-15 de glioblastoma humano	52
3.3.6	Cultivo de CEC de rato e indução do crescimento por meio condicionado	53
3.4	AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO CATECOL SOBRE OS ASTRÓCITOS EM DIFERENTES PROTOCOLOS DE CULTIVO	54
3.4.1	Exposição dos astrócitos isolados P1 e P2 ao catecol - avaliação morfológica e funcional	54
3.5	AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE MICROGLIA E ASTRÓCITOS MEDIANTE DANO PELO CATECOL	54
3.6	AVALIAÇÃO DA RESPOSTA DE CEC NA RESISTÊNCIA À TOXICIDADE DO CATECOL EM PRESENÇA DE MCAST	54
3.7	AVALIAÇÃO DA RESPOSTA DOS ASTRÓCITOS NA RESISTÊNCIA À TOXICIDADE INDUZIDA PELO CATECOL EM MEIO CONDICIONADO POR CEC	56
3.8	AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR	57
3.9	AVALIAÇÃO DO EFEITO DO CATECOL NA EXPRESSÃO DE OCLUDINA, FATOR VII, GSTPI, UGT1A6 E GP-P EM CEC	57
3.10	IMUNOCITOQUÍMICA	57
3.10.1	Fixação das células	57
3.10.2	Preparo das lâminas e imunomarcação	58
3.11	DOSAGEM DE PROTEÍNAS	59
3.12	DETERMINAÇÃO DO TIPO DE MORTE CELULAR (ANEXINA/IP)	60
3.13	ANÁLISE DE GLICOPROTEÍNA P, UGT1A6 E GSTPI POR CITOMETRIA DE FLUXO	60
3.14	AVALIAÇÃO DE ESPOLIAÇÃO DE GSH POR CATECOL EM CEC.	61
3.15	AVALIAÇÃO DA ESPOLIAÇÃO GSH INDUZIDA PELO CATECOL EM CÉLULAS GL-15	62
3.16	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA ISOFORMA UGT1A6 EM ASTRÓCITOS POR <i>WESTERN BLOT</i>	63
3.17	AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE DO CATECOL POR ENSAIO DE COMETA	64

3.18	DETERMINAÇÃO DO PARÂMETRO BIOELÉTRICO E PERMEABILIDADE DE MEMBRANA	66
3.19	ANÁLISE DA INTERAÇÃO PARÁCRINA ENTRE CEC E ASTRÓCITOS SOBRE A MONOCAMADA ENDOTELIAL.	67
3.20	AVALIAÇÃO DE CITOCINAS E NEUROTROFINAS EM ASTRÓCITOS E CEC	67
3.21	ANÁLISE DE CADEIA DE POLIMERASE EM TEMPO REAL (QRT-PCR).	68
3.22	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS.	70
4	RESULTADOS	72
4.1	INTERAÇÃO PARÁCRINA ENTRE AS CÉLULAS (CEC E ASTÓCITOS, CEC E GLIOMA, CEC E MICROGLIA), EM CULTURA PRIMÁRIA.	72
4.1.1	Efeito do meio condicionado dos astrócitos sobre células endoteliais quiescentes	72
4.1.2	Interação entre CEC e Glioma murino	74
4.1.3	Interação entre CEC e microglia	78
4.1.4	Otimização do cultivo de CEC	79
4.2	INTERAÇÃO ENTRE ASTRÓCITOS E MICROGLIA	84
4.2.1	Citotoxicidade induzida pelo catecol em astrócitos isolados por diferentes protocolos de cultivo (P1 e P2)	84
4.2.2	Efeito do meio condicionado pela microglia sobre astrócitos isolados do protocolo 1	89
4.2.3	Expressão de neurotrofinas por astrócitos isolados (P1 e P2) expostos ao catecol	92
4.3	INTERAÇÃO PARÁCRINA ENTRE CEC E ASTRÓCITOS	95
4.3.1	Resistência a toxicidade do catecol em astrócitos induzida por MCCEC	96
4.3.2	Células endoteliais cerebrais são resistentes à toxicidade do catecol	101
4.3.3	Expressão de GSTpi em CEC e Astrócitos	106
4.3.4	Expressão da isoforma UGT1A6 em CEC e Astrócitos	108
4.3.5	Expressão de glicoproteína P	111
4.4	INTERAÇÃO PARÁCRINA ENTRE CEC E ASTRÓCITOS E ENTRE GL-15 E CEC NA ESPOLIAÇÃO DE GSH INDUZIDA PELO CATECOL	116

4.5	INTERAÇÃO ENTE CEC E ASTRÓCITOS MEDIANTE A GENOTOXICIDADE DO CATECOL	120
4.6	INTERAÇÃO PARÁCRINA ENTRE CEC E ASTRÓCITOS MODULANDO A BARREIRA FÍSICA	125
4.6.1	Astrócitos influenciam o fechamento da monocamada endotelial	125
4.6.2	Catecol inibe a expressão de Fator VIII de vonWillebrand	127
4.6.3	Catecol induz a expressão de ocludina em CEC	127
4.7	FATORES NEUROTRÓFICOS DE ASTRÓCITOS INFECTADOS COM <i>NEOSPORA</i> MODULANDO A RESPOSTA DAS CEC	128
4.7.1	Citocinas (TNF-α e IL-10) e neurotrofinas produzidas por astrócitos infectados com <i>Neospora</i>	128
4.7.2	Expressão de neurotrofinas e citocinas por CEC moduladas por MCAst infectados por <i>Neospora</i>	131
4.7.3	Expressão de ocludina em CEC induzida pelo meio condicionado de astrócitos infectados de <i>Neospora</i>	133
5	DISCUSSÃO	136
6	CONCLUSÕES	148
7	REFERÊNCIAS	150
	ANEXOS: Certificado CEUA	166

1.1 INTRODUÇÃO

1.2 A BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA É MULTIFUNCIONAL

O mistério envolvendo a função e interação entre células endoteliais e astrócitos para manter a integridade do sistema nervoso central motiva ações de pesquisadores desde o final do século XIX quando a barreira hematoencefálica ficou evidente para o mundo.

A barreira hematoencefálica (BHE) foi apontada pela primeira vez por Paul Ehrlich (1885), quando ele observou a limitação cinética do corante histológico entre o sangue e cérebro. Com a evolução das descobertas sobre a BHE foi possível entender que ela é mais que uma barreira física que limita a passagem das moléculas para o cérebro, possuindo outros importantes fatores limitantes tais como, características físico-químicas, presença de proteínas transportadoras ABC (do inglês, *ATP binding cassette*) cujo mecanismo de transporte é ATP-dependente, de proteínas de resistência a multidrogas e um sistema enzimático metabolizador (EL-BACHÁ e MINN, 1999; LAQUINTANA et al., 2009). Adicionalmente, tem o perfil de modular as reações de células fagocíticas nos mecanismos de proteção imunológica e bloquear o recrutamento e entrada de leucócitos no ambiente cerebral (ABBOTT, 2005; ENGELHARDT e SOROKIN, 2009).

A barreira física é formada por monocamada de células endoteliais cerebrais (CEC) que formam os capilares. Estas células são envolvidas pelos pés terminais astrocíticos, em grande maioria, e pericitos sendo rodeadas por outras células gliais, como microglia (Bresgen et al., 2006). As células endoteliais são interconectadas por proteínas que formam um complexo de junções aderentes e ocludentes ("*tight junctions*") e de proteínas transmembranas, transportadoras e receptoras que fazem o controle rigoroso de trocas iônicas e restrição da dinâmica de substâncias entre o sangue e o cérebro (ABBOTT et al., 2006).

Fazem parte das proteínas de junção da BHE o grupo das ocludinas, claudinas (as claudinas 1-3, 5 e 12) e as moléculas de adesão juncional (JAM). As claudinas e ocludinas estão envolvidas na manutenção da BHE e são responsáveis pela regulação da resistência elétrica transendotelial (TEER). O domínio carboxi C-terminal da ocludina é capaz de fazer a ligação do citoesqueleto com a família das proteínas de zona de oclusão (ZO-1, ZO-2, ZO-3) principalmente com ZO-1, permitindo maior oclusão da BHE. Entre as principais JAM expressas no endotélio cerebral estão as JAM-1 (JAM-A), JAM-3 (JAM-B) e JAM-C. Estas proteínas de adesão juncional são moléculas ligantes de imunoglobulinas e são responsáveis

pela formação e manutenção das proteínas das junções ocludentes (WOLBURG e LIPPOLDT, 2002; ABBOTT, 2005; HAWKINS e DAVIS, 2005; ABBOTT et al., 2006).

A barreira hematoencefálica é também constituída de uma barreira ativa pela presença de proteínas de membrana das CEC e células gliais envolvidas no transporte de moléculas e sinalização intracelular. Participam da barreira ativa, as moléculas vasculares endoteliais caderinas que são interligadas no citoesqueleto com as cateninas (α -catenina, β -catenina e γ -catenina) sinalizando a abertura da BHE (PAOLINELLI et al., 2011) e as proteínas transmembranares tais como as carreadoras de glicose (KUCHLER-BOPP et al., 1999), o sistema de transporte de L-aminoácidos neutros grandes (PATEL et al., 2014), as serinas cinases dependentes de Ca^{2+} (CASK), do transporte de efluxo dependentes de ATP, com gasto de energia, tais como a glicoproteína P (gp-P), e proteína 1 multi-PDZ (MUPP1) (ABBOTT et al., 2006).

As junções epiteliais aderentes e de oclusão separam a monocamada em dois compartimentos distintos, a porção luminal em contato com o sangue e a porção abluminal intracerebral (VAN MEER E SIMONS, 1986), forçando o tráfego de moléculas pela rota transcelular, ao invés de paracelular como na maioria das células endoteliais. A rota transcelular limita a entrada de muitas substâncias, permitindo apenas moléculas lipofílicas, como barbitúricos, etanol e pequenas moléculas gasosas, tais como O_2 e CO_2 (ABBOTT et al., 2006). Estas junções também fazem o controle do influxo e efluxo de íons, por exemplo Na^+ e Cl^- , de modo que aumenta a TEER acima de 50 vezes, comparando este parâmetro com o do endotélio periférico (ABBOTT et al., 2006). Há também proteínas receptoras de fármacos e xenobióticos, que regulam a sinalização de moléculas, como guanossina trifosfato hidrolases (GTPase) (E.C. 3.6.5.2.) e outros reguladores de proteína G, permitindo ou restringindo o influxo iônico e aporte nutricional ao cérebro ou simplesmente desencadeando sinalizações intracelulares a partir da interação entre os domínios catalíticos ativados e proteínas citoplasmáticas numa cascata de sinalização (ABBOTT et al., 2006). Moléculas que reconhecem sítios ativos destas proteínas, a exemplo da nicotina e hidrocarbonetos poliaromáticos (HPAs) as ativam, promovendo alteração na permeabilidade de membrana por inibirem a transcrição de genes das proteínas de oclusão, (HUTAMEKALIN et al., 2008), o que facilita a entrada de tais substâncias no cérebro.

A BHE possui um sistema endocítico escasso, porém é abundante em enzimas degradativas que aceleram a biotransformação das moléculas que adentram a barreira, limitando a entrada de substâncias nocivas no cérebro (ABBOTT e REVEST, 1991). A função fisiológica é manter a homeostase por seletividade no transporte de nutrientes e

substâncias endógenas importantes ao funcionamento cerebral e de excluir metabólitos tóxicos e xenobióticos (TSUKITA et al., 2001). No entanto, algumas moléculas ao serem detoxificadas geram metabólitos reativos que podem conduzir aos mecanismos de danos e perda do equilíbrio orgânico, levando a doenças do sistema nervoso central (SNC).

As células endoteliais cerebrais não possuem poros, nem fenestras, o que permite a passagem de moléculas apenas pela membrana plasmática e citosol (ABBOTT et al., 2006). O sistema de transporte de moléculas através da membrana endotelial da BHE pode ser dividido em duas categorias: difusão passiva e transporte mediado por carreadores, com gasto de adenosina trifosfato (ATP).

O sistema de transporte endógeno envolve exocitose carreada por receptor, transporte facilitado mediado por carreador e transporte ativo, dependente de ATP (LAQUINTANA et al., 2009). São também incluídos vários complexos proteicos neste processo, tais como receptores de insulina, transferrina, lipoproteínas, aminoácidos, transportadores de solutos, de ânions e cátions orgânicos, entre outros (GAILLARD et al., 2005; HAWKINS et al., 2006; DI et al., 2009).

A expressão de transportadores é controlada pela necessidade de otimização excepcional do aporte de substâncias essenciais ao bom funcionamento do cérebro e com intuito inverso para remoção de substâncias tóxicas ou desnecessárias no sentido contrário. Dependendo da localização celular destes transportadores, na membrana apical ou basolateral nas CEC, substratos endógenos e drogas anticâncer são exocitados do cérebro (ITO et al., 2005; LAQUINTANA et al., 2009). A gp-P, um produto do gene MDR1, possui 1280 aminoácidos e peso molecular 170 kDa, é capaz de transportar para fora do SNC, ânions lipofílicos e moléculas de estruturas variadas, conferindo função quimioprotetora à BHE (BUNGERT et al., 2001; HUBER, 2010). Está localizada predominantemente na membrana plasmática apical da célula e funciona como uma bomba de efluxo na porção apical da BHE e bombeia enorme variedade de drogas anticâncer para a circulação sistêmica, caracterizando a resistência de drogas como paclitaxel, topotecan e antraciclinas (Demeule et al., 2002). Inibidores de gpP, como o enantiômero (R)-verapamil e ciclosporina A, são utilizados associados a quimioterapia para aumentar a permeabilidade da BHE a antineoplásicos (BREEDVELD et al., 2006).

Os astrócitos também expressam proteínas de efluxo, fazendo assim parte da barreira ativa. O transporte ativo dependente de ATP envolve a gp-P e a família de proteínas associadas a resistência a multidrogas (MRP1) (EL-BACHÁ e MINN, 1999; KRUIH e BELINSKY, 2003).

Além da barreira física e do sistema de transporte, há a barreira metabólica formada pelas enzimas citosólicas e microssômicas das CEC e astrócitos que metabolizam as moléculas permeáveis à membrana, reconhecidas como substratos (HEDLUND et al., 2001). As moléculas que atravessam a membrana por difusão passiva têm caráter relativamente lipofílico e baixo peso molecular (PARDRIDGE, 2003) e podem ser substratos das enzimas detoxificadoras que constituem a barreira metabólica (ABBOTT, 2013).

1.3 MECANISMOS DETOXIFICADORES DA BHE

A barreira metabólica é constituída por enzimas antioxidantes e detoxificadoras, envolvidas no metabolismo de drogas e poluentes, sendo mais expressas nas regiões do cérebro onde a barreira física é inexistente ou pouco eficaz, como o bulbo olfativo, córtex e plexo coróide (GRADINARU et al., 1999; HEYDEL et al., 2001).

As reações de oxidação, redução e hidrólises constituem a fase I do metabolismo dos xenobióticos, geram grupamentos funcionais polares nas moléculas. Os metabólitos da fase I, por sua vez podem ser substratos das enzimas que constituem a fase II, ou enzimas de conjugação, que catalisam a reação de conjugação destas moléculas a compostos altamente polares, exemplo do ácido glucurônico e glutathion reduzido (GSH). A adição, modificação ou transferência destes grupos polares aos xenobióticos aumenta sua hidrossolubilidade, facilitando a excreção. Estas moléculas conjugadas são bombeadas para fora do cérebro pelos transportadores ABC anteriormente citados e que constituem a fase III do metabolismo dos xenobióticos, facilitando a excreção e impedindo o acúmulo no compartimento cerebral, o que poderia causar danos (ROSS et al., 2009).

Ao tentar biotransformar as moléculas, a exemplo do catecol, o sistema microssômico pode aumentar a produção de metabólitos intermediários, como as semiquinonas e espécies reativas de oxigênio (ERO), envolvendo principalmente reação de oxidorredução catalisada pelo sistema de monooxigenases microssômicas. Este sistema é composto por enzimas da família do citocromo P450 (CIP; EC 1.14.14.1), dependentes do potencial redox no estado de transição do íon Ferro (Fe^{+2}/Fe^{+3}) da porção heme, funcionando em associação com a NADPH-CIP redutase (E.C. 1.6.2.4) (ZANGAR et al., 2004).

Enzimas como a UDP-glucuronosiltransferase (UGT; EC 2.4.1.17) estão envolvidas na fase II do metabolismo de moléculas exógenas com ação farmacológica e são superexpressas em regiões do cérebro onde a barreira física é pouco eficaz, como no bulbo olfatório (GRADINARU et al., 1999). A glucuroconjugação é o principal caminho

detoxicador da fase II, onde o glucuronato é transferido de uma molécula de uridina 5'-difosfato (UDP) para o xenobiótico nas membranas localizadas no retículo endoplasmático (NISHIYAMA et al., 2008). A UGT catalisa a transferência do ácido glucurônico para hidroxilas fenólicas dos catecóis, impedindo a formação de semiquinonas e quinonas responsáveis por induzir fragmentação do DNA (PICADA et al., 2003). A isoforma UGT1A6 já foi detectada em neurônios e astrócitos de ratos (ABBOTT et al., 2006).

Outro grupo de enzimas com importante papel na fase II de biotransformação de fármacos e xenobióticos são as sulfotransferases (RUIJTERS et al., 2016) e glutathione *S*-transferase (GST; EC 2.5.1.18). Muitas isoformas de GST, como GSTpi, são encontradas na BHE fazendo conjugação do GSH a xenobiótico contribuindo para os mecanismos de resistência a drogas e a ineficácia na terapia anticâncer (SAU et al., 2010; SHAWAHNA et al., 2013).

Alguns fármacos de ação no SNC são catecóis, por exemplo a apomorfina, que adquirem perfis citotóxicos dose dependentes ao serem oxidados (EL-BACHÁ et al., 1999). A oxidação microsômica é uma via metabólica com função detoxificadora e os produtos radicalares gerados, quinonas e ERO, podem ligar-se covalentemente com DNA, proteínas e lipídeos (ZANGAR et al., 2004; SETSHEDI et al., 2010). Os próprios lipídeos de membrana, especialmente os constituídos de ácidos graxos poli-insaturados, por serem abundantes no sistema biológico, são susceptíveis a oxidação e são alvos frequentes das espécies oxidantes (TSUCHIYA et al., 2004; HARDWICK et al., 2009). Isso pode ser potencializado quando o sistema antioxidante (enzimas e vitaminas antioxidantes) não consegue anular as espécies radicalares, prevalecendo o estresse oxidativo (SAKAI et al., 2003; WILLCOX et al., 2004).

Os danos produzidos durante o estresse oxidativo na barreira protetora do cérebro, pela produção aumentada de espécies reativas provenientes do metabolismo ou do processo inflamatório, resultam no aumento da permeabilidade passiva de drogas e xenobióticos para o SNC (BAYOL-DENIZOT et al., 2000). Substâncias tóxicas, ex. piridostigmina e *N,N*-dietil-*m*-toluamida, em ratos submetidos a estresse, também alteraram a permeabilidade de membrana por redução na expressão de proteínas de junção produzidas especificamente por células endoteliais cerebrais para o fechamento da barreira (ABDEL-RAHMAN et al., 2002).

Embora a variedade e quantidade de enzimas metabolizadoras no cérebro sejam menor quando comparadas com o fígado, a concentração de isoformas específicas de CIP em diferentes tipos de células no cérebro é crucial no impacto do metabolismo local (LAGRANGE et al., 1999; HEDLUND et al., 2001). Várias outras enzimas constituem o *pool* enzimático das CEC em altas concentrações quando comparadas com endotélio periférico, a

exemplo a γ -glutamil transpeptidase (GGT, EC 2.3.2.2), a fosfatase alcalina (FA, EC 3.1.3.1), a monoamina oxidase (MAO, EC 1.4.3.4), a catecol-*O*-metiltransferase (COMT, EC 2.1.1.6), a butirilcolinesterase (EC 3.1.1.8) e a ácido aromático descarboxilase (EC 4.1.1.26) (WITT et al., 2001). Além disso, a idade parece ser determinante na eficácia detoxificadora da barreira metabólica, principalmente na fase do desenvolvimento do indivíduo (SAUNDERS et al., 2014) quando a barreira física ainda possui permeabilidade aumentada seja por necessidade fisiológica ou por imaturidade funcional.

A regulação da expressão gênica, a indução e inibição da atividade de isoformas de enzimas do metabolismo, a exemplo de CYP, modulando a eficácia da BHE aos compostos endógenos e exógenos têm um importante papel sobre a sinalização intercelular, sobre os resultados terapêuticos e no desenvolvimento de doenças (MIKSYS et al., 2003; MEYER et al., 2007; FERGUSON e TYNDALE, 2011).

Por outro lado, inibir ou inativar isoformas de enzimas detoxificadoras pode representar um papel importante na quimioproteção. A formação de adutos de 8-metoxipsoraleno com a isoforma de CYP1A13 conduz a inativação competitiva da apoproteína P450 (VON WEYMARN et al., 2005). Esta isoforma está envolvida na bioativação de carcinógenos do cigarro. A ação inibitória enzimática sobre a isoforma de enzima da fase II da biotransformação, como a GSTpi, uma enzima super expressa em tumores cerebrais e responsável pela resistência de vários quimioterápicos, pode ter uma importante ação sobre o tratamento de tumores (GROSSMAN, 2009).

Foi mostrado que fatores neurotróficos, ex. fator neurotrófico derivado da glia (do inglês, *glial cell-derived neurotrophic factor* GDNF), também estimulam a expressão e atividades de enzimas antioxidantes como glutathione peroxidase (Gpx) (E.C. 1.11.1.9) e superóxido dismutase (E.C.1.15.1.1), numa interrelação com o estresse oxidativo (WU et al., 2014). Em outro estudo, o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF, do inglês *Brain Derived Neurotrophic Factor*), foi utilizado como marcador de dano, no estresse oxidativo, com detecção no sangue (VELLUCCI et al., 2001; KAPCZINSKI et al., 2008). Alterações nos níveis dos fatores neurotróficos podem levar a desordem metabólica (KRABBE et al., 2007; LIU et al., 2016) e a doenças neurodegenerativas (BUDNI et al., 2015; MANSUR et al., 2016).

A eficácia da BHE em selecionar a entrada de substâncias no cérebro é determinada pela dinâmica da barreira física e ativa e sobretudo pelo poder detoxificador da barreira metabólica. O transporte transcelular de moléculas, ex. drogas, através da BHE pode ser ineficaz por ação do sistema metabolizador presente nos capilares cerebrais. Onde a barreira

física é falha, a barreira metabólica é mais reforçada por aumento da expressão de enzimas metabolizadoras de drogas e ativação do sistema de transporte da fase III (BAYOL-DENIZOT et al., 2000).

Estratégias de permeabilidade da BHE vêm sendo utilizadas para facilitar a entrega de fármacos no SNC, como modulação de transportadores de transferrina (TfR-12) e utilização de lipossomas carreando peptídeos (LI-MIN et al., 2017). Outro estudo propõe a abertura da BHE mediada por ultrassom, em modelo ovino, para terapia da Doença de Alzheimer (PELEKANOS et al., 2018).

1.3 FATORES NEUROTRÓFICOS

Os fatores neurotróficos são classificados didaticamente em três grupos: neurotrofinas (NT), superfamília de fator de crescimento tumoral (TGF- β) e citocinas neurotróficas.

As NT são peptídeos (~13 Kda) altamente preservados que são secretados para desenvolver funções importantes sobre o crescimento, a diferenciação, mielinização, plasticidade, sinapse e sobrevivência neuronal (BARBACID, 1995). São sintetizadas como proteínas precursoras e são biologicamente ativadas por metaloproteases através de fragmentação proteolítica (LEE et al., 2001). Há quatro diferentes neurotrofinas: fator de crescimento do nervo (do inglês, *nerve growth factor* NGF), o BDNF, as neurotrofinas NT-3 e NT-4/5 (NT-5 é homólogo a NT-4 de *Xenopus*) (ERNFORS et al., 1990; BERKEMEIER et al., 1991).

Estas pequenas proteínas são sintetizadas como pró-peptídeos e posteriormente modificadas para a forma madura contendo três cadeias interligadas por pontes dissulfeto (BRADSHAW et al., 1993). São reconhecidas por receptores de baixa afinidade, a exemplo de NGFR (ou pT75^{NTR}), que reconhecem todos os membros da família NT e os receptores de alta afinidade do tipo topomiosina relacionada a cinase (TrK) (ASSIMAKOPOULOU et al., 2007), específicos para dímeros de NT em tecido neuronal. Existem três classes desses receptores Trk: TrkA, TrkB e TrkC, com seletividade para cada NT (DENKINS et al., 2004; DAVIS et al., 2015). O complexo resultante da ligação das NT ao receptor resulta em dimerização destes receptores com trans auto fosforilação e ativação da sinalização intracelular via ativadores da proteína cinase de mitose/regulador extracelular de sinal (Ras/ERK) e proteína cinase B/fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-cinase (Akt/PI3K), uma via

de sobrevivência celular. TrkB é o receptor com maior seletividade para o ligante do BDNF (DENKINS et al., 2004).

O BDNF é uma NT abundante e bem distribuída no SNC, em concentrações mais elevadas no hipocampo, cerebelo e córtex (DAVIS et al., 2015). É um membro da família de genes que codifica peptídeos responsáveis pela sobrevivência, crescimento e manutenção dos neurônios (KOLAROW et al., 2014). Esta NT é sintetizada como pró-peptídeo (pró-BDNF) que por proteólise é transformado na forma madura ativa (GERENU et al., 2017). O pró-BDNF se liga ao receptor $p75^{NTR}$ e sua forma madura se liga aos receptores Trk. Alterações de BDNF estão correlacionadas com doenças neurológicas, tais como depressão, epilepsia, doença de Alzheimer, Huntington e Parkinson (MOTAMEDI et al., 2017).

O NGF é uma glicoproteína resultante da clivagem de proNGF e se apresenta sob 3 formas: a) α -NGF é a forma inativa, b) β -NGF é a forma biologicamente ativa e c) γ -NGF é precursor da forma madura, predominante no SNC (FAHNESTOCK et al., 2001). São reconhecidas por três tipos de receptores, o TrkA, o $p75^{NTR}$ e sortilina. A ação agonista de NGF sobre TrkA ativa sobrevivência celular. A ação agonista de proNGF sobre o receptor sortilina associado $p75^{NTR}$ induz os efeitos neurotóxicos que ativam a morte celular (NYKJAER et al., 2004).

A família dos ligantes de GDNF (RICKERT et al., 2014) pertence à superfamília de TGF-beta e consiste em quatro fatores neurotróficos estruturalmente relacionados e interligados, o GDNF, neurotutina (NRTN), artemina (ARTN), e persefina (PSPN). A sinalização de GDNF é mediada por um receptor com dois componentes com domínio ligante α e um domínio de transdução de sinal RET. O receptor é expresso principalmente em neurônios. No entanto este receptor já foi detectado em cultura primária de microglia e neurônio de substância nigra, em condições fisiológicas (HONDA et al., 1999) e em pacientes com doença de Parkinson (WALKER et al., 1998).

Em equilíbrio, os fatores neurotróficos parecem ter essencial função para a manutenção do sistema biológico, no entanto qualquer mudança nos níveis basais pode promover alterações estruturais, metabólicas e funcionais sobre o SNC e contribuir com a patogênese de várias doenças neurodegenerativas, como Parkinson, desordem bipolar, envelhecimento, doença de Alzheimer e esquizofrenia (BUDNI et al., 2015; MANSUR et al., 2016; ALI et al., 2017). Mecanismo de ação de NT regulando heparinase foi relacionado com invasão metastática cerebral de melanoma (DENKINS et al., 2004).

1.4 PERDA DA HOMEOSTASE E NEOPLASIAS CEREBRAIS

Na perda de homeostase, durante a ação ou ineficácia dos mecanismos de proteção ou ainda, falhas no mecanismo de reparo de lesões, surgem muitas doenças neurodegenerativas e câncer. A patogênese do câncer é desencadeada a partir de alterações na sequência e organização do genoma celular que variam de uma simples substituição de um nucleotídeo a aberrações cromossômicas grosseiras.

O evento crucial e significativo do ponto da malignidade é uma alteração genômica, aduto de DNA, que resulta numa ligeira troca de aminoácidos nas proteínas ou na substituição de um único aminoácido (LEHRBACH et al., 2003; SHILOH, 2003). Amplificações gênicas e deleções foram detectadas em 22 amostras de pacientes com glioblastoma multiforme (PARSONS et al., 2008). Tais alterações no DNA podem ser causadas por substâncias endógenas, como hormônios e produtos radicalares provenientes de oxidação de lipídios e açúcares, ou exógenas, como radiação ionizante, mutágenos químicos e/ou biológicos (TSAI et al., 2005).

Os tumores cerebrais são neoplasias caracterizadas pelo crescimento celular desordenado e anormal de células genomicamente afetadas, sendo denominados conforme origem celular como meningiomas, gliomas (glioblastoma multiforme, astrocitomas, oligodendrogliomas e ependimomas) e meduloblastoma (KLEIHUES et al., 2002). Dentre eles, o glioblastoma, classificado entre os tumores neuroepiteliais, é a forma mais comum de tumor primário do SNC e destaca-se por ser altamente agressivo devido a mutações progressivas e muito invasivo, reduzindo a sobrevida do paciente, o que leva à morte em poucos meses após o diagnóstico (STUPP et al., 2008; CASTRO et al., 2011).

O glioblastoma multiforme é o glioma de grau mais elevado, corresponde ao grau IV conforme a Organização Mundial de Saúde, com predominante diferenciação de células astrocíticas com hiperplasia microvascular e/ou pontos de necrose (ZHANG et al., 2012). Devido ao prognóstico ruim, a eficácia terapêutica é determinante para a sobrevida do paciente (DEORAH et al., 2006; WEN; KESARI, 2008; GROSSMAN, 2009).

Os principais tratamentos, atualmente preconizados como primeira escolha, incluem procedimentos cirúrgicos para ressecção máxima do tumor, seguidos de sistema de quimioterapia baseado no uso de agentes alquilantes tais como carmustina (BACOLOD et al., 2002), lomustina e temozolomida, associados à radioterapia (STUPP et al., 2008). Estas terapias pouco têm contribuído na evolução clínica dos pacientes (NAKADA et al., 2007), talvez devido à ação citostática dos agentes antineoplásicos.

Várias alternativas terapêuticas têm sido estudadas na tentativa de diminuir a progressão tumoral, tanto envolvendo a dinâmica molecular da tumorigênese por bloqueio de receptores envolvidos na ativação de vias oncogênicas ou antiangiogênicos, ou por inibição de vias de transdução de sinal (CHI et al., 2009; CASTRO et al., 2011; WICK et al., 2011). O desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de glioblastoma visa novos alvos moleculares e agentes inibidores (JACOBS et al., 2011; BABU; ADAMSON, 2012). No entanto, alguns fatores têm influenciado a eficácia terapêutica dos novos fármacos, tais como efeitos colaterais agressivos, neurotoxicidade, mecanismos de resistência a multidroga, modulação de enzimas detoxificadoras por indução e inibição enzimática e seletividade da barreira hematoencefálica (WICK et al., 2011).

A imunoterapia tem sido apontada como uma terapia promissora em vários tipos de tumores, no entanto a BHE limita a permeabilidade de anticorpos e mediadores imunes ao cérebro (MULDOON et al., 2012). A formulação de anticorpos monoclonais direcionados ao receptor (MAbs) está sendo utilizada para aumentar penetração através da BHE, como o exemplo do anticorpo contra receptor de insulina (HIRMAb), que foi desenvolvido com ligação de alta afinidade (PARDRIDGE et al., 1995). Outro alvo para MAbs é o receptor de lipoproteína de baixa densidade (LRP1) e transportadores de vários ligantes, a exemplo da α -sinucreína, através da BHE (SUI et al., 2014; LI et al., 2016). O angiopeg-2, um peptídeo ligante do LRP1, foi conjugado ao placlitaxel para facilitar a entrega deste último ao SNC (DEMUELE et al., 2008). Diante da limitação da BHE, aguça-se ainda as expectativas nas combinações de terapias antiangiogênicas e imunoterapia no tratamento de glioblastoma (AMERATUNGA et al., 2018).

1.5 O CATECOL COMO MODELO DE DANO OXIDATIVO CEREBRAL

O 1,2-dihidroxibenzeno (catecol) é um metabólito do benzeno, um monoaromático dispersado no ambiente pela indústria petroquímica, presente em reveladores químicos e na queima incompleta de material orgânico. A estrutura química do catecol também está presente em neurotransmissores como as catecolaminas, que ao serem degradadas por oxidases, a exemplo da MAO, formam moléculas reativas passíveis de gerarem quinonas (NAPOLITANO et al., 2011).

No sistema biológico, outro grupo de biomoléculas classificadas como hormônios, por exemplo o estrógeno, também geram metabólitos que são catecóis. O catabolismo é

iniciado quando o estrógeno β -estradiol E2 é oxidado a catecol estrógeno, a 2-hidroxiestradiol e 4-hidroxiestradiol, por ação da enzima CIP através das isoformas da fase I CIP1A1 e CIP1B1 (DAWLING et al., 2004). Estas isoformas de CIP450 fazem a conversão do estrogênio em semiquinonas e quinonas que reconhecem sítios de ligação em desoxinucleotídeos, gerando adutos de DNA, ponto de partida para carcinogênese, quando estas lesões não são reparadas (YAGER; LIEHR, 1996; HACHEY et al., 2003; VILANOVA et al., 2017).

Quinonas são metabólitos altamente citotóxicos por participarem do ciclo de oxidação e redução (ciclo redox) entre quinonas e hidroquinonas, formando radicais semiquinona e originando espécies reativas de oxigênio (ERO) como ânion superóxido e radical hidroxil em várias etapas do metabolismo (ver **figura 1**) (BOLTON et al., 2000; MELIKIAN et al., 2008).

A oxidação de catecolaminas, a exemplo de dopamina e noradrenalina, conduz à formação de *orto*-quinonas (ITO *et al.*, 2016), metabólitos reativos que se ligam a biomoléculas nucleofílicas, como bases de DNA, formando adutos de DNA-quinonas, hidrogênios bis-álílicos de cadeia carbônica de ácidos graxos, induzindo peroxidação lipídica e resíduos de cisteínas ou outros tióis, das proteínas e do glutation, conduzindo à espoliação de GSH (EISENHOFER et al., 2004; BELOUS et al., 2007). O catecol na concentração de 600 μ M levou a espoliação de GSH e induziu fragmentação e condensação nuclear em GL-15, após 24 h de exposição (DE OLIVEIRA et al., 2010). As *orto*-quinonas de dopamina sofrem ciclização gerando aminocromo e pigmentos feomelanômicos (ZAFAR et al., 2006; BISAGLIA et al., 2010). Os adutos de cisteína oxidados também dão origem a pigmentos feomelanômicos (WAKAMATSU et al., 2014). Um dano oxidativo decorrente do catabolismo excessivo de catecolaminas está envolvido na patogênese do mal de Parkinson (MELO et al., 2011; NAPOLITANO et al., 2011). O estresse oxidativo, além de aumentar a quantidade de proteínas oxidadas, como a α -sinucleína, também pode conduzir à necrose neuronal por peroxidação lipídica.

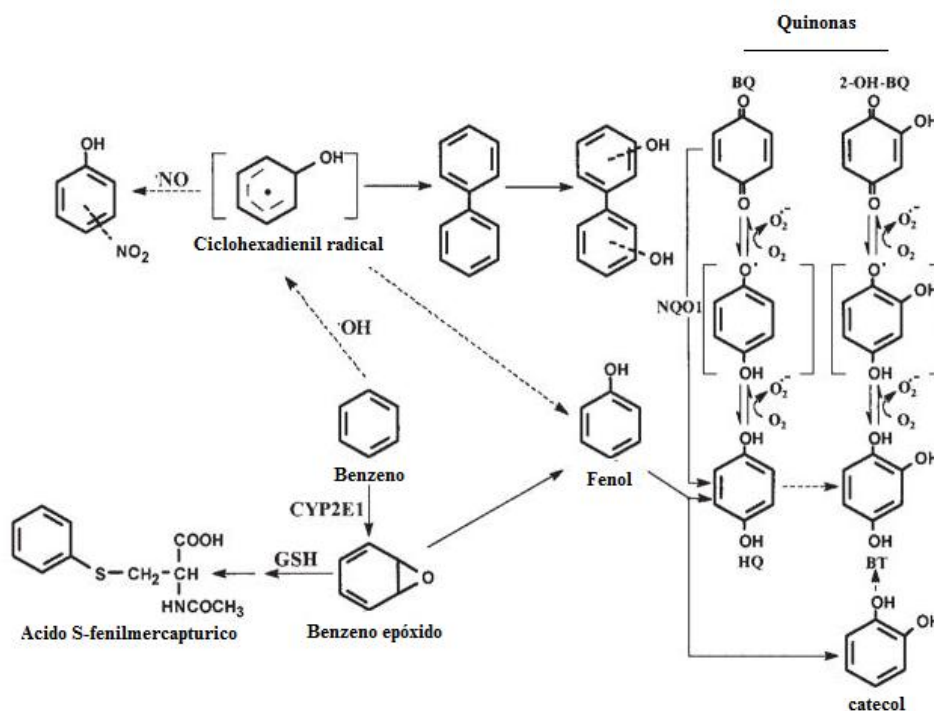


Figura 1. Formação do catecol, quinonas e superóxidos a partir do benzeno. Modificado de MELIKIAN et al., 2013.

Na presença de metais e oxigênio, o catecol é oxidado transferindo um elétron para o oxigênio molecular formando superóxido (O_2^-) e em seguida o peróxido de hidrogênio e radical hidroxil ($\bullet\text{OH}$). A citotoxicidade do catecol em células de glioblastoma humano, *in vitro*, foi relacionada com aumento de O_2^- e quinonas (PEREIRA, 2004). A quantidade de radicais de oxigênio formadas pela auto-oxidação do 3-metilcatecol é reduzida pela enzima antioxidante, a superóxido dismutase (BARRETO et al., 2007). Outro mecanismo de citotoxicidade proposto foi a inibição do complexo II da cadeia respiratória mitocondrial, associada a flavina adenina dinucleotídeo reduzida (FADH_2) (BARRETO et al., 2005). O efeito acumulativo de lesões oxidativas pode conduzir ao envelhecimento precoce.

As hidroquinonas geradas têm seus grupos hidroxil reconhecidos por enzimas que catalisam conjugação com glucuronídeo ou sulfato, conduzindo a detoxificação.

As enzimas da fase II do metabolismo têm importante papel na redução de danos por estes metabólitos reativos. As GST fazem a conjugação de GSH a quinonas, reduzindo a ligação destas espécies reativas com o DNA (STRANGE et al., 2001; HACHEY et al., 2003). A catecol-*O*-metiltransferase, catalisa a metilação do catecol estrógeno formando o metoxiestrógeno, impedindo a formação de quinonas estrógenos (DAWLING et al., 2001). A utilização de modelos de BHE pode contribuir para que melhor se entenda a resposta da barreira metabólica frente ao dano induzido pelos catecóis, a interação entre células que a

compõem, mecanismos envolvidos em doenças do SNC, bem como o desenvolvimento de drogas como protótipos terapêuticos que precisam atravessar a barreira para desencadear a ação farmacológica.

1.6 INFECÇÃO POR *NEOSPORA* COMO MODELO DE DANO CEREBRAL

Neospora caninum (*Nc*) é um protozoário coccídeo intracelular obrigatório, que possui tropismo pelo tecido do SNC e induz alterações neuromusculares em várias espécies de animais. Taquizoítas de *Nc* proliferam rapidamente no citoplasma levando ao rompimento da membrana celular. Este parasito, do filo Apicomplexa, vem sendo estudado pelo grupo de pesquisa do LabNq sob a coordenação da profa. Dra. Maria de Fátima Costa e constitui um modelo prático de invasão de patógeno sobre células do SNC, como neurônios e glia.

Culturas primárias de astrócitos de ratos infectados por *Nc* produzem citocinas e TNF- α e liberam um radical neurotóxico, o óxido nítrico (NO), em 24 e 72 horas após início da infecção (PINHEIRO et al., 2006b).

A infecção por *Nc* promove alterações morfológicas e metabólicas em cultura astrogliar nas primeiras 24 h, aumentando a atividade da lactato desidrogenases e a liberação de IL-10, sugerindo que a hipertrofia e a resposta imune astrogliar contribuem para a invasividade parasitária (PINHEIRO et al., 2006a). Apesar da atividade da lactato desidrogenase ser indicativo de hipóxia, o parasito não altera a atividade mitocondrial, preservando a maquinaria produtora de energia do hospedeiro (PINHEIRO et al., 2007). Além disso, células gliais infectadas por *Nc* apresentam reatividade aumentada e liberam grande quantidade de IL-6 e IL-10, consequentemente favorecendo o ambiente ao parasito e ao mesmo tempo controlando o crescimento dos taquizoítas devido o aumento na liberação de TNF- α e NO (PINHEIRO et al., 2010).

Em cocultura de neurônio-glia previamente estimulada com interferon e em seguida infectadas com *Nc*, ocorreu liberação de IL-10 e preservação neural, porém sem alterar produção de NO (JESUS et al., 2014). Faz-se necessário entender os mecanismos utilizados pelo parasito para modular as células e atravessar a BHE.

1.7 CULTURA DE CÉLULAS ENDOTELIAIS CEREBRAIS E GLIAIS COMO MODELO DE BHE

Culturas de células endoteliais cerebrais e gliais vêm sendo alvo de estudos de permeabilidade de drogas pela BHE, no desenvolvimento de tecnologias aplicadas à neurociência e no entendimento de doenças que atingem o SNC.

As células cerebrais de ratos são relativamente fáceis de serem obtidas, no entanto a utilização de células de animais em experimentos é uma prática em controle do comitê de ética no uso de animais (CEUA), porém necessária na simulação de um SNC real. A maior preocupação no momento é desenvolver estratégias de redução no uso de animais, visando a otimização do cultivo. O melhoramento do método de conservação destas células em congelamento e imortalização celular tem objetivo de obter linhagens com características fenotípicas e genotípicas preservadas. Culturas primárias de CEC em baixas passagens mantêm muitas propriedades biológicas e morfológicas da BHE, *in vitro*, como a expressão de enzimas metabolizadoras, de proteínas de junção e liberação de antígenos (CECCELLI et al., 2007).

As CEC são as principais constituintes da BHE. Estas células crescem sobre filme de colágeno, simulando lâmina basal que é construída de laminina, fibronectina e vários tipos de colágenos. Estas células possuem um elucidado complexo proteico estrutural e funcional de impedimento estérico espacial e ativo que regula a entrada de substâncias no cérebro e um sistema de defesa antioxidante eficaz (HAORAH et al., 2011). Já ficou comprovada a expressão de genes que codificam proteínas de efluxo, como as MDR, responsáveis pela quimiorresistência de drogas, enzimas responsáveis pelo metabolismo de fármacos e xenobióticos, como as isoformas de CIP (DAUCHY et al., 2008), além de enzimas envolvidas no metabolismo de lipídios, proteínas e catecolaminas (EL-BACHÁ e MINN, 1999; LAGRANGE et al., 1999).

Dentre as células gliais, os astrócitos sofrem alterações genômicas irreparáveis e irreversíveis conduzindo às características neoplásicas, os astrocitomas. Sendo o glioblastoma multiforme a forma mais agressiva de glioma. Linhagens de glioblastoma já foram caracterizadas a partir de glioblastoma multiforme humano. Apresentam bom crescimento, duplicação de 30 a 48 h, uma manutenção facilitada com reprodutibilidade de resultados (BOCCHINI, 1991).

Existem vários modelos de BHE, envolvendo culturas primárias de CEC humanas, de boi, de rato, de camundongos. CEC de ratos imortalizadas por transfecção de plasmídeo com

o gene *E1A* de adenovirus com adição de gene que confere resistência ao aminoglicosídeo geneticina de *Simiar virus*, foram cultivadas em insertos com colágeno sobre células murinas de glioma (LAGRANGE et al., 1999). As CEC de humanos, denominadas HCEC e as hBEC, transfectadas com plasmídeo com o gene *E1A* de adenovirus com adição de gene que confere resistência ao aminoglicosídeo geneticina também foram usadas em modelos de BHE (KANNAN et al., 2000; WASSMER et al., 2006). Outro modelo usou CEC de camundongos, bEnd5, e humanas, a hCMEC/D3, imortalizadas por ativação do caminho canônico de Wnt- β -catenina (PAOLINELLI et al., 2011). Mais recentemente surgiram os modelos de BHE utilizando CEC transfectadas com antígeno T de *Simiar virus* 40, sensível a temperatura em cocultivo com astrócitos (SANO et al., 2010; KAMIICHI et al., 2012). São poucos os trabalhos envolvendo cultura primária de CEC de rato.

Culturas mistas de células gliais permitem um ambiente de comunicação entre estas células na defesa contra os danos e são utilizadas para avaliar respostas inflamatórias, citotóxicas a xenobióticos, imunológicas e antioxidantes (LOSCIUTO et al., 2012).

As células interagem entre si através de sinalização parácrina, endócrina, sináptica ou dependente do contato. A sinalização parácrina depende de sinais liberados no espaço extracelular e atua localmente sobre as células próximas. Na interação parácrina, as moléculas sinalizadoras agem como mediadores locais, tais como fatores de crescimento, citocinas, e outras, por sua ligação a receptores das células vizinhas de diferentes tipos, modificando as respostas das células-alvo (ALBERT, 2010).

Estudos mostram que células endoteliais cerebrais e gliais respondem de maneira diferente ao dano, em cultura mista, quando comparadas em culturas isoladas (WILLS 2011; LOSCIUTO et al. 2012), emergindo assim a hipótese que a interação parácrina entre as CEC e astrócitos modifica a resposta destas células aos xenobióticos e invasores patogênicos, *in vitro*, quando comparada às respostas delas isoladamente.

Entender a interação das células gliais com as CEC e a modulação dos mecanismos detoxificadores pode contribuir para ampliar o conhecimento sobre os tumores e para um avanço importante no desenvolvimento de novos alvos moleculares para a terapia destes. Além disso, pode contribuir com tecnologias que facilitam o desenvolvimento de modelos de BHE.

2. OBJETIVO GERAL

Avaliar a interação parácrina entre células endoteliais e glias-em modelo *in vitro* de BHE, em condições fisiológicas e patológicas.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1 - Avaliar a interação parácrina entre as células (CEC e astrócitos; CEC e C6; CEC e microglia), induzindo alterações morfológicas nestas.

2 - Avaliar a citotoxicidade e a expressão de citocinas em astrócitos isolados expostos ao catecol.

3 - Avaliar a interação entre CEC e astrócitos durante exposição ao catecol, observando sua citotoxicidade e alterações na expressão de GSTpi, UGT1A6 e gp-P.

4 - Determinar a interação parácrina entre astrócitos e CEC e entre GL-15 e CEC, na espoliação de GSH induzida pelo catecol.

5 - Verificar a interação parácrina de CEC e astrócitos na fragmentação de DNA induzida por catecol.

6 – Verificar a interação parácrina entre CEC e astrócitos sobre as características da barreira física.

7 - Avaliar a interação parácrina entre CEC e astrócitos infectados por *Nc* na modulação da expressão dos genes das citocinas IL-10, TNF e fatores neurotróficos em CEC.

3 METODOLOGIA

3.1 MODELO DE ESTUDO E SÚMULA EXPERIMENTAL

Estudo de experimentação *in vitro* envolvendo células do SNC de origem animal (rato *Wistar*) em cultura primária e linhagens de células humanas (GL-15) e murinas (C6). O uso de animais na execução do projeto teve a aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), protocolo numero 067/2014 (**Anexo 1**) e os animais foram provenientes do biotério do Laboratório de Neurociências do Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia.

Para entender a interação parácrina entre as CEC e células gliais (astrócitos, microglia e glioma) modulando os mecanismos detoxificadores da BHE, em condições fisiológicas, inicialmente foi avaliada a influência das células gliais no sentido de induzirem alterações morfológicas nas CEC, refletindo no fechamento da monocamada endotelial (análise por microscopia de contraste de fase). Foi também avaliada a influência da microglia sobre astrócitos isolados, mediante o dano induzido pelo catecol (teste do brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolina (MTT), imunocitoquímica e qRT-PCR). Na etapa seguinte foi verificada a indução da resistência à toxicidade do catecol em CEC pelas células gliais e o contrário, a indução de resistência à toxicidade do catecol em astrócitos, por indução parácrina de CEC, *in vitro*, utilizando cultivo primário de CEC de ratos *Wistar* adultos (teste de MTT). O protocolo de isolamento das CEC foi como descrito em Bayol-Denizot (Bayol-Denizot et al, 2000) com modificações e de astrócitos obtidos de ratos recém-nascidos como descrito por Cookson e Pentreath et al., 1994, com modificações. Para entender a função metabólica das células na barreira protetora do cérebro, foi verificada a interação entre CEC e astrócitos sobre a expressão de enzimas envolvidas na fase II do metabolismo de fármacos e xenobióticos, as isoformas UGT1A6, GSTpi e a glicoproteína (bomba de efluxo) envolvida na fase III, a gp-P (análises por citometria de fluxo, imunocitoquímica e *Western blot*). Para verificar a interação celular mediante o dano, foi avaliada a espoliação de GSH pelo catecol em CEC moduladas por meio condicionado por astrócitos (MCAst), em GL-15 na presença de meio condicionado por CEC (MCCEC) e em GL-15 em cocultura com CEC (teste de monoclorobimano). A genotoxicidade induzida pelo catecol foi avaliada em CEC moduladas por MCAst e astrócitos modulados por MCCEC (Teste de cometa). O fechamento da monocamada endotelial foi verificado pela medida da resistencia elétrica transendotelial

(TEER) usando um voltímetro e imunomarcção para ocludina, uma proteína de junção da BHE.

Para entender a modulação intercelular em condições patológicas, foi verificado se CEC tornam as células GL-15 de glioblastoma humano mais resistentes à espoliação de GSH induzida pelo catecol. Por fim, foi verificada a expressão dos genes de citocinas (FNT- α e IL-10) e de genes de fatores neurotróficos (BDNF, GDNF e NGF) em astrócitos infectados com *Nc* e em CEC moduladas com meio condicionado de astrócitos infectados por *Nc* (análises por qRT-PCR).

3.2 ISOLAMENTO DE COLÁGENO DE CAUDA DE RATOS

O colágeno foi isolado de caudas de ratos *Wistar* adulto, obtido a partir de adaptações feitas no protocolo (RAJAN et al., 2006). As caudas foram higienizadas em hipoclorito a 2%. A pele foi removida, os tendões foram previamente pesados e em seguida imergidos em álcool a 70% por 10 minutos para assepsia. Para remoção do colágeno, os tendões foram imersos em 250 mL de ácido acético a 0,5 M para cada 1g de tendão, com agitação durante 72 horas a 4°C. Após este período, o homogenato gelatinoso foi centrifugado a 10000 g por 30 min., a 4°C. Ao sobrenadante foi adicionado 1,9 L de NaCl a 10% (m/v), pré-esfriado, 1L para cada 4g de cauda, para precipitação à temperatura de 4°C, por 12 h. No dia seguinte, o material solúvel rico em colágeno foi removido por centrifugação a 10000 g, por 30 min., a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspensionado em 800 mL de ácido acético a 0,25 M, mantido sob agitação até dissolver o colágeno, a 4°C. Após dissolver o colágeno, foi realizada diálise contra ácido acético diluído 1:1000 (1 mL por 1000 mL, v/v) utilizando uma membrana MW 12-14000 Da (Sigma® Aldrich, St. Louis, U.S.A), na temperatura constante de 4°C por três dias consecutivos, trocando o tampão duas vezes ao dia, para purificação do colágeno. Após obtenção do colágeno, foi realizada dosagem de proteína (item 3.11) e foi analisado o grau de pureza por eletroforese em gel comparando as bandas com colágeno tipo I de rato, comercial (Sigma® Aldrich, St. Louis, U.S.A). Foi esterilizado por centrifugação a 17000 g, por 1 h, a 4°C, e envasamento estéril, mantidos na temperatura de 4-8°C.

3.3 CULTURA CELULAR

3.3.1 Meios de cultura e soluções

3.3.1.1 Meio Eagle Modificado por Dubelcco (DMEM) HAM F12

(Life Technologies, Grand Island, NY); suplementado com 35 mM de bicarbonato de sódio (Sigma® Aldrich, St. Louis, U.S.A); 100 U/mL penicilina e 100 µg/mL estreptomicina (Life Technologies, Grand Island, NY); Soro Fetal Bovino (SFB) a 10% (v/v) (Life Technologies, Grand Island, NY).

3.3.1.2 Meio de crescimento endotelial (EGM)/DMEM HAM F12

O Meio de crescimento endotelial suplementado com EBM *Bullet kit* (Lonza CC3162) foi adicionado ao meio DMEM HAM F12 suplementado (ítem 3.3.1.1) na proporção de 50% (v/v). Composição do EBM *Bullet kit*:

- 0,02 mL de soro fetal bovino
- 5 ng/mL de fator de crescimento epidérmico, células nervosas e epiteliais
- 10 ng/mL de fator de crescimento de fibroblasto básico - recombinante humano
- 20 ng/mL de fator de crescimento insulina ligado (long R3 IGF-1)
- 0,5 ng/mL de fator de crescimento endotelial vascular 165 - recombinante humano
- 1 µg/mL de ácido ascórbico
- 0,2 µg/mL hidrocortisona

3.3.1.3 Meio Eagle modificado por Dubelcco

(DMEM) suplementado com 44 mM de bicarbonato de sódio; 100 U/mL penicilina e 100 µg/mL estreptomicina; 10 % (v/v) de Soro Fetal Bovino (SFB).

3.3.1.4 *Solução de Hank's* (do inglês, Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) 1x concentrado

- 1,2 mM de cloreto de cálcio (CaCl)
- 0,49 mM de cloreto de magnésio (MgCl)
- 0,40 mM de sulfato de magnésio (MgSO₄)
- 5,3 mM de cloreto de potássio (KCl)
- 0,4 mM de fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄)
- 4,1 mM de bicarbonato de sódio (NaHCO₃⁻)
- 137 mM de cloreto de sódio (NaCl)
- 0,4 mM de fosfato de sódio dibásico (HN_a₂PO₄)

5,5 mM de dextrose ($C_6H_{12}O_6$)

3.3.1.5 *Gradiente de Percol*

Percol (Sigma® Aldrich, St. Louis, U.S.A)/HBSS 2× concentrado 1:1 (v/v), centrifugação de 1 hora, a 17000 g.

3.3.1.6 *Solução de Lise*

Duodecil sulfato de sódio 200 g/L em dimetilformamida a 50%. Foi ajustado o pH para 4,7 com solução ácida (690 mM de ácido clorídrico (HCl) em ácido acético a 80%).

3.3.1.7 *Solução Salina Tamponada (SST)*

150 mM de NaCl.

4 mM de KCl.

3,15 mM de $CaCl_2$.

5 mM de glicose.

15 mM de HEPES.

Ajustar o pH para 7,4.

3.3.2 **Isolamento de células endoteliais cerebrais de ratos**

As culturas primárias puras de células endoteliais cerebrais foram obtidas de ratos *Wistar*, machos, jovens adultos, de 200-300 g, de acordo com (BAYOL-DENIZOT *et al.*, 2000) com modificações realizadas no Laboratório de Neuroquímica e Biologia Celular (LabNq). Os ratos são mortos por decapitação, em seguida os cérebros são rapidamente removidos, após craniotomia em campo estéril, e resfriados no meio de homogeneização DMEM HAM F12 suplementado, sem soro, de 0 a -2 °C. Os córtices foram suavemente homogeneizados (em homogeneizador de Dounce) em meio de DMEM HAM F12 suplementado, sem SFB (**item 3.3.1.1**), centrifugados a 600 g por 5 minutos, a 4 °C, a massa precipitada foi ressuspensa em uma solução de 1 mg/mL de colagenase (EC 3.4.24.7) /dispase (EC 3.4.24.4) diluída em igual meio anteriormente descrito, para dissociação enzimática por uma hora, a 37 °C. Em seguida, o homogenato foi novamente centrifugado a 1000 g, a 4 °C por 10 minutos. O sedimento obtido foi ressuspensa em 26 % (v/v) de solução de SFB em HBSS (**item 3.3.1.4**) 1× concentrado. Agitar vigorosamente por 1 minuto e em seguida, centrifugar a 2500 g por 10 minutos, a 4 °C. Ao sedimento obtido, foi

adicionado 1 mg/mL de solução de colagenase/dispase e incubado por 3 horas, a 37 °C, sob agitação leve. Após período de incubação, o homogenato foi centrifugado a 1000 g por 5 minutos, a 4 °C. Para separar as CEC, o sedimento obtido foi dissolvido em 2 mL de HBSS 1× e adicionado sobre o gradiente de Percol (**item 3.3.1.5**), em seguida foi centrifugado a 2000 g por 15 minutos. As CEC foram então, homogeneizadas em meio DMEM HAM F12 suplementado (**item 3.3.1.1**) e distribuídas para cultivo em garrafas com superfície de 75 cm² cobertas com 20 µg/cm² de colágeno de cauda de rato para expansão celular, a 37 °C em incubadora com 5 % de CO₂. A primeira troca de meio foi realizada com 24 horas e as trocas seguintes a cada 48 h, até confluência celular.

3.3.2.1 Padronização da cultura de CEC

O protocolo de isolamento das CEC foi ajustado em 4 pontos:

- a) Redução do tempo de dissociação enzimática;
- b) Remoção do soro obtido dos ratos na etapa inicial do cultivo, devido a citotoxicidade do citrato de sódio e inadequação com outro anticoagulante;
- c) substituição do dextran por SFB a 26 %;
- d) Adição de meio de cultivo, próprio para células endoteliais, o EGM-2, constituído de suplementos que estimulam o crescimento.

Para que as CEC adquiram as alterações morfológicas esperadas em cultivo, a dissociação celular precisa ser moderada, preservando microvasos para iniciar as colônias de crescimento celular. Os microvasos desaparecem com a formação da monocamada celular.

3.3.2.2 Cultivo de células endoteliais cerebrais em EGM/DMEM HAM F12

No dia seguinte ao isolamento das CEC, o meio de cultivo foi substituído por EGM/DMEM HAM F12 1:1 v/v (**item 3.3.1.2**), realizou-se trocas desse meio a cada 48 h, até confluência. Para os experimentos, as células foram lavadas com PBS (2 vezes) e em seguida foram mantidas em DMEM HAM F12 por 24 h. O meio condicionado por CEC (MCCEC) foi obtido das culturas semiconfluentes dessas células em DMEM HAM F12 suplementado, após 24 h de cultivo. Após este período, o meio foi removido da cultura, centrifugado a 532 g, 10 min, para remoção de possíveis células remanescentes e/ou debris celulares. As células foram plaqueadas para os experimentos na densidade de $3,1 \times 10^4$ células/cm².

3.3.3 Isolamento de mistura glial de ratos

A mistura glial primária de ratos *Wistar* foi obtida conforme método descrito por (COOKSON E PENTREATH, 1994), com adaptações feitas pelo LabNq. Após o nascimento (0 a 48 horas), os animais foram sacrificados por decapitação e craniotomia, os córtices cerebrais foram removidos e dissecados em campo estéril. As meninges foram descartadas, os córtices foram submetidos a dissociação celular mecânica com auxílio de pipeta de Pasteur de vidro, em meio de cultura sem SFB, gelado (item **3.3.1.3**), em seguida foi centrifugado a 2000 g, por 10 minutos, a 4°C. A suspensão celular em meio de cultivo (item **3.3.1.1**) foi distribuída em garrafas de 75 cm², mantidas a 37 °C em incubadora com ambiente úmido com 5 % de CO₂.

3.3.3.1 *Cultura de astrócitos sem microglia (Protocolo 1)*

Para obter cultura pura dos astrócitos, as células foram isoladas como descrito no item 3.3.3, em seguida foram ressuspensas em meio DMEM HAM F12 suplementado, e cultivadas em ambiente com 5 % de CO₂, a 37 °C. Após 48 horas de cultivo, as garrafas contendo as células foram fortemente agitadas para remoção da microglia, o meio foi descartado e em seguida as células foram lavadas duas vezes com PBS. As trocas do meio foram realizadas a cada 48 h até obter confluência celular. O grau de pureza das células foi determinado por imunocitoquímica para GFAP (proteína glial fibrilar ácida), um marcador de filamentos citoplasmáticos de astrócitos, e CD11 b/c anticorpo contra OX42 identificador de microglia.

O meio condicionado por astrócitos (MCAst) foi obtido das culturas semiconfluentes dessas células em DMEM HAM F12 após 24 h. Após este período de cultivo, o meio foi removido da cultura, centrifugado a 532 g, por 10 min, para remoção de possíveis células remanescentes e/ou debris celulares.

3.3.3.2 *Cultura glial para obtenção de astrócitos isolados (Protocolo 2) e microglia*

As células gliais de ratos foram obtidas como descrito no item **3.3.3**; foram cultivadas em meio DMEM HAM F12 suplementado com 10 % (v/v) de SFB (item **3.3.1.1**) em ambiente com 5 % de CO₂, a 37 °C. A cultura glial foi mantida sem troca de meio até obter confluência celular. Após confluência, a microglia foi removida conforme protocolo de MECHA et al. (2011), por agitação mecânica da garrafa de cultura da mistura glial, em

equipamento *SHAKER*, a 200 rpm, por 3 h. Após este período, o meio de cultivo foi removido da cultura para obter duas culturas celulares: cultura de microglia e cultura de astrócitos (P2). Para obter a cultura de microglia, após agitação mecânica da cultura glial, o meio de cultivo contendo-a foi removido da garrafa, centrifugado a 1000 g por 10 minutos. O sedimentado celular foi ressuspendido em meio DMEM HAM F12 suplementado (item **3.3.1.1**), semeadas em placas de cultivo de 10 cm de diâmetro e cultivadas a 37 °C, em estufa com 5 % de CO₂, com troca de meio a cada 48 h, até semiconfluência da monocamada celular. O meio condicionado por microglia (MCMG) foi obtido por exposição destas células ao meio DMEM HAM F12 suplementado por 24 h. Após este período, o meio condicionado foi removido, em seguida foi centrifugado a 532 g, por 10 min., para remoção de debris celulares ou possíveis células soltas.

Os astrócitos que ficaram aderidos na garrafa foram lavados com 5 mL de PBS (duas vezes), em seguida foi adicionado um novo meio de cultivo DMEM HAM F12 suplementado. Estas células foram cultivadas em estufa com 5 % de CO₂, a 37 °C, por cinco dias consecutivos até a realização do experimento, com agitação manual da garrafa antes das trocas do meio, a cada 48 horas. O grau de pureza das células foi determinado por imunocaracterização de GFAP e OX-42.

3.3.4 Cultura de linhagem de glioma murino

As células de glioma murino (C6) foram cultivadas em meio DMEM HAM F12 suplementado (item **3.3.1.1**), distribuídas em placa de 10 cm de diâmetro específica para cultivo celular, incubadas em estufa com 5% de CO₂, a 37°C. O meio de cultivo foi trocado a cada 48 horas, o subcultivo foi realizado com intervalo máximo até 12 passagens. O meio condicionado por C6 (MCC6) foi obtido por exposição destas células em semiconfluência ao meio DMEM HAM F12 suplementado por 24 h. Após este período em cultivo, o MCC6 foi centrifugado a 532 g, por 10 min, para remoção de debris celulares ou possíveis células soltas, acondicionado em frasco estéril para uso.

3.3.5 Cultura da linhagem GL-15 de glioblastoma humano

As células de glioblastoma foram cultivadas em meio DMEM HAM F12 suplementado (item **3.3.1.1**) até confluência, semeadas em placa de 10 cm de diâmetro,

específica para cultivo celular, incubadas em estufa com 5% de CO₂, a 37°C. Os subcultivos foram realizados em intervalos até 10 passagens.

Todas as células da linhagem foram estocadas em nitrogênio líquido até o momento do plaqueamento.

3.3.6 Cultivo de CEC de rato e indução de alterações morfológicas por meio condicionado

As CEC de ratos, obtidas como descrito no item **3.3.1**, que estavam quiescentes em cultivo por 20 dias em DMEM HAM F12, tiveram o meio de cultivo substituído pelo meio condicionado por diferentes células: astrócitos (MCAst), microglia (MCMG) ou glioma murino (MCC6), obtidos conforme itens **3.3.3.1**, **3.3.3.2** e **3.3.4**, respectivamente. A troca dos meios condicionados foi realizada a cada 48 horas até confluência celular. O desenvolvimento da cultura foi acompanhado diariamente e a morfologia registrada em câmera digital acoplada ao microscópio de contraste de fase. Também foi realizada imunocitoquímica para determinar fenótipos destas células (item **3.10**).

3.4 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO CATECOL SOBRE OS ASTRÓCITOS EM DIFERENTES PROTOCOLOS DE CULTIVO

Para avaliar a citotoxicidade do catecol sobre os astrócitos (itens **3.3.3.1** e **3.3.3.2**), as células foram removidas da garrafa após adição de 2,5 g/L de tripsina/250 mg/L de ácido etilenediaminotetracético (EDTA) em tampão fosfato de sódio 0,01 M para realizar a contagem celular com exclusão de células mortas com uso de azul de tripan. As células foram distribuídas em placas de 96 poços numa densidade de $3,1 \times 10^4$ células/cm², e em seguida foram mantidas em cultivo em meio DMEM HAM F12, em estufa de 75 cm² em ambiente úmido, com 5% de CO₂, a 37°C. No dia seguinte ao plaqueamento, o meio foi removido, as células foram lavadas com PBS e em seguida foi adicionado novo meio de cultivo e catecol nas concentrações entre 10 e 2000 µM, para exposição por 72 h. Um grupo de células foi cultivado em meio DMEM HAM F12 sem catecol (controle) e em meio com 2×10^{-5} M de HCl, correspondendo à diluição final do catecol (controle HCl).

Os testes foram realizados nos astrócitos isolados, provenientes dos dois cultivos, utilizando as mesmas diluições para os dois grupos em estudo: grupo P1 - astrócitos em

cultivo com remoção precoce da microglia (item **3.3.3.1**); grupo P2 - astrócitos obtidos de cultivo com remoção tardia da microglia (item **3.3.3.2**).

Após o período de exposição ao catecol, o meio do cultivo foi removido para determinar a formação de quinonas (moléculas altamente citotóxicas), espectrofotometricamente a 405 nm, como descrito (PEREIRA et al., 2004). Um novo meio de cultivo foi adicionado para determinação da viabilidade celular (MTT), item **3.8**.

3.4.1 Exposição dos astrócitos isolados P1 e P2 ao catecol - avaliação morfológica e funcional.

Astrócitos obtidos de ambos os protocolos (itens **3.3.3.1** e **3.3.3.2**), foram expostos a 100 e 300 μM de catecol em DMEM HAM F12 com e sem GSH a 3,5 mM, incubados em atmosfera úmida com 5 % de CO_2 , a 37°C, por 72 h. As células em DMEM HAM F12 sem catecol foram utilizadas como controle. Após 72 h de exposição, as células foram fixadas com paraformaldeído (PFA) a 4 % para imunocitoquímica para GFAP/OX-42 (item **3.10**).

Em outro experimento, nas mesmas condições anteriormente descritas, após 72 h de exposição, o meio de cultura foi descartado e sobre as células foi adicionado 1 mL de Trizol[®] (solução monofásica de fenol, isotiocianato de guanidina, e outros componentes com propriedades que facilitam o isolamento de vários tipos de RNA de tamanho molecular pequeno ou grande) conforme protocolo (CHOMCZYNSKI; SACCHI, 1987), para dissociação do complexo nucleoproteína e análise dos genes de citocinas e fatores neurotróficos por qRT-PCR (item **3.21**).

3.5 AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE MICROGLIA E ASTRÓCITOS MEDIANTE DANO PELO CATECOL

Para avaliar a influência da microglia sobre os astrócitos (P1) cultivados sem microglia (itens **3.3.3.1**), as células foram removidas da garrafa após adição de 2,5 g/L tripsina/250 mg/L EDTA em tampão fosfato de sódio 0,01 M, pH 7,4, foi realizada contagem celular com exclusão de células mortas com uso de azul de tripan e distribuídas em placas de 96 poços, numa densidade de $3,1 \times 10^4$ células/cm², em meio condicionado de microglia (MCMG), em diferentes proporções (20 e 50%). No dia seguinte ao plaqueamento, o meio foi removido, as células foram lavadas duas vezes com PBS e substituído por meio condicionado (MCMG) e catecol nas concentrações entre 10 e 2000 μM , sendo 2 grupos:

Grupo 1 - Astrócitos cultivados em meio condicionado por microglia 20% (v/v) MCMG/DMEM HAM F12.

Grupo 2 - Astrócitos cultivados em meio condicionado por microglia 50% (v/v) MCMG/DMEM HAM F12.

Para cada grupo, os astrócitos cultivados em meio DMEM HAM F12 sem catecol e outro com 5×10^{-4} M de HCl (solvente do catecol), foram utilizados como controle negativo. As células foram mantidas em ambiente úmido com 5% de CO₂, a 37°C por 72 h. Após o tempo de exposição das células ao catecol, o meio foi removido para avaliação espectrofotométrica da formação de quinonas a 405 nm. Um novo meio de cultivo DMEM HAM F12 suplementado, contendo 20% de solução de MTT (5mg/mL em PBS), foi adicionado sobre as células para avaliação da viabilidade celular (item 3.8).

3.6 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA DE CEC NA RESISTÊNCIA À TOXICIDADE DO CATECOL EM PRESENÇA DE MCAst

Para avaliar a citotoxicidade do catecol sobre as CEC, estas foram semeadas numa densidade de $3,1 \times 10^4$ células/cm². No dia seguinte ao plaqueamento, as células foram lavadas (duas vezes) com PBS e iniciou-se a exposição ao catecol.

Para avaliar a capacidade de interação entre os astrócitos e CEC, na avaliação da toxicidade do catecol nas concentrações entre 30 e 6000 µM em CEC, *in vitro*, três grupos experimentais foram formados:

- As CEC em meio DMEM HAM F12;
- As CEC cultivadas em MCAst 50% (v/v);
- As CEC cultivadas em 100 % MCAst;

Para cada grupo acima, CEC cultivadas em meio DMEM HAM F12 sem catecol e em meio DMEM HAM F12 com 5×10^{-4} M de HCl (solvente do catecol), foram utilizadas como controle negativo. As células foram mantidas em ambiente úmido com 5% de CO₂, a 37°C por 72 h.

Após período de incubação, a exposição ao dano foi interrompida removendo o meio de cultivo para determinar a formação de quinonas espectrofotometricamente a 405 nm (PEREIRA et al., 2004). Um novo meio de cultivo foi adicionado à cultura para determinação da viabilidade celular (ensaio de MTT, item 3.8).

3.7 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA DOS ASTRÓCITOS NA RESISTÊNCIA À TOXICIDADE INDUZIDA PELO CATECOL EM MEIO CONDICIONADO POR CEC

Para avaliar a interação entre CEC e astrócitos na toxicidade induzida pelo catecol nas concentrações entre 10 e 2000 μM em astrócitos, *in vitro*, três grupos experimentais foram formados:

- Astrócitos em meio DMEM HAM F12;
- Astrócitos em 50% de MCCEC (v/v);
- Astrócitos em MCCEC100 %;

Para cada grupo, astrócitos cultivados em meio DMEM HAM F12 sem catecol e em meio com 5×10^{-4} M de HCl (solvente do catecol) foram utilizados como controle negativo. As células foram incubadas em ambiente úmido com 5% de CO_2 , a 37 °C. Após 72 h de incubação, o meio de cultivo foi removido das culturas para determinação da formação de quinonas (405 nm) (PEREIRA et al., 2004). Um novo meio DMEM HAM F12 foi adicionado para determinação da viabilidade celular (ensaio de MTT, item **3.8**).

3.8 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR

Com o intuito de verificar a capacidade das desidrogenases mitocondriais converterem o MTT em formazan, mediante o dano oxidativo induzido pelas quinonas, após as 72 horas de incubação das células com catecol, o processo foi interrompido com a substituição do meio de cultivo por outro contendo 1 mM de MTT. As placas contendo as células foram incubadas em 5% de CO_2 , a 37°C, por duas horas. Um poço com apenas meio de cultivo sem células foi utilizado como branco. Neste período, por ação das desidrogenases mitocondriais das células viáveis, ocorre redução do MTT de cor amarela, em formazan de cor purpúrea, conforme a capacidade de metabolização das células e a concentração utilizada (Mosmann, 1983). Após duas horas, o meio contendo o MTT foi removido e foi adicionado 100 μL de solução de lise (item **3.3.1.6**). Para avaliar a formação do produto de formazan foi realizada a medida da absorbância no comprimento de onda de 595 nm, em leitor de microplacas (Thermo Plate, modelo TP Reader - tipo B, Varioskan Flash Thermo Científico), após dissolver o precipitado (12 horas).

3.9 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO CATECOL NA EXPRESSÃO DE OCLUDINA, FATOR VIII, GSTpi, UGT1A6 E gp-P EM CEC

Para determinar expressão de ocludina, fator VII, gp-P, GSTpi e UGT1A6 em CEC na presença do MCAst e catecol, as células foram cultivadas nas seguintes condições:

- As CEC em meio DMEM HAM F12;
- As CEC foram expostas a 3000 μ M de catecol em meio DMEM HAM F12;
- As CEC foram expostas a 3000 μ M de catecol em MCAst a 50% (v/v);
- As CEC foram expostas a 3000 μ M de catecol em MCAst 100%;

Exposição por 72 h em estufa com atmosfera úmida com 5% de CO₂, a 37°C.

Para determinar a expressão de gp-P, GSTpi e UGT1A6 em astrócitos modulados com MCCEC expostas ao catecol, o experimento envolveu os seguintes grupos:

- Astrócitos em meio de cultivo DMEM HAM F12;
- Astrócitos foram expostos a 20 μ M de catecol em meio DMEM HAM F12;
- Astrócitos foram expostos a 20 μ M de catecol em MCCEC 50% (v/v);
- Astrócitos foram expostos a 20 μ M de catecol em MCCEC100 %;

Exposição por 72 h em estufa com atmosfera úmida com 5% de CO₂, a 37°C.

Após tempo de exposição, as células foram fixadas na lamínula com paraformaldeído (PFA) a 4% para realização de imunocitoquímica e análise por microscopia de fluorescência (item 3.10) e fixadas em suspensão para análise por citometria de fluxo.

3.10 IMUNOCITOQUÍMICA

A imunomarcagem de proteínas envolvidas no estudo foi baseada em protocolo previamente publicado (ZINCHUK et al., 2009).

3.10.1 Fixação das células

Após tempo de exposição, o sobrenadante foi removido dos poços, as células foram lavadas (3 vezes) com PBS e para fixar as células foi adicionado 400 μ L de PFA a 4%, à temperatura ambiente por 20 minutos. Em seguida, o PFA foi removido, e as células foram novamente lavadas (3 vezes) com 400 μ L de PBS, por 5 minutos cada lavagem. As células fixadas foram conservadas em PBS à temperatura de 4 a 8°C.

3.10.2 Preparo das lâminas e imunomarcção

As células foram lavadas com 400 μ L de PBS, o excesso de PBS foi removido, e em seguida adicionado 100 μ L de Triton X-100 a 0,3% por 15 minutos. Após retirada do Triton X-100 a 0,3%, as células foram lavadas com 400 μ L de PBS (3 vezes), em seguida foram incubadas com 200 μ L de solução de albumina bovina (BSA) a 5% diluída em PBS por 1h à temperatura ambiente. Decorrido o tempo, a solução de BSA/PBS foi removida e as células fixadas foram incubadas com 40 μ L da solução com anticorpo primário de interesse, mantidas por no mínimo 12 horas em câmara úmida a 4°C (importante para evitar a evaporação do anticorpo). Na dupla marcação, simultaneamente, os anticorpos utilizados foram desenvolvidos em espécies diferentes. O controle do anticorpo neste momento foi incubado só com PBS/BSA 1%.

No dia seguinte, após incubação, as células foram lavadas (3 vezes) com PBS por 5 minutos cada lavagem, o excesso do líquido foi removido com o auxílio de um papel filtro. Na sequência, foi adicionado BSA a 1% em PBS nas lamínulas e mantido por 20 min para rebloquear a reação com os anticorpos. Foi adicionado sobre as células o anticorpo secundário de interesse, diluído em BSA a 1% em PBS (Tabela 1), por 1h, protegido da luz (em câmara escura) à temperatura ambiente.

As células foram lavadas com PBS (três vezes) e incubadas com intercalante de núcleo, o 4,6-diamino 2-fenilindol (DAPI) por 5 minutos e em seguida foi realizada a lavagem com PBS (3 vezes). As lamínulas foram colocadas sobre lâminas com adição de *N*-propilgalato para prevenir perda de fluorescência.

A análise das lamínulas e as imagens foram obtidas através de microscópio de fluorescência (Olympus BX 51 - URA2, San Jose, U.S.A.), com uso de câmera digital e por microscopia confocal em microscópio invertido (DM16000B) e *software* de deconvolução AF6000B (Leica Microsystem). A intensidade de fluorescência foi quantificada diretamente dos "*stracks*" obtidos do microscópio confocal através do *software Image J*.

Tabela 1: Anticorpos utilizados na imunocitoquímica

Anticorpo Primário	Diluição	Anticorpo Secundário	Diluição	Função (marcador)
GFAP - coelho	1:300	Bode Alexa fluor® 594 anti-coelho IgG [H&L] (cod A11012)	1:500	Astrócitos
Glutamina sintetase - coelho	1:500	Bode Alexa fluor® 488 anti-coelho IgG [H&L] A11008	1:500	Astrócitos
OX-42 - camundongo	1:500	Bode Alexa fluor® 488 anti-camundongo [H&L] cod 11001	1:500	Microglia
Anti Fator VIII - frango	1:200	Bode Alexa fluor® 488 anti-frango [H&L] Ab 150169	1:500	Células endoteliais
Anti UGT1A6 - Coelho	1:500	Bode Alexa fluor® 594 anti-coelho IgG [H&L] cod A11012	1:500	Isoforma UGT1A6
Anti Ocludina - camundongo	1:500	Bode Alexa fluor® 594 anti-camundongo (cod 11005)	1:500	Proteína de oclusão
Anti gp-P - camundongo	1:500	Bode Alexa fluor® 594 anti-camundongo (cod 11005)	1:500	Bomba de efluxo, gp-P
Anti GSTpi - coelho	1:500	Bode Alexa fluor® 594 anti-coelho IgG [H&L] cod A11012	1:500	Isoforma GSTpi

3.11 DOSAGEM DE PROTEÍNAS

A dosagem de proteínas (LOWRY et al., 1951) foi realizada com a finalidade de padronizar a quantidade de proteínas a ser depositada no gel para eletroforese. Os extratos proteicos foram obtidos por adição de tampão de extração de proteínas (4 M de ureia; 2 mM de ácido etilenoglicol-bis(2-aminoetiléter)-*N',N',N',N'*-tetraacético (EGTA); 62,5 mM de Tris/HCl pH 6,8; 2 % (p/v) de SDS; 0,5 % (v/v) de Triton X-100; 1 % (v/v) e coquetel de inibidores de serina preotease e aminopeptidase (Ipase), nas placas com as células.

Para obtenção da curva padrão, foi depositado, em cada poço correspondente, 5 µL dos padrões nas concentrações entre 0,2 e 1,5 µg/µL de BSA. Para o branco, 5 µL do tampão de extração com Ipase. Para análise da amostra foi adicionado 5 µL das amostras, em triplicata. Em seguida, foram adicionados 25 µL do reagente A' (20µL de SDS a 10% para cada mL do reagente A, Bio-Rad) em cada poço, sendo levemente agitado, protegido da luz. Na etapa seguinte foram adicionados 200 µL do regente B (Bio-RAD).

O produto da reação é a formação de um quelato por compartilhamento de quatro elétrons entre cobre e ligações peptídicas das proteínas que confere à solução a coloração azul, conforme o teor de proteínas. O composto formado foi analisado espectrofotometricamente a 750 nm em leitor de placas Varioskan (Thermo Scientific, Finlândia). Nas análises dos dados o Excel foi utilizado para calcular o teor de proteínas através da equação da reta, determinada pela curva padrão.

3.12 DETERMINAÇÃO DO TIPO DE MORTE CELULAR (ANEXINA/IP)

Para analisar o tipo de morte celular induzida pelo catecol em astrócitos e CEC, as células foram semeadas a uma densidade de $3,1 \times 10^4$ células/cm² nas placas de 3,5 cm² de diâmetro com 2 grupos distintos:

Grupo 1 - Células em DMEM HAM F12 (controle)

Grupo 2 - Células em DMEM HAM F12 expostas ao catecol

As CEC foram expostas a 3000 µM de catecol; astrócitos foram expostos a 40 µM de catecol. As amostras foram incubadas sem interrupção por 72 h, a 37°C, em atmosfera com 5% de CO₂.

Após o período de exposição, as células foram lavadas com PBS e descoladas das placas por adição de tripsina e centrifugadas a 1000 g, por 5 minutos, juntamente com o sobrenadante. Em seguida foi adicionado igual volume de meio com SFB. As células foram novamente centrifugadas a 8254 g, por 5 min. O sobrenadante foi descartado e em seguida as células foram ressuspensas em 100 µL de tampão HEPES (25 mM de HEPES, 140 mM de NaCl, 1 mM EDTA, pH 7,4) e homogeneizadas. Foram adicionados 2 µL de anexina V-FITC e 0,4 µL de iodeto de propídio (IP) a 0,15 mM, sobre as amostras, conforme instruções do protocolo do fabricante (Invitrogen cat. V13242). A anexina V é uma proteína que possui sítio de ligação para fosfatidilserina, localizada na região interna da membrana plasmática em células normais. Porém, resultante do processo de apoptose, fosfatidilserina é externalizada na membrana, facilitando a ligação com a anexina, por isso um bom marcador celular de apoptose. O IP marca as células em necrose ou em estágio tardio de apoptose, permitindo a diferenciação celular dos dois processos. Células, em apoptose tardia, mostram marcação para anexina V e IP. As células não-apoptóticas não são marcadas nem por anexina V, nem por IP.

Para as análises citométricas, foram adquiridos 10.000 eventos pelo citômetro de fluxo FACSÁria Ili (BD San Jose, U.S.A.), utilizando o programa Cell Quest (Macintosh), nos detectores FL-1 FITC para anexina-V e FL-2 PE-CY5-A para IP. A compensação eletrônica de interferência dos filtros e as análises foram feitas com auxílio do *software* FACSDiva Version 6.1.3.

3.13 ANÁLISE DE GLICOPROTEÍNA P, UGT1A6 E GSTPI POR CITOMETRIA DE FLUXO

Além dos controles do tratamento, foram realizados os controles do teste:

- a) Controle sem os anticorpos para avaliar fluorescência própria das células.
- b) Controle só com o anticorpo secundário.

Após tempo de exposição, as células foram removidas das placas utilizando tripsina e centrifugadas a 8254 g por 5 minutos. Ao sedimentado foi adicionado 500 µL de PFA a 4% por 15 minutos para fixação das células. Em seguida a nova centrifugação a 8254 g por 5 minutos para retirar o excesso de PFA, as células foram lavadas 3 vezes com PBS. As células foram permeabilizadas com Triton a 3% por 5 min. A remoção do Triton foi por centrifugação a 8254 g por 5 min, e em seguida foi realizado o bloqueio com BSA 5% em PBS, por 30 minutos. Após remover o BSA por centrifugação a 8254 g por 5 minutos, foi adicionado o anticorpo primário em BSA a 1% para marcação da proteína de interesse (ver **tabela 1**) na diluição indicada pelo fabricante para citometria (1 µL do anticorpo:500 µL da solução) deixando em incubação por uma noite. No dia seguinte, o anticorpo primário foi removido por centrifugação a 8254 g por 5 minutos e as células foram lavadas com PBS. Foi adicionado o anticorpo secundário (contra o anticorpo do animal onde o anticorpo primário foi desenvolvido) por 30 minutos. As células foram homogeneizadas em PBS e analisadas em citômetro de fluxo FACSÁria Ilu (BD San Jose, U.S.A.), utilizando o programa Cell Quest (Macintosh).

3.14 AVALIAÇÃO DA ESPOLIAÇÃO DE GSH POR CATECOL EM CEC

Para avaliar a espoliação de GSH em CEC, o tratamento foi distribuído nos seguintes grupos:

- CEC cultivadas em DMEM HAM F12 (controle negativo).
- CEC expostas a 1 mM de butionina *S*-sulfoximina (BSO) em meio DMEM HAM F12 (controle positivo).
- CEC expostas a 3000 µM de catecol em DMEM HAM F12.
- CEC expostas a 3000 µM de catecol em MCAst 50% (v/v).
- CEC expostas a 3000 µM de catecol em MCAst 100%;

As células foram incubadas por 72 h, em estufa com atmosfera úmida com 5% de CO₂, a 37°C. Após exposição, o meio foi removido e sobre as células foi adicionado 400 µL de meio de cultura contendo 1 mM de monoclorobimano (MCB) por 30 minutos, uma espécie química que conjuga com GSH e emite fluorescência (DE OLIVEIRA et al., 2010). A

espoliação de GSH foi investigada por microscopia de fluorescência (λ_{ex} . 330-385 nm, λ_{em} . 420 nm) (Olympus BX 51 - URA2, San Jose, U.S.A.).

3.15 AVALIAR A ESPOLIAÇÃO GSH INDUZIDA PELO CATECOL EM CÉLULAS GL-15

Inicialmente foi verificada a modulação do meio condicionado por CEC sobre a espoliação de GSH induzida pelo catecol em GL-15. O MCCEC foi obtido como descrito no item **3.3.1**. As células GL-15 foram cultivadas sobre lamínulas, 48 h após plaqueamento (De Oliveira *et al.*, 2010) como descrito no item **3.3.5**. O experimento foi realizado em 5 grupos distintos:

- Células GL-15 cultivadas em meio DMEM HAM F12.
- Células GL-15 expostas a 1 mM de BSO em meio DMEM HAM F12.
- Células GL-15 expostas a 600 μ M catecol em DMEM HAM F12.
- Células GL-15 expostas a 600 μ M de catecol em MCCEC a 50% (v/v).
- Células GL-15 expostas a 600 μ M de catecol em MCCEC a 100%.

As células foram incubadas por 72 h, em estufa com atmosfera úmida com 5% de CO₂, a 37°C. Após exposição, a espoliação de GSH foi verificada por adição de meio de cultura contendo 1 mM de MCB por 30 minutos. As lamínulas foram montadas sobre lâminas com adição de *N*-propilgalato e analisadas por microscopia de fluorescência (Olympus BX 51 - URA2, San Jose, U.S.A.).

Na etapa seguinte do trabalho foi analisada a espoliação de GSH por catecol em GL-15 em cocultivo com CEC. A monocamada de CEC foi obtida por crescimento celular em filme de colágeno (20 μ g/cm²), cultivadas em insertos com diâmetro de 6,5 mm e membrana com área de superfície de 0,3 cm² e poro de 0,4 μ m. Após confluência das CEC, a permeabilidade da membrana a íons foi verificada por medidas de TEER, considerando o fechamento da monocamada endotelial quando maior que 50 Ω /cm² (ver item **3.17**).

As células GL-15 foram semeadas sobre lamínulas, em placas de 24 poços, na densidade de $3,1 \times 10^4$ células/cm². Após 48 h, os insertos com CEC confluentes foram colocados sobre as culturas de GL-15. Catecol ou BSO foram adicionados na porção luminal, no seguinte molde:

- Células GL-15 sobre lamínulas e sob inserto com filme de colágeno sem CEC (controle negativo).

- Células GL-15 sobre lamínula e sob inserto com filme de colágeno sem CEC e 1 mM de BSO (controle positivo).
- Células GL-15 sobre lamínula e sob inserto com filme de colágeno sem CEC e 600 μ M de catecol.
- GL-15 sobre lamínula e sob inserto com filme de colágeno com CEC e 600 μ M de catecol.

As células foram incubadas por 72 h, em estufa com atmosfera úmida com 5% de CO₂, a 37°C. Após este período, o meio foi removido e sobre as células foram adicionados 400 μ L de meio de cultura contendo 1 mM de MCB por 30 minutos. As lamínulas foram montadas em lâminas com adição de *N*-propilgalato e analisadas em microscópio de fluorescência (λ_{ex} . 330-385 nm, λ_{em} . 420nm) (Olympus BX 51 - URA2, San Jose, U.S.A).

3.16 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA ISOFORMA UGT1A6 EM ASTRÓCITOS POR *WESTERN BLOT*

As células foram semeadas em placas de 3,5 cm de diâmetro, na densidade de $3,1 \times 10^4$ células/cm² em grupos distintos:

- Astrócitos em meio de cultivo DMEM HAM F12.
- Astrócitos em DMEM HAM F12 e 5×10^{-4} M de HCl.
- Astrócitos expostos a 20 μ M de catecol em meio DMEM HAM F12.
- Astrócitos cultivados em MCCEC a 50 % (v/v) e 20 μ M de catecol.
- Astrócitos cultivados em MCCEC a 100 % e 20 μ M de catecol.

As células foram incubadas por 72 h, em estufa com atmosfera úmida com 5 % de CO₂, a 37 °C. Após exposição, as placas foram colocadas sobre gelo e lavadas com PBS gelado. Em seguida as células foram lisadas em 1 mL de tampão de extração de proteínas (0 a 5 °C) contendo 4 M de ureia, 2 mM de EGTA, 62,5 mM de Tris/HCl, pH 6,8, 2 % (p/v) de SDS, 0,5 % (v/v) de Triton X-100 e 1 % de ipase. Todo o conteúdo foi transferido para microtubos mantidos a 4 °C sob agitação por 30 minutos. O conteúdo proteico foi quantificado pelo método de Lowry (item **3.10**). As amostras foram estocadas a -80 °C até o momento da separação eletroforética. Antes da corrida eletroforética as amostras foram desnaturadas em tampão de Laemmli, separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida a 12 % com SDS a 10 % e transferidas eletricamente para membranas de fluoreto de polivinilideno. A isoforma da UGT1A6 foi identificada por anticorpo IgG monoclonal de

coelho (Abcam, ab157476). Foram depositados 5 µg de proteína em cada poço do gel. A β-actina foi empregada como controle de deposição. Anticorpo secundário associado à peroxidase foi usado para revelar a membrana e identificar as bandas das proteínas desejadas. A expressão da UGT1A6 nas amostras foi quantificada por densitometria, utilizando o *software FUJI*, normalizando-se os resultados para a densitometria da expressão de β-actina em cada amostra.

3.17 AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE DO CATECOL POR ENSAIO DE COMETA

Para avaliar a genotoxicidade do catecol sobre CEC e a resposta destas células mediante exposição das culturas a MCAst, grupos distintos foram formados:

- CEC em DMEM HAM F12
- CEC expostas em DMEM HAM F12 a 5×10^{-4} M de HCl;
- CEC expostas a 3000 µM de catecol em meio DMEM HAM F12
- CEC expostas a 3000 µM de catecol em MCAst a 50 % (v/v).
- CEC expostas a 3000 µM de catecol em MCAst a 100 %.

As células foram incubadas por 72 h, em estufa com atmosfera úmida com 5 % de CO₂ a 37°C. Usou-se como grupo controle positivo para lesões físicas, uma placa contendo CEC, cultivadas em DMEM HAM F12 nas mesmas condições de cultivo dos demais grupos, exposta à luz UV por uma hora; como grupo controle positivo para lesões químicas usou-se uma placa contendo CEC cultivadas em DMEM HAM F12 nas mesmas condições ambientais dos demais grupos, exposta a 50 µM de peróxido de hidrogênio por uma hora.

Para avaliar a genotoxicidade do catecol sobre astrócitos e a resposta destas células em presença de MCCEC, grupos distintos foram formados:

- Astrócitos em DMEM HAM F12
- Astrócitos em DMEM HAM F12 e 5×10^{-4} M de HCl
- Astrócitos expostos a 40 µM de catecol em meio DMEM HAM F12
- Astrócitos expostos a 40 µM de catecol em MCCEC a 50% (v/v)
- Astrócitos expostos a 40 µM de catecol em MCCEC a 100%.

As células foram incubadas por 72 h, em estufa com atmosfera úmida com 5% de CO₂, a 37°C. Usou-se como grupo controle positivo para lesões físicas uma placa contendo astrócitos cultivados em DMEM HAM F12, nas mesmas condições ambientais dos demais

grupos, exposta à luz UV por uma hora; usou-se como grupo controle positivo para lesões químicas uma placa contendo astrócitos cultivados em DMEM HAM F12, nas mesmas condições ambientais dos demais grupos, exposta a 50 µM de peróxido de hidrogênio por uma hora.

Após 72 h de exposição, as células (CEC ou astrócitos) foram removidas das placas, centrifugadas a 532 g por 5 minutos, o sobrenadante foi removido e ao sedimentado foi adicionado 50 µL de PBS. Para verificar a fragmentação do DNA, as lâminas foram previamente preparadas com 1,5 % de agarose, em temperatura ambiente e mantidas por uma noite em temperatura de 4 a 8°C. As células em suspensão em 20 µL de agarose de baixo ponto de fusão a 0,5 % em PBS a 37°C foram transferidas para as lâminas contendo 1,5 % de gel de agarose, seguindo da formação do gel em temperatura ambiente por 10 minutos. Em seguida, as lâminas foram imersas em solução de lise (NaCl a 2,4 M, EDTA a 91 mM, Tris a 10 mM, pH 10, 1 % de *N*-lauroil-sarcosina, 1 % de Triton X-100), e incubadas a 4 °C, protegidas da luz, por 2 horas para citólise. As lâminas com as células lisadas, após remoção do excesso de sal, foram submersas em solução de eletroforese (10 mM de NaOH e 0,2 M de EDTA) a 5°C, por 20 minutos para desenrolar o DNA. A execução da eletroforese aconteceu por 20 minutos a 25 V constante. Após corrida eletroforética, as lâminas foram removidas da cuba e lavadas com tampão Tris a 0,4 M, pH 7,5, por 5 minutos (3 vezes), para neutralização. Os fragmentos de DNA deslocados foram então fixados por etanol absoluto. Foi realizada a coloração com 40 µL de gel *red* e analisada em seguida por microscópio de fluorescência, filtro verde (Olympus BX 51 - URA2, San Jose, U.S.A.). Foi realizado o registro de imagens e posterior quantificação densitométrica da fragmentação do DNA na cauda dos cometas.

Para determinar a classificação do padrão de fragmentação do DNA, com células foram analisadas por grupo experimental, baseando-se em método de análise previamente publicado (Silva et al., 2000). As porcentagens de lesões de DNA, classificadas conforme o grau de lesão (**Fig. 2**), foi computada pela ocorrência em cada classe, no total de núcleos analisados:

$$\% \text{ de classe de dano} = n \text{ (da classe de lesão do DNA)} \times 100/n^{\circ} \text{ total de núcleos}$$

A frequência dos danos foi determinada pela porcentagem de todos os núcleos danificados pelo total de núcleos contados.

$$\text{Frequência de danos} = (n \text{ total de núcleos} - n \text{ da classe } 0) \times 100/n^{\circ} \text{ total de núcleos}$$

Para quantificar a migração dos fragmentos de DNA dos astrócitos, foi determinada a porcentagem da cauda em relação ao tamanho do cometa, em medidas densitométrica nas imagens, utilizando o *software Image J*, seguindo o padrão de medidas apresentado na (Fig. 3).

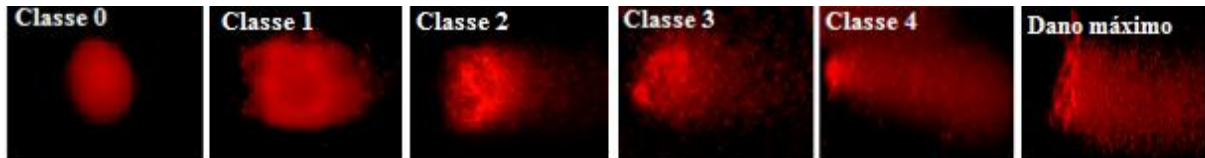


Figura 2. Caracterização do grau de lesão dos Cometas.

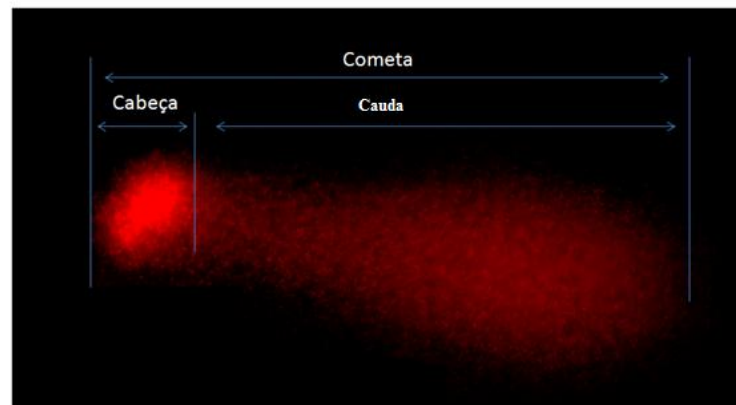


Figura 3. Padrão de medidas do cometa. Imagem obtida por microscópio de fluorescência do cometa formado pelos núcleos, de astrócitos, marcados com Gel *red*.

3.18 DETERMINAÇÃO DO PARÂMETRO BIOELÉTRICO E PERMEABILIDADE DE MEMBRANA

Para a realização do teste, as CEC de ratos foram cultivadas sobre filme de colágeno em inserto com diâmetro de 6,5 mm e membrana com área de superfície de 0,3 cm², com poro de 0,4 µm. A cada 48 h foram realizadas medidas da resistência elétrica transendotelial, utilizando um voltímetro (modelo Millicell® ERS-2, EMD Millipore Corporation Billerica, U.S.A). Antes das leituras as placas com as células foram mantidas em temperatura ambiente por 20 minutos para equilibrar a temperatura. Os microeletrodos acoplados ao voltímetro foram inseridos em dois pontos distintos do poço (apical e basolateral) do cultivo contendo a monocamada de CEC. As medidas de TEER também foram feitas nos insertos contendo apenas filme de colágeno.

As medidas foram feitas pela seguinte equação:

$$\Omega/\text{cm}^2 = \text{TEER na monocamada de CEC} - \text{TEER do filtro}$$

A integridade da membrana é conferida pelo aumento acentuado de TEER, considerando o fechamento da monocamada endotelial quando maior que $50 \Omega/\text{cm}^2$ (Helms et al., 2016).

3.19 AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO PARÁCRINA DE ASTRÓCITOS SOBRE A MONOCAMADA ENDOTELIAL

Para verificar a influência do meio condicionado dos astrócitos sobre o fechamento da monocamada endotelial, as CEC em DMEM HAM F12/EGM foram semeadas na densidade de $3,1 \times 10^4$ células/ cm^2 sobre membrana do inserto de superfície de $0,3 \text{ cm}^2$, poro de $0,4 \mu\text{m}$, com filme de colágeno de $20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, em placa de 24 poços. Incubou-se as células em atmosfera úmida, com 5% de CO_2 , a 37°C . No dia seguinte, o meio foi removido, as células foram lavadas com PBS (duas vezes) e na sequência foram adicionados os meios conforme esquema experimental abaixo:

- CEC em DMEM HAM F12/EGM 50% (v/v)
- CEC em MCAst a 50% (v/v) em DMEM HAM F12
- CEC em MCAst a 100%

Usou-se como controles para cada grupo insertos sem células com filme de colágeno em cada um dos seus respectivos meios. As trocas de meio de cultivo foram realizadas a cada 48 horas. Antes das trocas de meio, as medidas da resistência elétrica transendotelial foram realizadas, conforme descrito no item **3.18** até o fechamento da monocamada endotelial. As medidas de TEER também foram feitas nos insertos contendo apenas filme de colágeno.

3.20 AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO DE CITOCINAS E NEUROTROFINAS POR ASTRÓCITOS E CEC

Para investigar a influência de citocinas e neurotrofinas liberadas por astrócitos sobre as CEC, astrócitos foram infectados por *Nc* (Pinheiro et al., 2006a). Taquizoítas de *Nc*-Bahia/astrócitos na proporção de 1:1 (parasito/células hospedeira) foram mantidos em cultivo

por 72 h. Astrócitos não infectados foram utilizados como controle. Após 72 h, o meio de cultivo foi removido e sobre as células foi adicionado 1 mL de Trizol[®] (CHOMCZYNSKI; SACCHI, 1987), para dissociação do complexo nucleoproteína para análise de expressão dos genes de citocinas e fatores neurotróficos por qRT-PCR.

Em outra placa do mesmo experimento, após 72 h de infecção, o meio de cultivo dos astrócitos infectados foi substituído por novo meio de cultivo onde foi mantido por 24 h. O meio de cultivo condicionado por estes astrócitos infectados (MCAst-*Nc*) foi submetido a filtração através de uma membrana com 0,22 µm de poro. O MCAst-*Nc* foi adicionado sobre a cultura das CEC, confluentes, cultivadas em placa de cultura de 6 cm². Para o grupo controle, foram utilizadas as CEC na presença de meio condicionado por astrócitos não infectados. As células foram mantidas em cultivo, sem troca de meio, por 72 h. Após este período, o meio de cultura foi descartado e sobre as células foi adicionado 1 mL de Trizol[®] para dissociação do complexo nucleoproteína e análise por qRT-PCR (item 3.21.).

3.21 ANÁLISE DA REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE EM TEMPO REAL (QRT-PCR)

Para obtenção do conteúdo orgânico (CHOMCZYNSKI; SACCHI, 1987), foi adicionado 0,2 mL de clorofórmio para cada 1 mL de Trizol[®] contendo a amostra, seguido de agitação vigorosa do tubo por 15 minutos para promover extração da fase orgânica. O conteúdo celular bifásico foi então centrifugado a 12000 g por 15 minutos, a 4 °C. A fase aquosa da amostra, contendo o RNA foi transferida para um novo tubo livre de RNase e em seguida foi realizado o procedimento de isolamento do RNA.

Para precipitação do RNA foi adicionado 0,5 mL de isopropanol à fase aquosa, em seguida, foi feita a incubação à temperatura ambiente durante 10 minutos. Na sequência, centrifugou-se a 12.000 g durante 10 minutos, a 4 °C. O sedimentado em forma de gel foi lavado com 1 mL de etanol a 75% (v/v). A amostra foi centrifugada a 7.500 g durante 5 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o tubo ficou aberto no fluxo laminar por 5-10 minutos para secar parcialmente o RNA.

O conteúdo de RNA (transparente) foi ressuscitado em água livre de RNase (21,5 µL de água) e após ser misturado, foi mantido incubado em placa de aquecimento para tubos a 57 °C durante 15 minutos. Para retirada de DNA contaminante, foram adicionados 2,5 µL do tampão do kit removedor de DNA (tratamento com DNase, Ambion[®], Ambion DNA-free kit,

cat # AM1906, Life Technologies™). Após misturar os reagentes, incubou-se por 30 minutos a 37 °C no termociclador. Em seguida, foram adicionados 2,5 µL de solução de inativação, sendo incubado por mais 2 minutos à temperatura ambiente e em seguida centrifugou-se a 10.000 g, por 2 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para um tubo novo. A pureza das amostras foi considerada satisfatória quando apresentaram uma razão da absorbância 260 nm/280 nm = variação 1,9-2,1 (nanospectrofotometer Kasvi-K23-0 002).

Para realizar a síntese de DNA foi usado o Kit Super Script® VILO™ Master Mix (número de catálogo 11755050, invitrogen™ Life technologies) conforme protocolo do fabricante. A síntese de cDNA foi realizada em um volume final de 20 µL contendo 2,5 µg de RNA total. Os *primers* para PCR de fator de crescimento do nervo, (NGF, do inglês, *nerve growth factor*), fator neurotrófico derivado da glia (GDNF, do inglês, *glia derived neurotrophic factor*), fator neurotrófico derivado cérebro (BDNF, do inglês, *brain derived neurotrophic factor*), Interleucina 1 (IL-1), Interleucina 10 (IL-10), interleucina 1 beta (IL-1β) e controles endógenos, hipoxantina fosforribosil transferase (HPRT) e β-actina foram obtidos da Thermo Fisher Scientific (**Tabela 2**).

Tabelas 2: Genes alvos utilizados nas análises de qRT-PCR.

Gene Alvo	Amplicon	ID Banco de Genes*	Código do Produto
β-Actina	91	FQ226945.1	Rn00667869
HPRT	64	NM_012583.2	Rn01527840
NGF	114	FQ232560.1	Rn01533872
BDNF	142	AY559248.1	Rn02531967
GDNF	122	NC_005101.4	Rn01765001
IL-1β	74	BC091141.1	Rn00580432
IL-10	70	L02926.1	Rn00563409
TNF	92	AF269159.1	Rn01525859

*Banco de genes (GenBank) - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Para detecção e quantificação da expressão gênica, a amostra e mistura dos reagentes foi preparada conforme a instrução do fabricante:

5 µL mistura do Kit (TaqMan® Universal Master Mix II)

0,5 µL da sonda do gene de interesse

2 µL de cDNA/DNA

2.5 µL de H₂O livre de RNase

Após homogeneização, os reagentes foram adicionados ao poço. Para cada gene alvo foi realizado um branco com os reagentes do kit (TaqMan® Universal Master Mix II + TaqMan® Assay + H₂O livre de RNase) mas sem o cDNA nesses poços foram adicionados 2 µL de H₂O. O termociclador foi previamente programado com as seguintes etapas:

- a) 2 °C por 2 minutos;
- b) 95 °C por 10 minutos;
- c) 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto.

A quantificação gênica foi feita por espectrofluorimetria, utilizando o fluoróforo 6-carboxifluoresceína (FAM) (λ_{em} . 517nm) para as amostras e o controle HPRT. O fluoróforo 4,7,2'-triclora-7'-fenil-6-carboxifluoresceína (VIC) (λ_{em} . 551nm) foi usado para o controle β -actina.

A análise dos dados da reação em cadeia da polimerase em tempo real baseou-se em descrição previamente publicada (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008). O teste foi realizado em triplicata.

3.22 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Os dados obtidos em cada experimento foram submetidos às análises estatísticas, sendo expressos como média e erro médio padrão, ou mediana e variação. A escolha da medida de tendência central e das medidas de dispersão foi feita de acordo com a distribuição dos dados em um histograma de frequência. A distribuição dos dados definiu a escolha de tendência central e medidas de dispersão, sendo considerada normal quando aprovados no teste (teste de D'Agostino e Pearson) e com parâmetros de assimetria (*Skewness*) com intervalo entre -1 e +1 e curtose no intervalo entre -1,5 e + 1,5, dados não atendendo a estas condições foram considerados como distribuição não normal.

Para comparação entre dois grupos com distribuição normal foi utilizado o teste *t de Student* não pareado e o teste de Mann-Whitney foi usado para amostras com distribuição não normal. Em dados paramétricos, o teste mais usado para analisar as comparações múltiplas com apenas um parâmetro variável foi o *One-Way ANOVA*, seguido do teste de *Dunnnett*. Nos resultados com dados não paramétricos foi utilizado o teste de *Kruskal-Wallis* (seguido do teste de *Dunn's*) para comparações múltiplas. O intervalo de confiança do teste foi definido por 95% de significância estatística $p < 0,05$.

Para definir a EC₅₀ do catecol, foram realizados cálculos de regressão não linear, utilizando a equação fornecida pela biblioteca do *software GraphPad Prism*, considerando o coeficiente de determinação $R^2 > 0,8$. O intervalo de confiança do teste foi definido por 95% de significância estatística $p < 0,05$. As análises foram realizadas em *software GraphPad Prism*, versão 5.0 para *Windows*, *GraphPad Software*, San Diego California, EUA.

4 RESULTADOS

4.1 INTERAÇÃO PARÁCRINA ENTRE AS CÉLULAS (CEC E ASTÓCITOS, CEC E GLIOMA, CEC E MICROGLIA), EM CULTURA PRIMÁRIA

As células endoteliais cerebrais após o isolamento, em cultivo na presença do meio DMEM HAM F12, não modificaram a morfologia, mantendo o padrão morfológico esférico, com celularidade baixa (**Fig. 4A e E**), mantendo o padrão quiescente em cultura, por muito tempo.

4.1.1 Efeito do meio condicionado dos astrócitos sobre células endoteliais quiescentes

Para estimular a diferenciação celular, após 20 dias de cultivo, o meio de cultura DMEM HAM F12 foi substituído por MCAst a 50% (v/v) e a 100%. No sétimo dia de modulação por MCAst a 50% (v/v), observou-se a presença de células livres, raras, com aumento do volume celular (setas brancas) (**Fig. 4B**). A modificação morfológica das CEC ficou evidenciada a partir do décimo quarto dia de cultivo, na presença do meio condicionado por astrócitos na proporção de 50%, quando foram observadas células fusiformes alongadas (setas pretas), de diferentes tamanhos e celularidade aumentada (**Fig. 4C**). No décimo quinto dia, foi observado que as CEC na presença de MCAst 50% (v/v) apresentavam-se morfológicamente modificadas e semi confluentes, com forma alongada e afinada (**Fig. 4D**).

Nas CEC em MCAst 100%, no sétimo dia de modulação observou-se a presença de raras células com aumento do volume e com proliferação celular acentuada com predomínio de microcitose (**Fig. 5F**). No décimo quarto dia de modulação com MCAst 100%, observou-se células em variadas formas e tamanhos, algumas em alteração morfológica alongadas (**Fig. 5G**). No décimo quinto dia, as células endoteliais apresentavam-se morfológicamente modificadas, fusiformes, normocíticas (**Fig. 5H**).

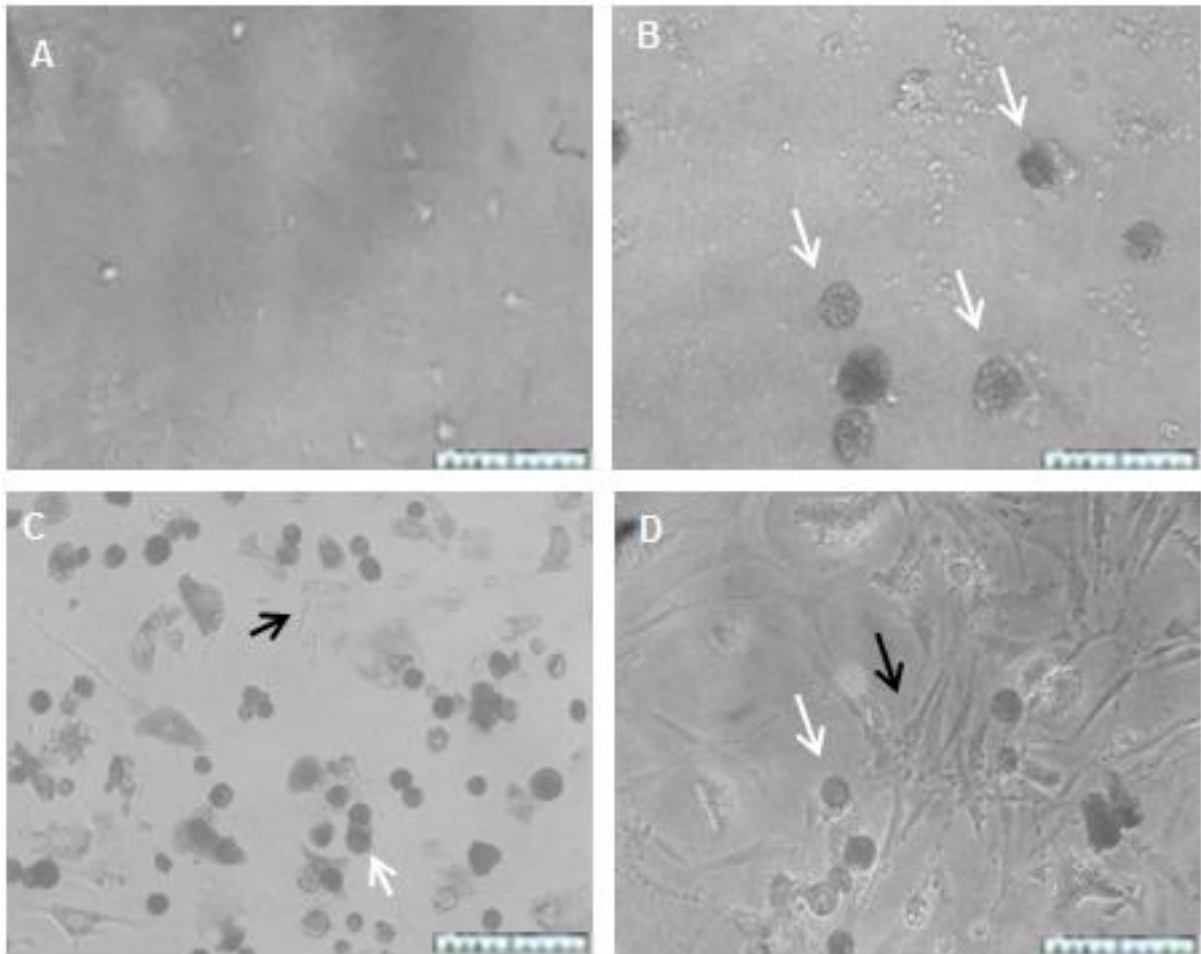


Figura 4. Alteração morfológica e proliferação de CEC induzidas por meio condicionado por astrócitos. **A** - células quiescentes, no vigésimo dia de cultivo em meio DMEM HAM F12. **B** - CEC no sétimo dia após modulação com MCAst 50% (v/v); **C** - CEC no décimo quarto dia após modulação com MCAst 50% (v/v); **D** - CEC no décimo quinto dia após modulação com MCAst 50% (v/v). Setas brancas mostram células livres, com volume celular aumentado. Setas pretas apontam células já com padrão morfológico de células endoteliais em cultura. Microscópio de contraste de fase, Barra equivalente a 100 μ m.

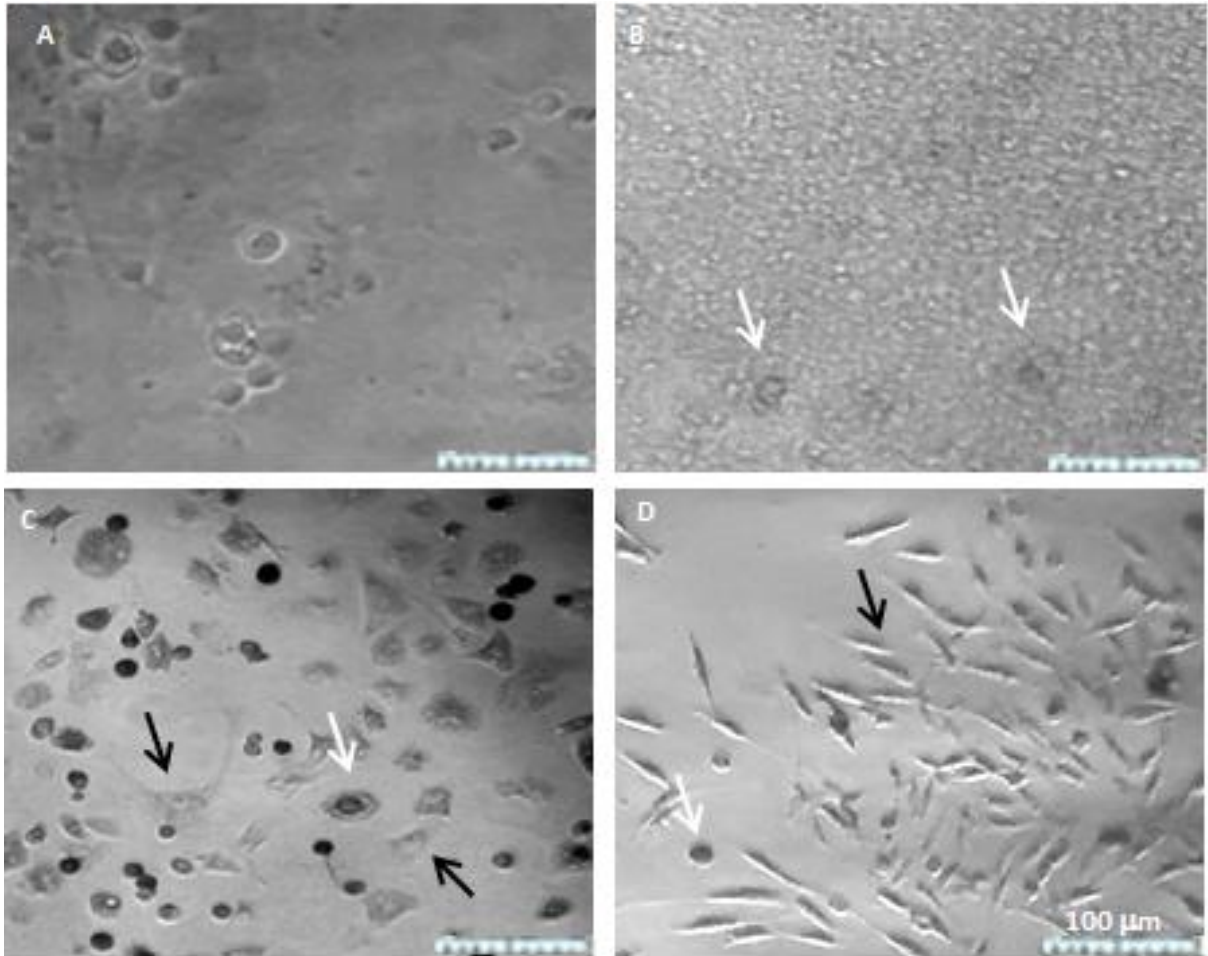


Figura 5. Alteração morfológica e proliferação de CEC induzidas por meio condicionado por astrócitos. **A** - Células quiescentes, no vigésimo dia de cultivo em meio DMEM HAM F12. **B** - CEC no sétimo dia após modulação com MCAst100%; **C** - CEC no décimo quarto dia após modulação com MCAst 100%; **D** - CEC no décimo quinto dia após modulação com MCAst 100%. Setas brancas mostram células livres, com volume celular aumentado. Setas pretas apontam células diferenciadas. Microscópio de contraste de fase, Barra equivalente a 100 µm.

4.1.2 Interação entre CEC e Glioma murino

As CEC após o isolamento, ficaram quiescentes em cultivo por 20 dias, quando foram submetidas ao estímulo com o meio condicionado de glioma murino. As imagens (**Fig. 6A e E**) representam as culturas em DMEM HAM F12, no 20º dia de cultivo, antes de iniciar a modulação, onde observa-se células arredondadas, raras e livres. O meio de cultivo DMEM HAM F12 foi substituído por meio condicionado por MCC6 50% (v/v) e após o oitavo dia foi observada a presença de células livres de volume aumentado (**Fig. 6B**). No décimo quarto dia de condicionamento de CEC com MCC6 50% (v/v) observou-se mudança morfológica e monocamada em semi confluência (**Fig. 6C**). No décimo quinto dia de modulação com MCC6 50% (v/v), foi observada a presença das CEC morfológicamente modificadas e a

monocamada confluenta (**Fig. 6D**). Na cultura de células quiescentes onde o meio DMEM HAM F12 foi substituído por MCC6 100%, após 8 dias de modulação observou-se um aumento da densidade celular com presença de células raras e de volume aumentado (**Fig. 6E**). No décimo quinto dia foi possível observar CEC fusiformes e em proliferação (**Fig. 6G**). No vigésimo primeiro dia após modulação com MCC6 100% a monocamada de células fusiformes atinge confluência (**Fig. 6H**). Os meios condicionados induziram estímulo de modificações morfológicas nas CEC em diferentes tempos de cultivo. O MCC6 a 50% (v/v) promoveu mudanças morfológicas em menor tempo quando comparado com a resposta das células em MCC6 100%.

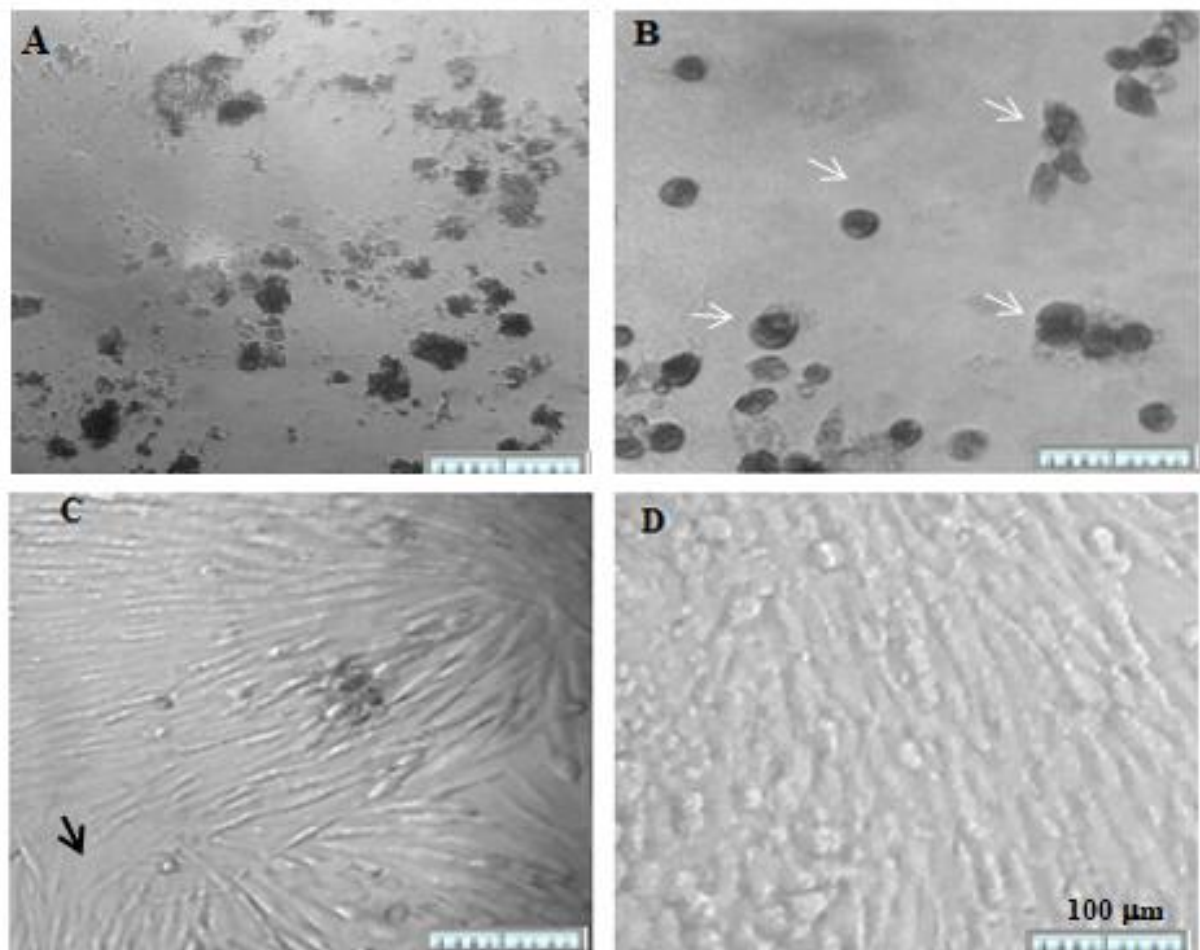


Figura 6. Alteração morfológica e proliferação de CEC induzidas pelo meio condicionado por glioma murino (MCC6). **A** - CEC quiescentes, após 20 dias de cultivo em DMEM HAM F12. **B** - CEC no oitavo dia após modulação com MCC6 a 50% (v/v); **C** - CEC no décimo quarto dia após modulação com MCC6 a 50% (v/v); **D** - CEC no décimo quinto dia após modulação com MCC6 a 50% (v/v). Setas brancas mostram células livres, com volume celular aumentado. Setas pretas apontam células diferenciadas. Microscopia de contraste de fase. Barra equivalente a 100 µm.

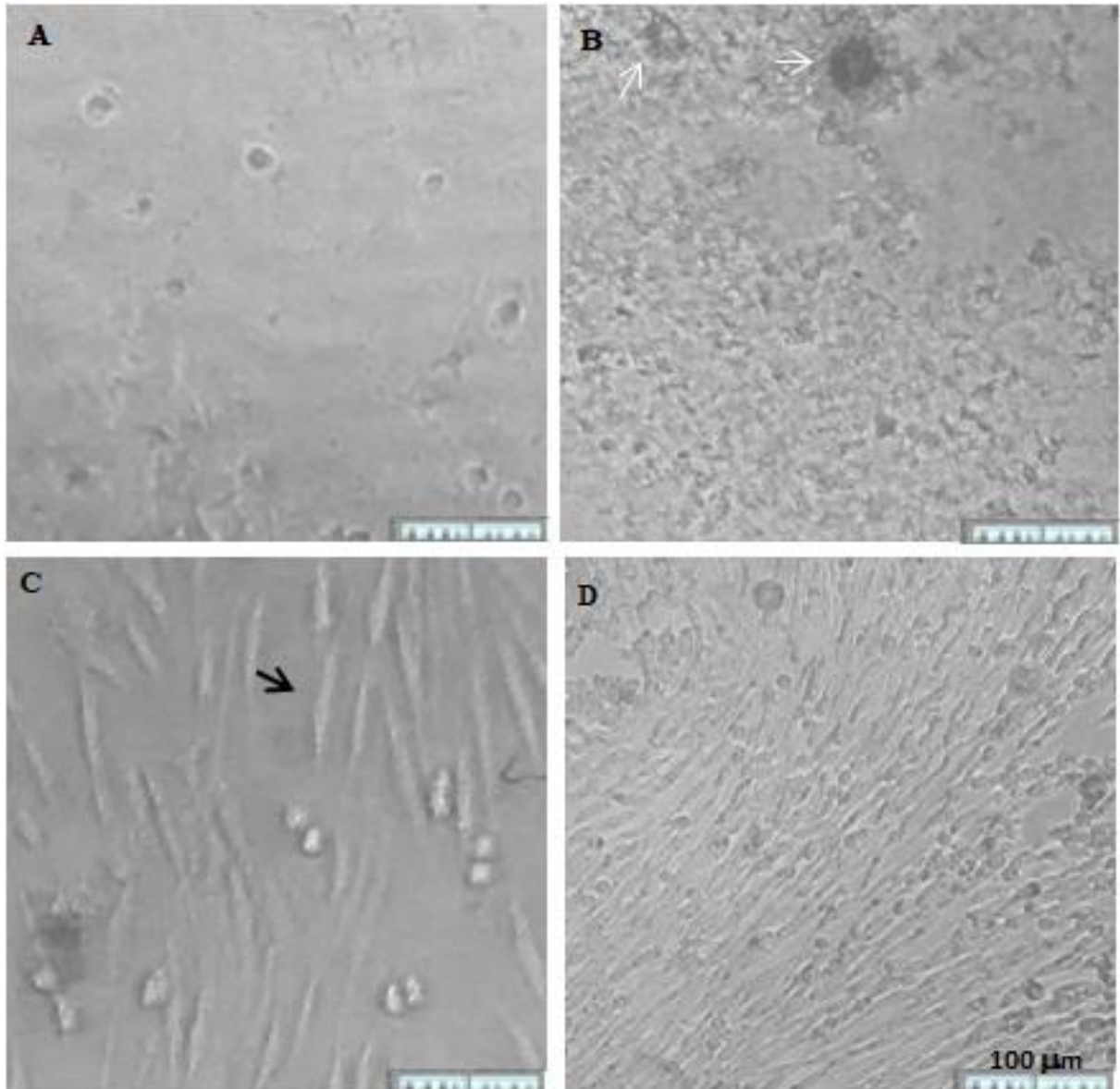


Figura 7. Alteração morfológica e proliferação de CEC induzidas pelo meio condicionado por glioma murino (MCC6). **A** - CEC quiescentes, após 20 dias de cultivo em DMEM HAM F12. **B** - CEC no oitavo dia após modulação com MCC6 a 100%; **C** - CEC no décimo quarto dia após modulação com MCC6 a 100%; **D** - CEC no décimo quinto dia após modulação com MCC6 a 100%. Setas brancas mostram células livres, com volume celular aumentado. Setas pretas apontam células diferenciadas. Microscopia de contraste de fase. Barra equivalente a 100 µm.

As células diferenciadas por indução do MCC6 e MCCAst foram positivas para imunomarcacão de Fator VIII de vonWillebrand, o que mostra que a interaçãõ entre as células resultou na diferenciaçãõ das CEC mantendo o fenótipo de células endoteliais.

Na presença do MCCAst (**Fig. 8C, D**) e MCC6 (**Fig. 8E e F**) houve maior marcaçãõ fluorescente para fator VIII, quando comparadas com as células quiescentes (**Fig. 8A**). As CEC moduladas com MCAst a 100% apresentaram fluorescência mais forte para a marcaçãõ do fator VIII (**Fig. 8D**). Adicionalmente, observa-se alteraçãõ morfológica nas CEC por

indução do MCCAst, apresentando a formação de monocamada mais homogênea, enquanto CEC expostas a MCC6 apresentam uma morfologia alongada e monocamada heterogênea (Fig. 8E e F).

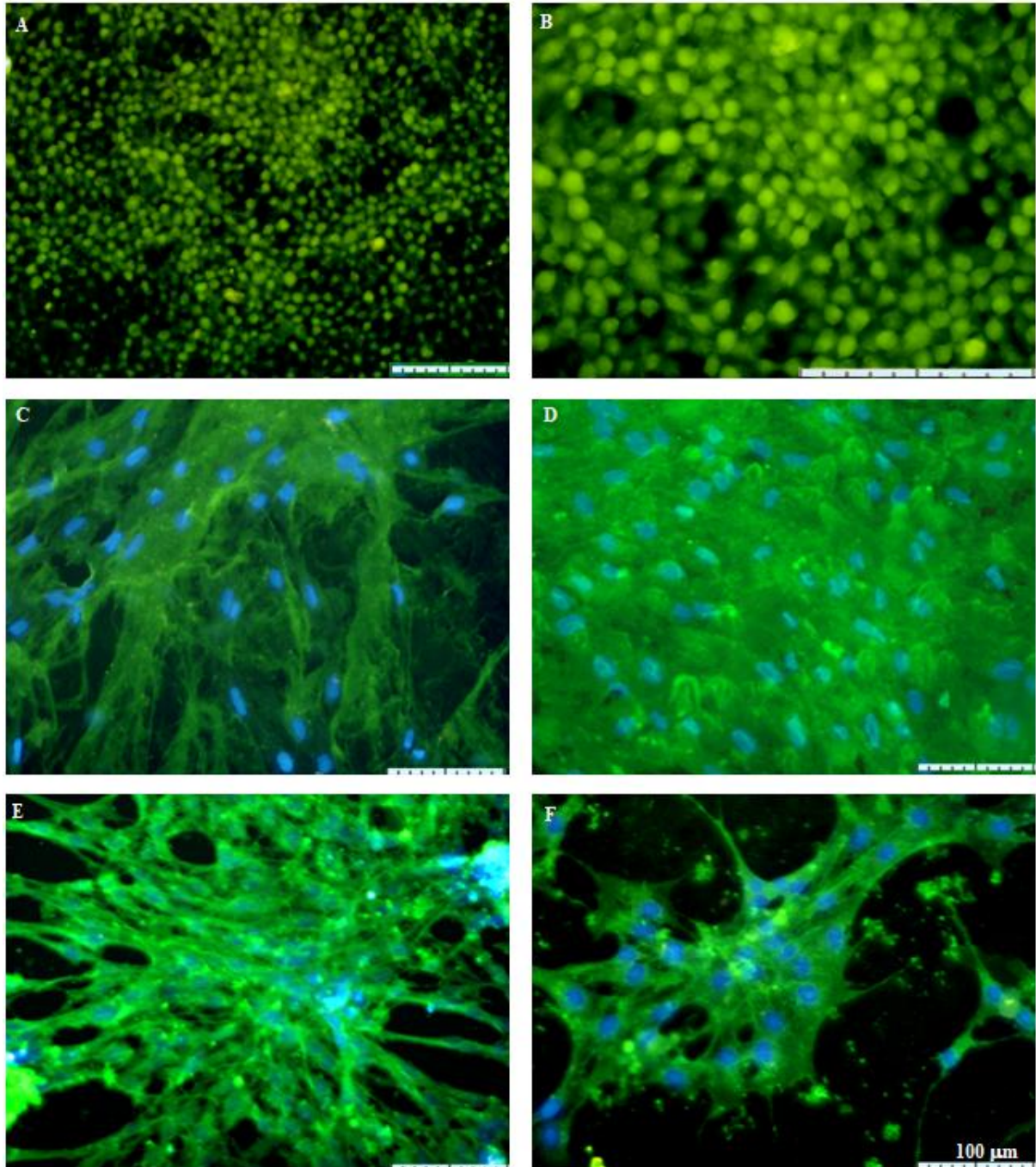


Figura 8. Alteração morfológica de CEC por estímulo dos meios condicionados por astrócitos e glioma. **A e B** - CEC em meio de cultivo DMEM HAM F12 nos aumentos de 20 e 40x; **C** - CEC em MCAst a 50% (v/v); **D** - CEC em MCAst a 100%; **E** - CEC em MCC6 a 50% (v/v); **F** - CEC em MCC6 a 100%. Imunomarcagem para Fator VIII de vonWillebrand (verde), marcação de núcleos com DAPI (azul). Barra equivalente a 100 μ m.

4.1.3 Interação entre CEC e microglia

A microglia é uma célula glial comumente encontrada em pequena quantidade nas culturas de astrócitos, o que a torna objeto de investigação na diferenciação das CEC. Para isso, as CEC quiescentes, no 20º dia de cultivo em meio DMEM HAM F12) foram moduladas com MCMG 50% (v/v). Observa-se na imagem antes da modulação, a presença de células quiescentes de perfil arredondado e quantidade reduzida (**Fig. 9A**). Após o terceiro dia de modulação ao MCMG 50% (v/v) observa-se aumento na densidade celular (**Fig. 9B**). No 19º dia de cultivo em MCMG 50% (v/v) foi possível observar uma camada semi confluenta de CEC diferenciadas, fenótipo celular fusiforme e pontas alongadas, distribuição celular uniforme com pouquíssimas células esféricas (**Fig. 9C**).

O aspecto morfológico de diferenciação e arranjo celular em cada cultivo mostrou ser diferente mediante os meios condicionados por astrócitos e glioma. No entanto, o objeto de estudo deste trabalho foi verificar a existência da interação entre os dois principais tipos celulares que compõem a BHE. A diferenciação das CEC por indução do MCAst e MCC6 é um indicativo da interação parácrina entre estas células. Diante destes dados, foi utilizado o meio de cultivo preconizado para culturas de células endoteliais, o meio EGM suplementado por EBM-2 (Watson et al 2013), com alteração na concentração final dos componentes por adição do meio DMEM HAM F12 na proporção de 50% (v/v).

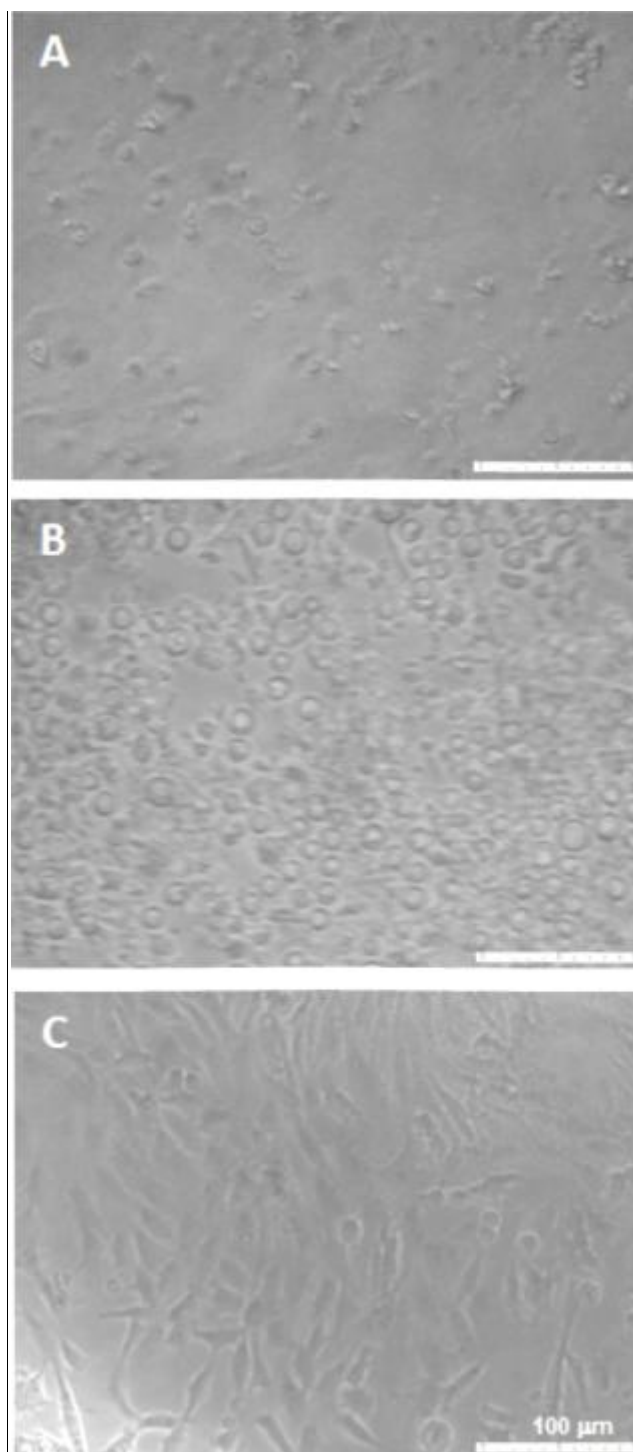


Figura 9. Alteração morfológica de CEC induzida pelo meio condicionado por microglia. **A** - CEC em DMEM HAM F12 no 20º dia de cultivo após isolamento; **B** - CEC após 3º dia em cultivo em MCMG 50% (v/v); **C** - CEC após 19º dia de cultivo em MCMG a 50% (v/v). Imagens obtidas por microscópio de contraste de fase. Barra equivalente a 100 μm .

4.1.4. Otimização da cultura de CEC

Para avaliar a competência do meio de cultivo EGM-2 na diferenciação das CEC quiescentes no 20º dia de cultivo após isolamento (**Fig. 10A**), o meio DMEM HAM F12 foi substituído por EGM-2 a 50% (v/v) em DMEM HAM F12. No terceiro dia após substituição

do meio, observa-se aumento na densidade celular e prevalência de células arredondadas e de volume aumentado (**Fig. 10B**). No 19º dia de modulação com EGM-2 a 50% em DMEM HAM F12 observa-se células de aspecto fusiforme e pontas alongadas, evidenciando alterações na morfologia celular (**Fig. 10C**).

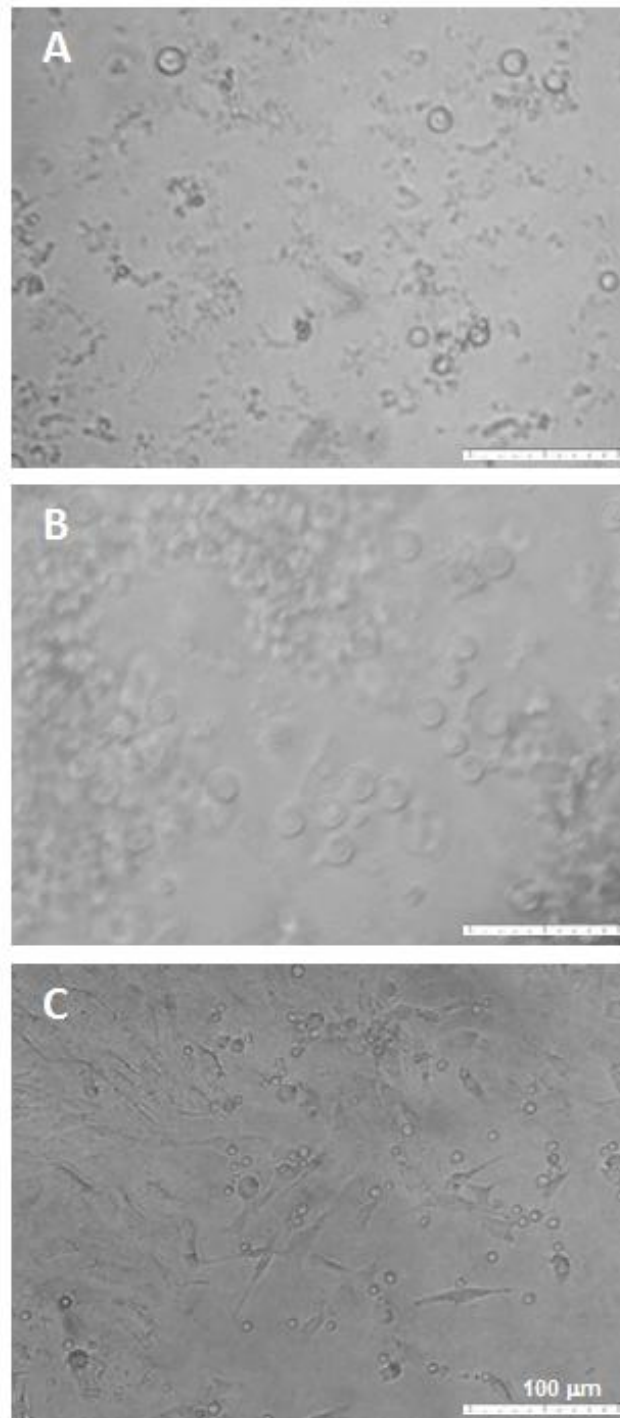


Figura 10. Alteração morfológica de CEC em meio EGM-2 a 50% (v/v) em DMEM HAM F12. **A** - CEC em DMEM HAM F12 no 20º dia de cultivo após isolamento; **B** - CEC após 3º dia de cultivo em meio EGM-2 a 50% (v/v) em DMEM HAM F12; **C** - CEC após 19º dia de cultivo meio EGM-2 a 50% (v/v) em DMEM HAM F12. Imagens obtidas por microscópio de contraste de fase. Barra equivalente a 100 µm.

As CEC cultivadas meio EGM a 50% (v/v) em DMEM HAM F12 foram positivas para imunomarcação de Fator VIII de von Willebrand (fluorescência verde) com dupla marcação para GFAP e não se observou a presença de astrócitos (**Fig. 11**).

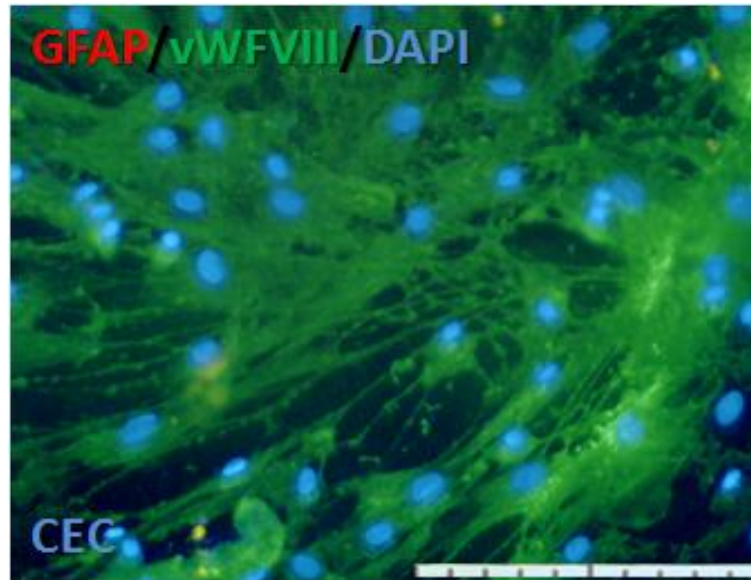


Figura 11. Cultura primária de CEC positivas para fator VIII. Imunomarcação para GFAP (vermelho), fator VIII (verde) e marcação de núcleos com DAPI. Imagem obtida em microscópio de fluorescência. Barra equivalente a 100 μm .

Na etapa seguinte, foi analisado o efeito do meio de cultivo EGM a 50% (v/v) em DMEM HAM F12 sobre as CEC, com modulação iniciada 24 h após o isolamento. No terceiro dia de cultivo em meio EGM a 50% (v/v) em DMEM HAM F12, observa-se na imagem obtida por microscopia de contraste de fase, células alongadas e fusiformes entre micro tecidos endoteliais cerebrais (**Fig. 12A**). No 7º dia em cultivo (**Fig. 12B**) observa-se grande quantidade de células com fenótipo fusiforme sobre o filme de colágeno. No 9º dia, visualiza-se uma monocamada celular semi confluenta e a cultura aparentemente mais pura (**Fig. 12C**).

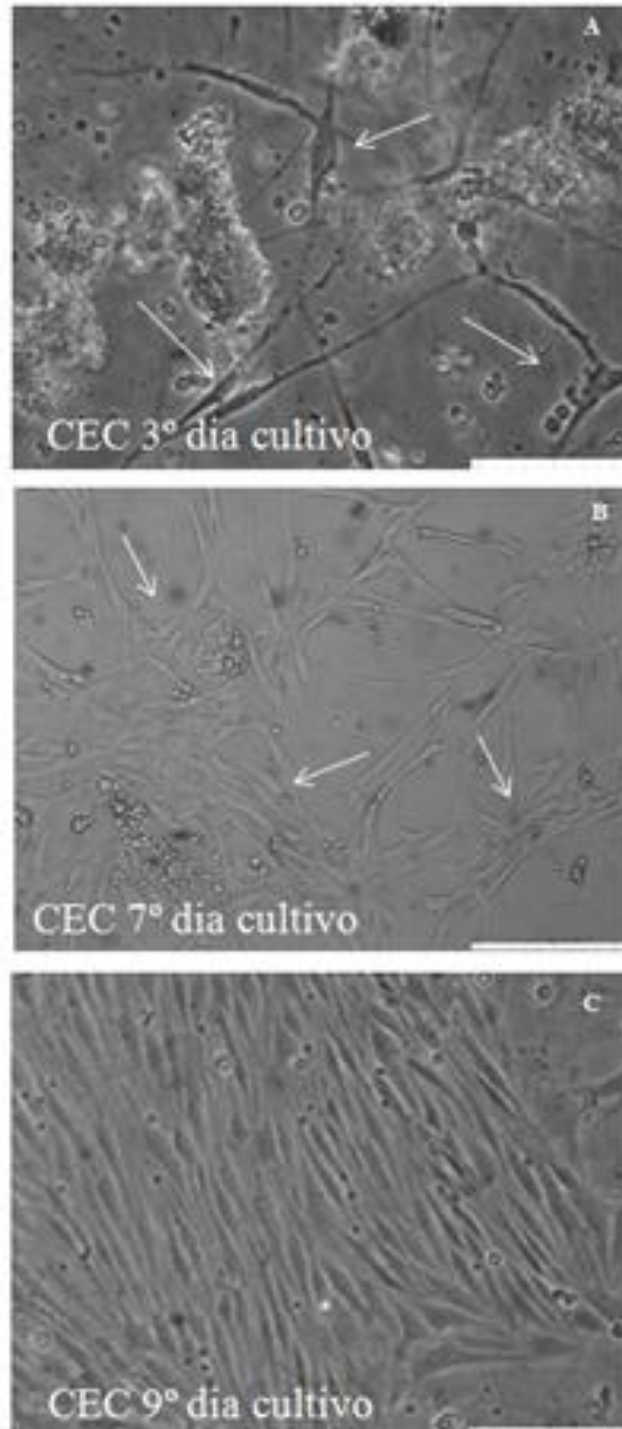


Figura 12. Evolução da cultura primária de CEC em meio EGM a 50% (v/v) em DMEM HAM F12. **A** - CEC no terceiro dia após o isolamento celular; **B** - CEC no 7º dia de cultivo; **C** - CEC no 9º dia de cultivo. Imagens obtidas em microscópio de contraste de fase. Setas brancas (→) apontando células apresentando as alterações morfológicas esperadas em cultura. Barra equivalente a 100 µm.

Foi importante avaliar o perfil de crescimento e morfologia celular das CEC em cultivo no meio EGM a 50% (v/v) em DMEM HAM F12, após remoção enzimática das células aderidas na placa com a tripsina (tripsinização). Observa-se uma monocamada confluenta na cultura de CEC (**Fig. 13A**), antes da tripsinização, para contagem celular. Após

contagem, as células foram distribuídas na densidade de $3,1 \times 10^4$ células/cm². Nas imagens obtidas no terceiro dia após tripsinização, visualiza-se células aderidas sobre o filme de colágeno, formando a monocamada de CEC (**Fig. 13B**) e no quinto dia, a presença da monocamada semi confluenta, de CEC alongadas, com fenótipo fusiforme e com aspecto de cultura pura (**Fig. 13C**).

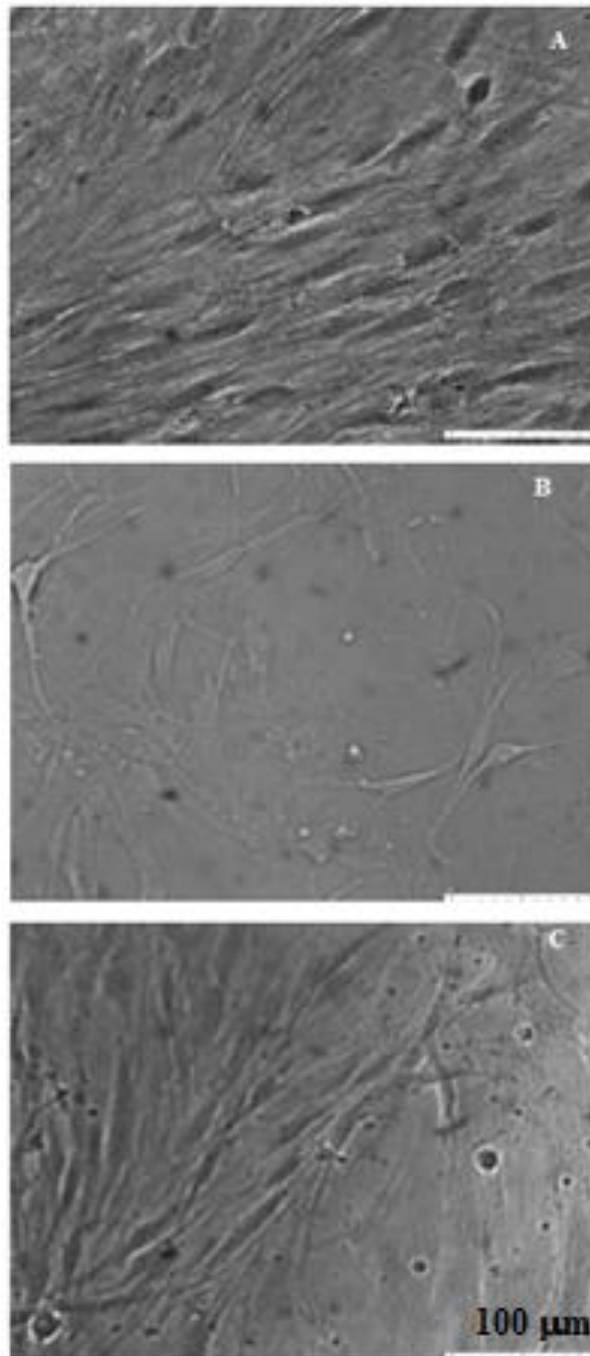


Figura 13. Subcultivo de CEC em meio EGM a 50% (v/v) em DMEM HAM F12. **A** - Cultura primária de CEC antes da tripsinização. **B** - Cultura de CEC no terceiro dia de cultivo após tripsinização; **C** - Cultura de CEC no 5º dia de cultivo após tripsinização. Imagens obtidas em microscópio de contraste de fase Barra equivalente a 100 µm.

4.2 INTERAÇÃO ENTRE ASTRÓCITOS E MICROGLIA

4.2.1 Citotoxicidade induzida pelo catecol em astrócitos isolados por diferentes protocolos de cultivo (P1 e P2)

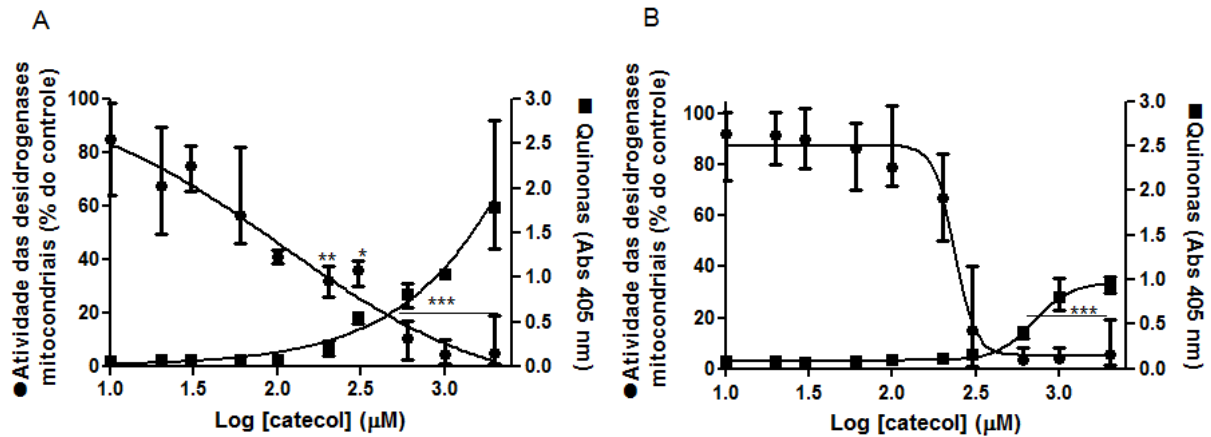
Diante da necessidade de obter reprodutibilidade nos resultados, foi importante definir o perfil morfofuncional dos astrócitos nos diferentes protocolos de cultivo. Para isso, foram testados dois protocolos de cultivo, desenvolvidos no LABNq, para obtenção de cultura pura de astrócitos. No protocolo 1 (P1), a microglia foi removida dos astrócitos a partir de 48 h após o isolamento das células e a cada troca de meio, até atingir confluência (entre 7-10 dias) (ver **item 3.3.2.1**). No protocolo 2 (P2), a mistura glial foi mantida em cultivo até confluência e depois a microglia foi removida (ver **item 3.3.2.2**). Partindo do mesmo isolamento das células (**item 3.3.2**), foram realizados testes interensaios para avaliar as respostas dos astrócitos ao catecol, nas concentrações entre 10 - 2000 μM , para os dois protocolos. O catecol, após 72 h, induziu citotoxicidade em astrócitos isolados de P1, com a mediana da EC_{50} de 82 μM (variação: 11 - 122 μM , $n = 8$) (**Fig. 14A**). O catecol induziu citotoxicidade em astrócitos isolados de P1, no experimento correspondente ao valor próximo da mediana, definido pela equação [1]:

$$V = \{115,56 / [1 + 10^{(0,66 \text{ Log } C - 1,34)}]\} - 12,46 \quad R^2 = 0,906 \quad [1]$$

Onde V corresponde a viabilidade celular normalizada pela condição controle e C, a concentração do catecol.

O catecol, após 72 h, induziu citotoxicidade com mediana da EC_{50} de 229 μM (variação: 143 - 873 μM , $n = 8$) nos astrócitos do protocolo 2 (P2) (**Fig. 14B**). A citotoxicidade induzida pelo catecol em astrócitos isolados de P2, no experimento correspondente ao valor próximo da mediana foi definida pela equação [2]:

$$V = 5,16 + \{82,57 / [1 + 10^{(7,01 \text{ Log } C - 16,63)}]\} \quad R^2 = 0,948 \quad [2]$$



O efeito citotóxico do catecol é associado a formação de quinonas. Foi possível observar menor formação de quinonas em astrócitos do P2 (absorbância na maior dose foi 1,0) quando comparada com a formação de quinonas pelos astrócitos do P1 (absorbância de 2,0, aproximadamente), o que pode estar relacionado com a resistência ao dano pelo catecol apresentada pelos astrócitos do P2. Astrócitos isolados pelo P2 são mais resistentes à citotoxicidade induzida pelo catecol quando comparados com os astrócitos isolados pelo P1 (Fig. 15).

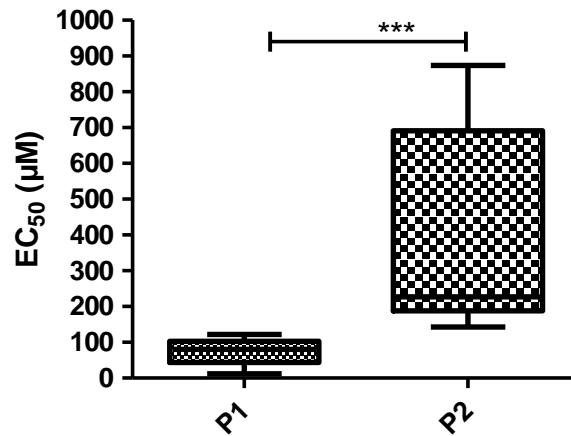


Figura 15. Comparação da resposta dos astrócitos, isolados por protocolos de cultivo P1 e P2, ao catecol. Protocolo de cultivo 1 (P1) – Astrócitos em cultivo com remoção precoce da microglia (cada 48 h). Protocolo de cultivo 2 (P2) – Astrócitos em cultivo com remoção tardia da microglia (após 7 dias de cultivo). As células foram expostas ao catecol entre 10-2000 μM , por 72 h. Os dados representam a mediana da EC_{50} , os percentis 25 e 75 limitando o quadrilátero e a variação representada pelos extremos das barras ($n = 8$). Os grupos foram comparados com Mann-Whitney, teste não paramétrico. Significância estatística: (***) $p < 0,0001$.

Diante da diferença de resposta ao dano, foi importante também avaliar o perfil morfofuncional destas células.

Nas imagens de imunocitoquímica, com marcação para glutamina sintetase (GS; E.C.6. 3.1.2), os astrócitos obtidos pelo P2 apresentaram uma marcação mais forte quando comparados com os obtidos pelo P1 (**Fig. 16**).

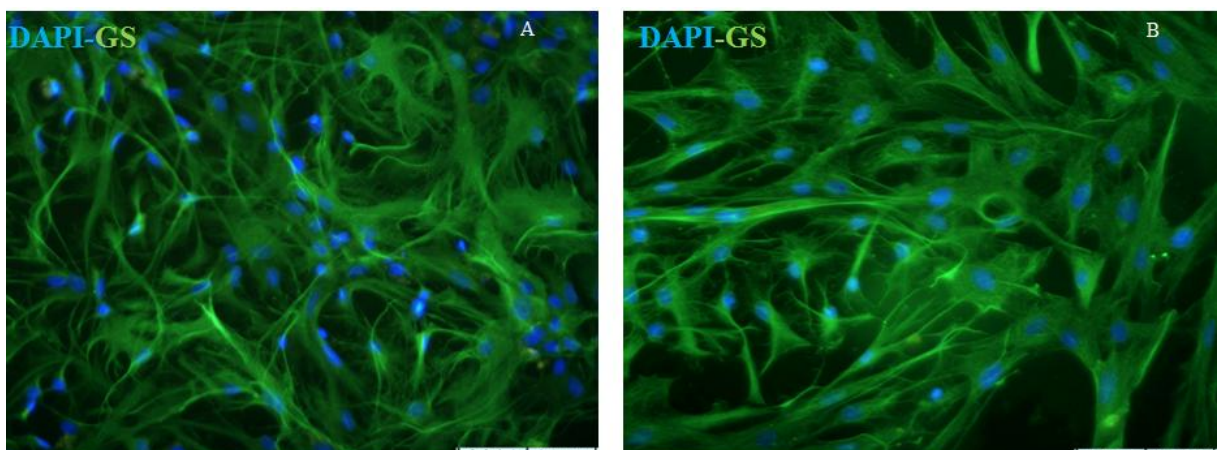


Figura 16. Glutamina Sintetase em astrócitos cultivados em diferentes protocolos. **A** - Protocolo de cultivo 1 (P1) – Expansão de astrócitos em meio DMEM HAM F12, com remoção precoce da microglia (a cada 48 h). **B** - Protocolo de cultivo 2 (P2) – Expansão de astrócitos em meio DMEM HAM F12, com remoção tardia da microglia (após 7 dias de cultivo). Marcação de núcleos com DAPI. Barra equivalente a 100 μm .

Para avaliação da morfologia das culturas primárias de astrócitos, nos protocolos P1 e P2, frente ao dano pelo catecol e na proteção ao dano oxidativo na presença de GSH a 3,5 mM, foram utilizadas as concentrações de 100 μ M e 300 μ M de catecol. Após 72 h de exposição ao catecol, as células foram submetidas a imunomarcação com anti-GFAP, para marcação de astrócitos, de anti-OX42, para verificar presença da microglia e marcação dos núcleos com DAPI. As imagens das células do controle do P1, imunomarcadas para GFAP chama a atenção para uma monocamada de células pleomórficas e filamentos organizados (**Fig. 17A**). Os astrócitos com remoção precoce da microglia, tratados com catecol, apresentaram reatividade astrocitária e aumento da expressão de GFAP, na presença do catecol tanto na concentração de 100 μ M (**Fig. 17B**) como na concentração de 300 μ M (**Fig. 17C**), comparadas com as células do controle. O GSH, na concentração utilizada (3,5 mM), diminuiu a celularidade (**Fig. 17D**), porém protegeu os astrócitos contra as mudanças morfológicas causadas pelo catecol nas concentrações de 100 μ M (**Fig. 17E**) e 300 μ M (**Fig. 17F**). Não foi observada marcação com OX42 em nenhum campo, em cultura de astrócitos isolados P1.

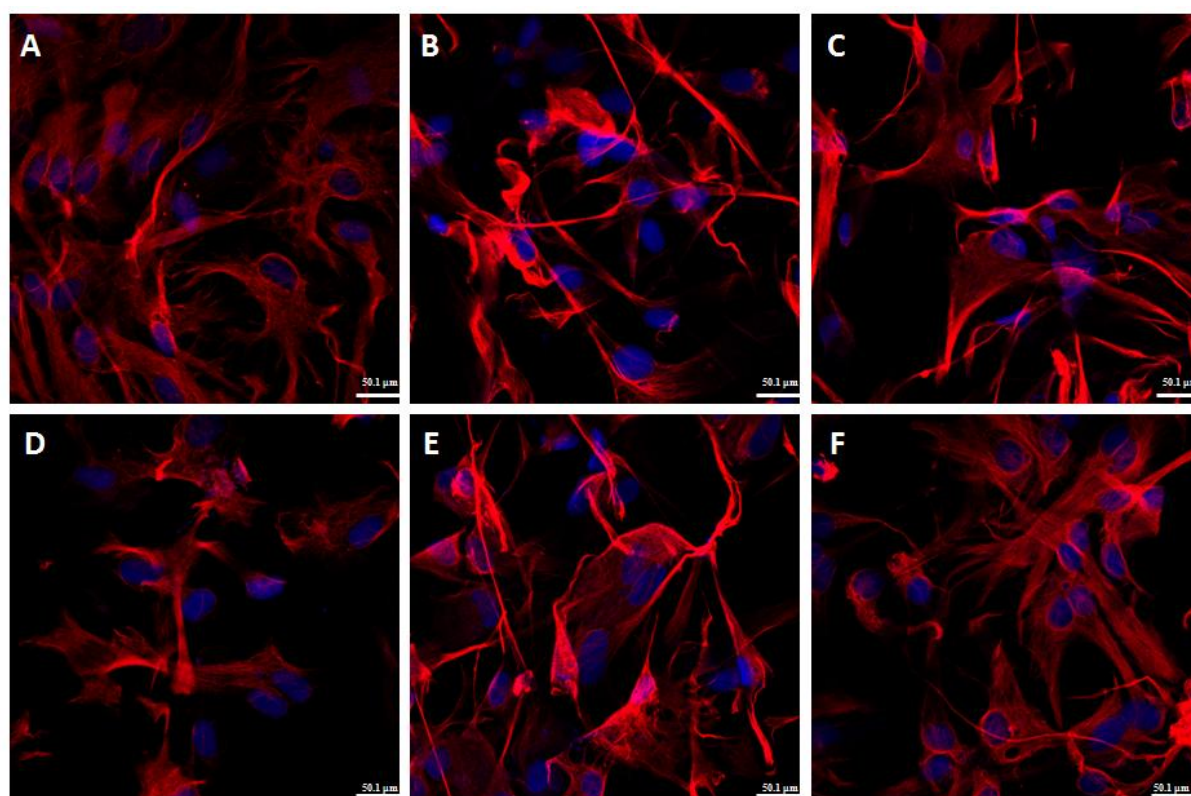


Figura 17: Alterações morfológicas induzidas por catecol em astrócitos P1. Astrócitos com remoção precoce da microglia (a partir de 48 h do isolamento) (P1). **A** - Controle; **B** - Astrócitos expostos a 100 μ M de catecol; **C** - Astrócitos expostos a 300 μ M de catecol; **D** - Astrócitos tratados com GSH a 3,5 mM; **E** - Astrócitos expostos a 100 μ M de catecol e GSH a 3,5 mM; **F** - Astrócitos expostos a 300 μ M de catecol e GSH a 3,5 mM. Tempo de exposição 72 h. Imunocitoquímica para GFAP (vermelho) e OX42 (verde), marcação de núcleos com DAPI (azul) Análises por microscopia confocal. Barra equivalente a 50.1 μ m.

Os astrócitos isolados do protocolo 2 (remoção tardia da microglia, após 7 dias de cultivo), no controle, apresentaram-se com morfologia poligonal (**Fig. 18A**). As células apresentam-se reativas, caracterizadas por astrogliose predominante, mediante o dano pelo catecol nas concentrações de 100 μM (**Fig. 18B**) e 300 μM (**Fig. 18C**). Os astrócitos foram mais resistentes ao efeito do GSH na concentração utilizada (3,5 mM). No entanto, essa quantidade não foi suficiente para proteger estas células ao dano pelo catecol a 100 μM (**Fig. 18E**). Porém, nos astrócitos expostos a 300 μM de catecol em meio de cultivo com GSH, observa-se celularidade aparentemente preservada e astrogliose moderada (**Fig. 18F**). Células microgliais não foram detectadas em nenhum campo da cultura de astrócitos isolados do P2.

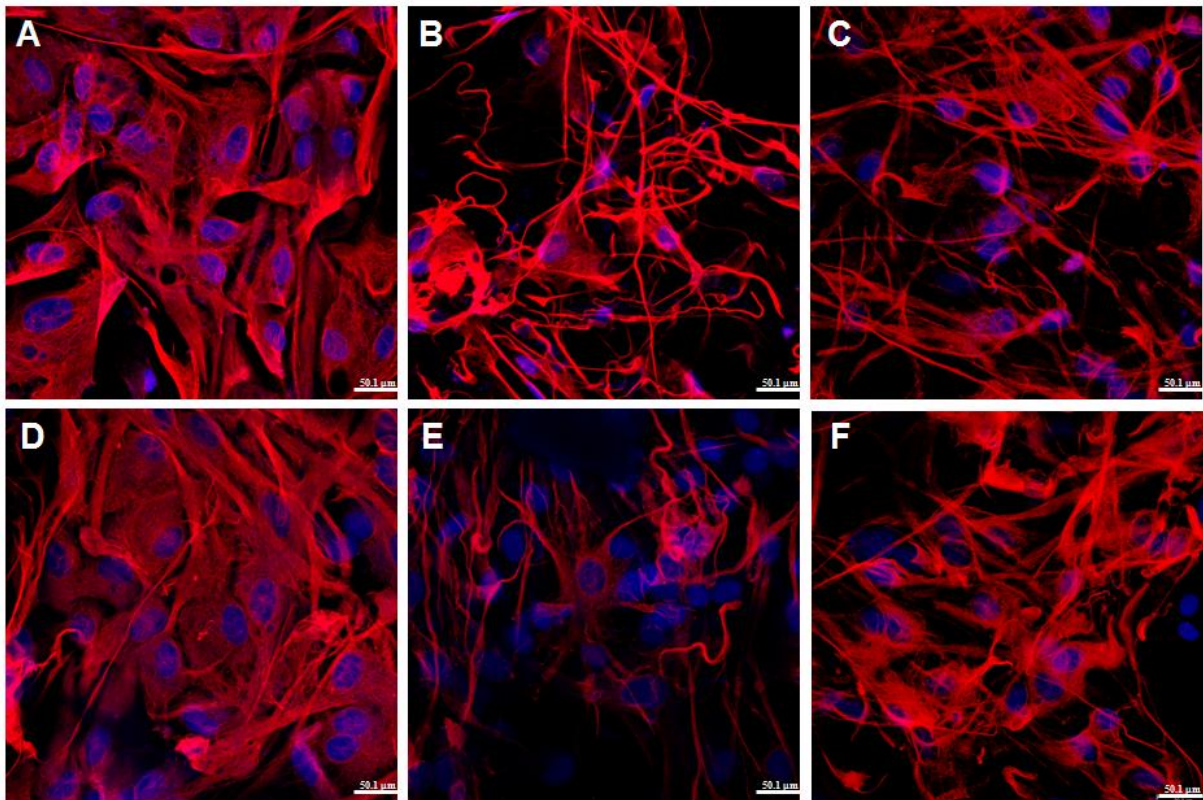


Figura 18: Reatividade astrocitária induzida pelo catecol em astrócitos isolados em meio DMEM HAM F12, com remoção tardia da microglia (após 7 dias de cultivo) (P2). **A** - Controle; **B** - Astrócitos expostos a 100 μM de catecol; **C** - Astrócitos expostos a 300 μM de catecol; **D** - Astrócitos expostos a GSH a 3,5 mM; **E** - Astrócitos expostos a 100 μM de catecol e GSH a 3,5 mM; **F** - Astrócitos expostos a 300 μM de catecol e GSH a 3,5 mM. Tempo de exposição: 72 h. Imunocitoquímica para GFAP (vermelho) e OX42 (verde), marcação de núcleos com DAPI (azul). Análises por microscopia confocal. Barra equivalente a 50,1 μm .

4.2.2 Efeito do meio condicionado pela microglia sobre astrócitos isolados pelo protocolo 1

Para entender a resistência ao catecol dos astrócitos cultivados pelo protocolo 2 (expansão em mistura glial até 7 dias e depois desse período remoção da microglia) e a diferença no perfil de respostas entre estas células, os astrócitos do protocolo 1 (remoção precoce da microglia) foram expostos ao catecol nas concentrações entre 10 - 2000 μM , na presença de MCMG a 20% (v/v). O gráfico (**Fig. 19**) representativo da citotoxicidade do catecol aos astrócitos mostra a EC_{50} de 638 μM (variação: 574 - 675 μM ; $n = 3$), ou seja, MCMG a 20% confere proteção de 8 vezes quando comparado aos astrócitos sem a presença de MCMG. Catecol é citotóxico aos astrócitos isolados pelo protocolo 1, o MCMG protegeu estas células. O experimento que representa a mediana da EC_{50} é representado pela equação [3]:

$$V = 9,44 + \{56,40 / [1 + 10^{(14,52 \text{ Log } C - 41,31)}]\} \quad R2 = 0,874 \quad [3]$$

Também é possível visualizar a menor quantidade de quinonas formadas (**Fig. 19**).

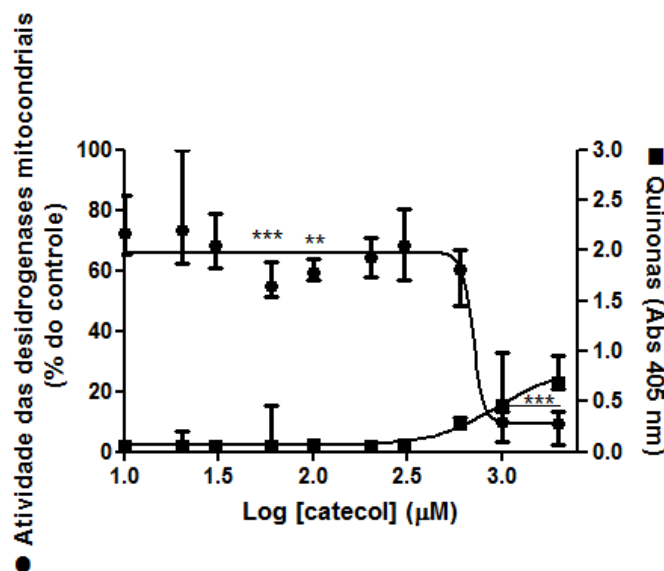


Figura 19. Citotoxicidade do catecol aos astrócitos P1 modulados por MCMG a 20% (v/v). Exposição celular por 72 h ao catecol nas concentrações entre 10 - 2000 μM em MCMG a 20% (v/v). A figura mostra os dados do experimento com EC_{50} correspondente à mediana de 656 μM (variação: 574 - 675 μM $n = 3$). (●) Viabilidade celular e (■) formação de quinonas. Os dados representam distribuição não normal, representados por mediana e variação, analisados por Kruskal-Wallis seguido por teste de comparação de Dunns. Experimento em triplicata. Significância estatística: (**) $p < 0,001$; (***) $p < 0,0001$ comparada com o controle do solvente (5×10^{-4} M de HCl).

Outro questionamento que surgiu diante dos dados foi: a concentração do MCMG influencia na resposta destas células mediante o dano pelo catecol? O mesmo teste foi realizado, agora utilizando MCMG a 50% (v/v).

Os dados evidenciaram maior proteção ao dano pelo catecol aos astrócitos modulados pelo MCMG a 50% (v/v), com sobrevivência relativa acima de 60% em todas as concentrações testadas (**Fig. 20**), e no mesmo gráfico observa-se menor quantidade de quinonas comparada com o grupo não modulado pelo MCMG (ver **Fig. 20A**).

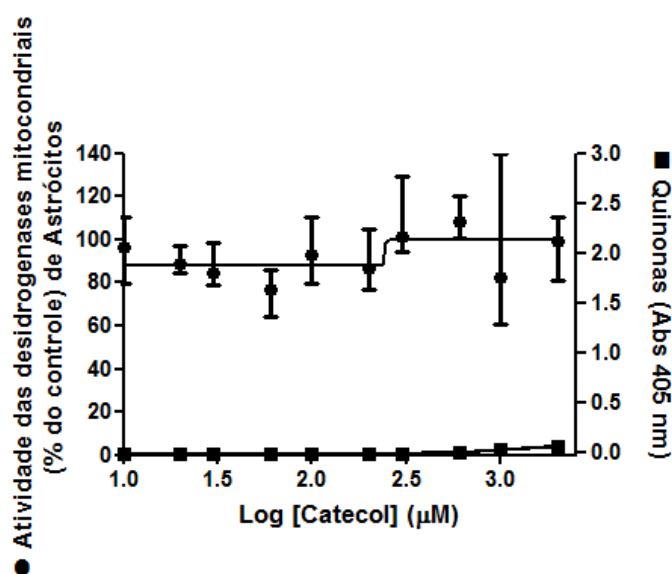


Figura 20. Citotoxicidade do catecol aos astrócitos P1 modulados por MCMG a 50% (v/v). Astrocitos do protocolo 1 (com remoção precoce da microglia) foram expostos ao catecol nas concentrações de 10-2000 µM em MCMG a 50% (v/v), por 72 h. Controle do solvente (5×10^{-4} M de HCl). (●) Viabilidade celular e (■) formação de quinonas. Os dados apresentam distribuição não normal, representados por mediana e variação, analisados por Kruskal-Wallis seguido por teste de comparação Dunns. O gráfico representa um dos experimentos realizados em triplicata.

Para elucidar melhor a influência da microglia sobre o perfil de resistência dos astrócitos do protocolo 2 (expansão destas células com microglia, em meio DMEM HAM F12 por 7 dias, com remoção da microglia após este período), mediante o dano pelo catecol, foi realizado imunocitoquímica utilizando astrócitos cultivados sem microglia (P1) em MCMG a 20% (v/v). No controle (**Fig. 21A**), astrócitos cultivados em DMEM HAM F12 apresentam-se em monocamada confluenta, aspectos normais com morfologia poligonal, marcação GFAP positiva e não se observa células marcadas com OX42, identificação da microglia. Os astrócitos ao serem expostos a 100 µM de catecol apresentam astrogliose, prolongamento de

citoesqueleto, forte marcação de GFAP e redução na celularidade (**Fig. 21B**), e na concentração de 300 μM apresentam-se com alterações morfológicas, como alargamento do citoplasma e aglomeração celular das poucas células sobreviventes (**Fig. 21C**). Observa-se também citoesqueleto com filamentos intermediários desorganizados em algumas células (veja seta, **Fig. 21C**). Os astrócitos isolados através do P1 na presença do MCMG a 20%, apresentam retração do citoplasma, refletindo na confluência da monocamada celular, com discreta reatividade astrocitária em algumas células, caracterizada pelos prolongamentos finos do citoesqueleto (**Fig. 21D**). Nas células expostas a 100 μM de catecol em MCMG a 20%, a astrogliose é mais intensa, porém mais resistentes ao dano pelo catecol (**Fig. 21E**). Nos astrócitos expostos a 300 μM de catecol em MCMG a 20% (**Fig. 21F**) foi possível observar astrogliose moderada, marcação forte de GFAP e maior celularidade quando comparado com astrócitos expostos a mesma concentração em meio DMEM HAM F12.

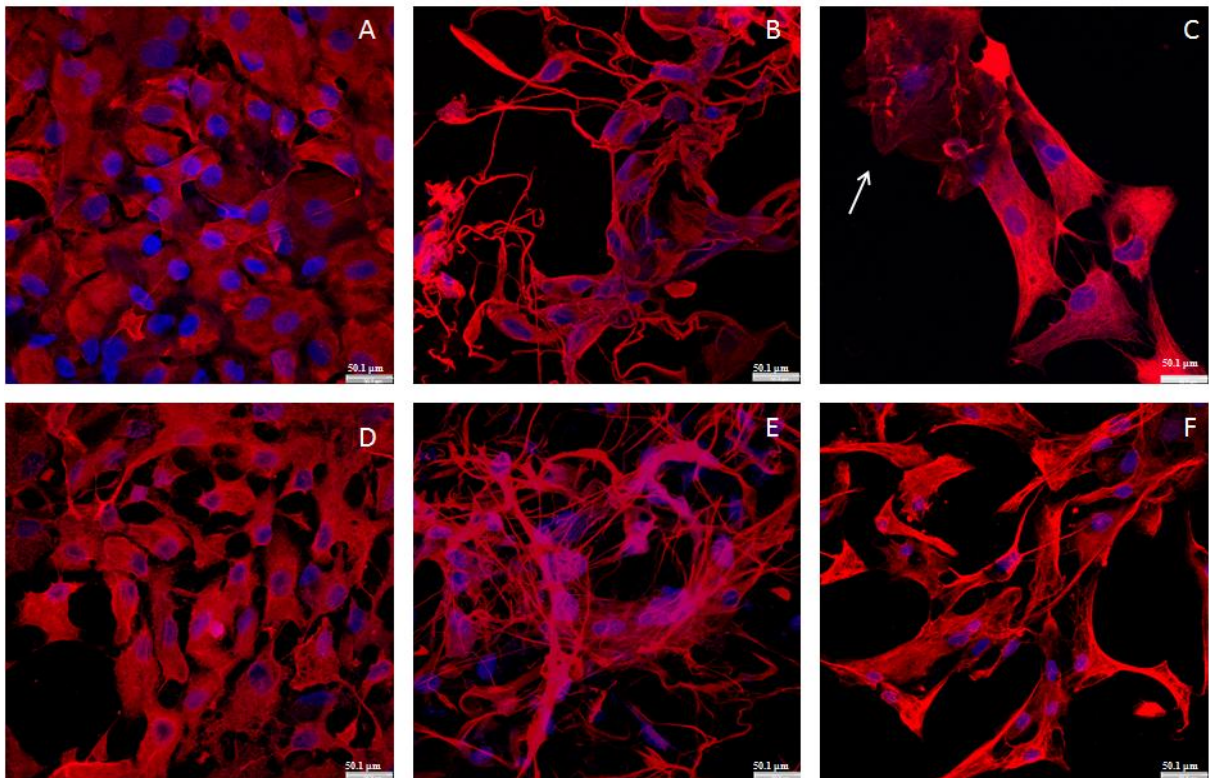


Figura 21: Influência do meio condicionado da microglia sobre morfologia dos astrócitos P1 expostos ao catecol. **A** - Cultura primária dos astrócitos cultivados sem microglia (P1) em DMEM HAM F12; **B** - Astrócitos em DMEM HAM F12 com 100 μM de catecol; **C** - Astrócitos em DMEM HAM F12 com 300 μM de catecol; **D** - Astrócitos em MCMG a 20% (v/v); **E** - Astrócitos em MCMG 20% (v/v) com 100 μM de catecol; **F** - Astrócitos em MCMG 20% (v/v) com 300 μM de catecol. Tempo de exposição 72 h. Imunocitoquímica para GFAP (vermelho) e OX42 (verde), marcação de núcleos com DAPI (azul). Seta branca aponta célula com citoesqueleto desorganizado. Análises por microscopia confocal. Barra equivalente a 50,1 μm .

Apesar da celularidade diminuída nos grupos modulados e expostos ao catecol comparada com respectivos controles, algumas células mantêm a forma estrelada típica de astrogliose. A reatividade astrocitária modulada pelo MCMG pode ter influência positiva no aumento da resistência ao catecol.

4.2.3 Expressão de neurotrofinas e citocinas por astrócitos isolados (P1 e P2) expostos ao catecol

Para verificar a interação entre astrócitos e microglia na expressão de genes de neurotrofinas e citocinas em astrócitos isolados dos protocolos P1 e P2 e também mediante a exposição pelo catecol, foi realizada análise de qRT-PCR. Inicialmente determinou-se a variação da expressão do gene de HPRT e β -actina nos astrócitos de ambos os protocolos. A expressão dos dois genes controles β -actina e HPRT estão diminuídos nos astrócitos do protocolo 2 (Fig. 22A e B).

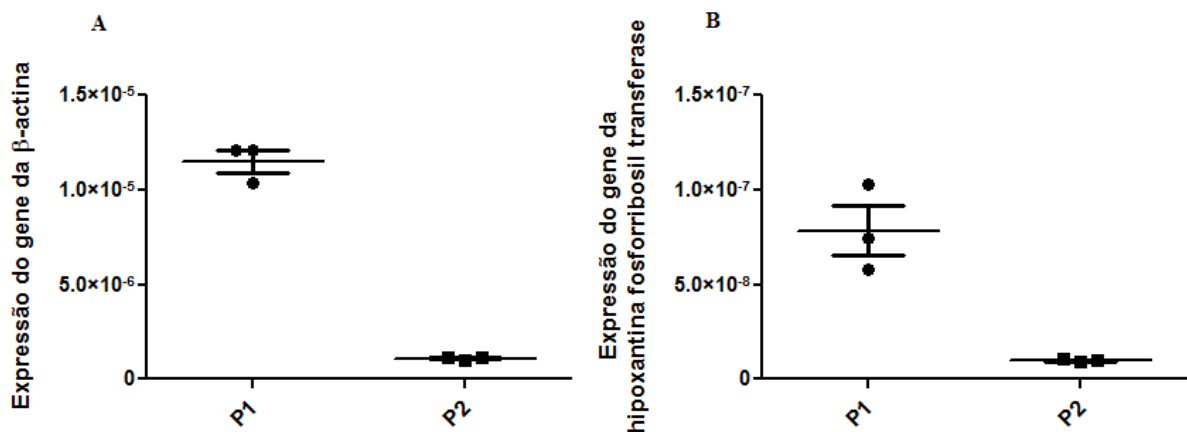


Figura 22. Expressão dos genes controles em astrócitos isolados do protocolo P1 e P2. **A** - Expressão do gene da β -actina. **B** - Expressão do gene da HPRT. Análise por qRT-PCR (n= 3).

Ao analisar a expressão do gene de GDNF, não se visualiza diferença na resposta dos astrócitos obtidos pelos diferentes protocolos de cultivo. O catecol também não interferiu na expressão gênica do GDNF nos astrócitos isolados de ambos os protocolos (P1 e P2) (Fig. 23,A). Por outro lado, observa-se que NGF é expresso 4,9 vezes mais em astrócitos isolados

por P1, comparado com astrócitos isolados de P2. No entanto, o catecol não altera a expressão do gene de NGF nestes astrócitos (**Fig. 23,B**).

O catecol promoveu alterações discretas na expressão gênica do BDNF em astrócitos do protocolo 1 e 2, sendo que nos astrócitos do protocolo 2 a diminuição foi proporcional ao aumento da dose (**Fig. 23,C**).

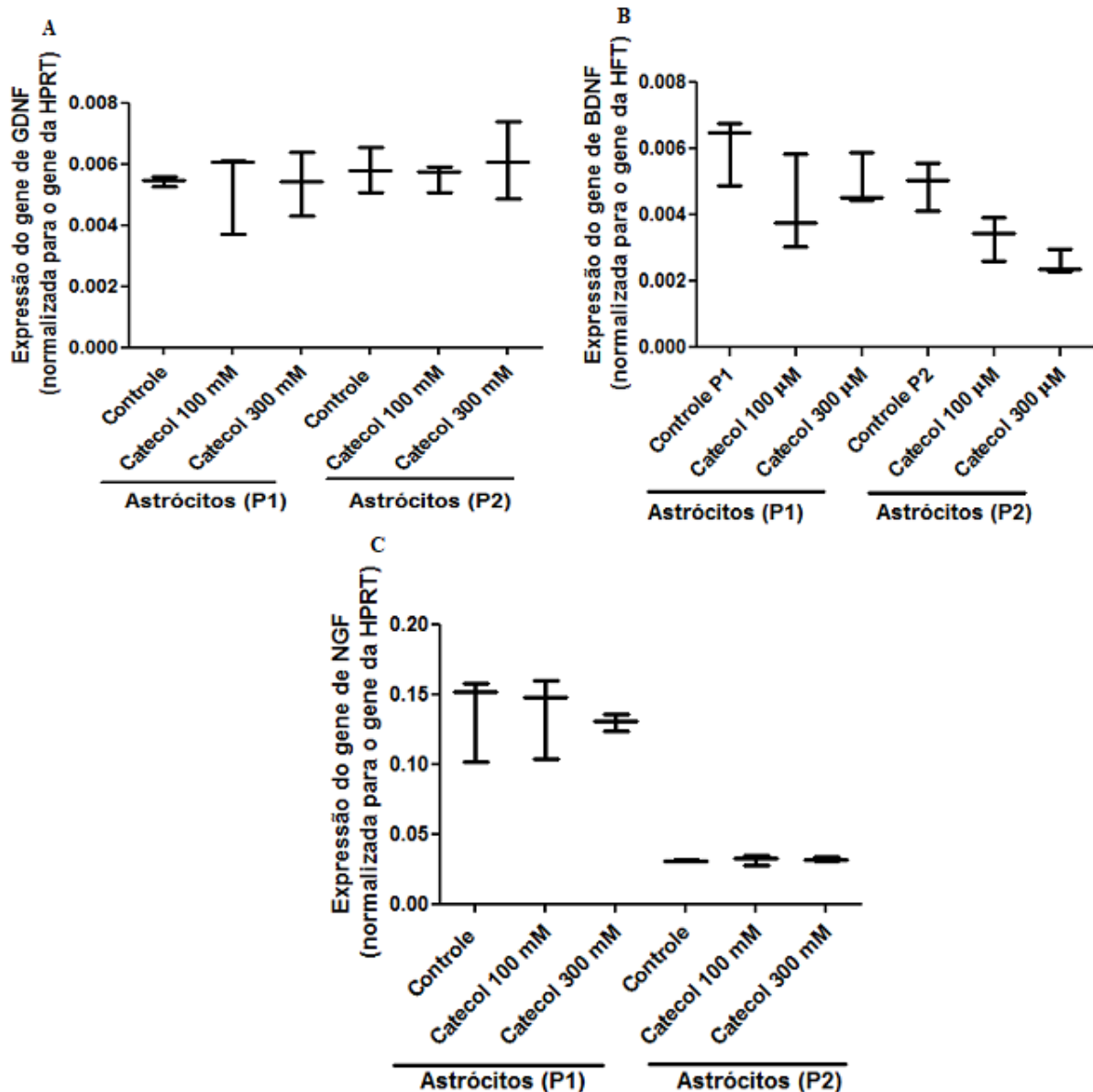


Figura 23. Efeito do catecol sobre a expressão gênica dos fatores neurotróficos em cultura de astrócitos isolados do protocolo P1 e P2. **A** - Expressão do gene de GDNF; **B** - Expressão do gene de BDNF; **C** - Expressão do gene de NGF; Exposição do catecol em 100 e 300 μ M por 72 h. Análise por qRT-PCR. Os dados são mostrados em mediana e variação de $2^{-\Delta CT}$ ($n = 3$). A expressão dos níveis gênicos é normalizada pela expressão dos genes de HPRT.

O catecol modula a expressão do gene da citocina IL-1 β nas concentrações de 100 e 300 μ M nos astrócitos isolados de ambos os protocolos (**Fig. 24,A**).

O catecol diminuiu a expressão de IL-1 β em 1,1 vezes quando os astrócitos do P1 foram expostos às concentrações de 100 e 300 μ M, e diminuiu 0,9 vezes quando os astrócitos isolados de P2 foram expostos a estas mesmas concentrações.

Astrócitos isolados, com remoção precoce da microglia durante o cultivo (P1) não sofreram modulação da expressão do gene da citocina IL-10 pelo catecol nas doses testadas. O catecol diminuiu em 1 vez a expressão gênica de IL-10 em astrócitos isolados, com remoção tardia da microglia (P2), nas duas concentrações testadas (**Fig. 24,B**).

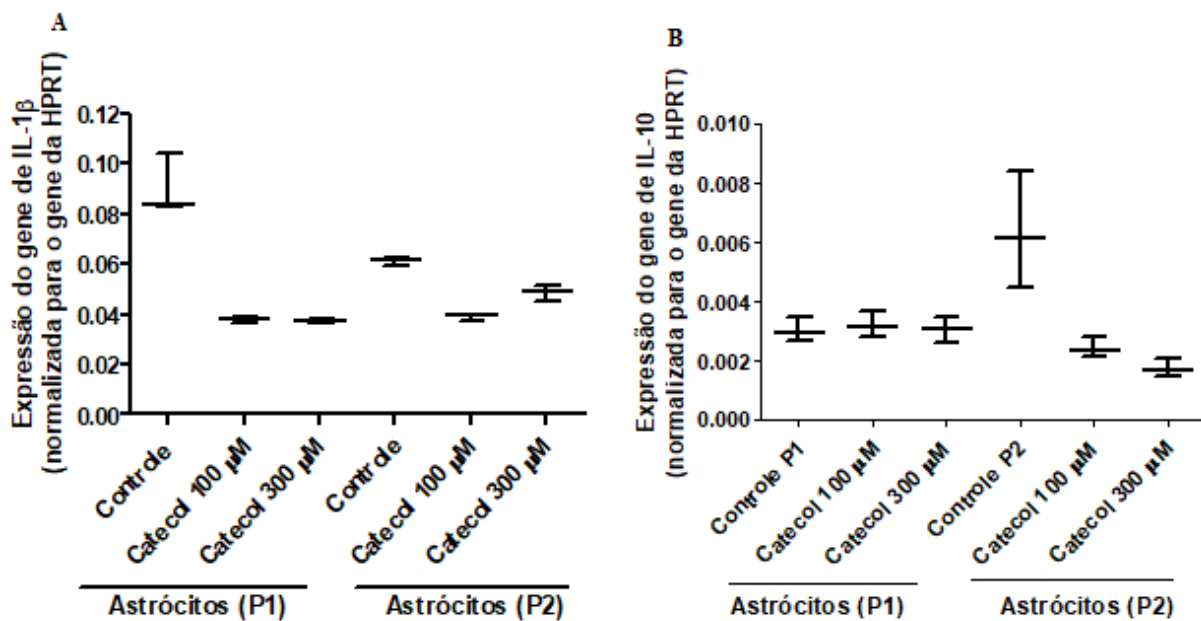


Figura 24. Expressão dos genes de IL-1 β e IL-10 em astrócitos isolados do P1 e P2. **A** - Expressão gênica de IL-1 β e **B** - Expressão gênica de IL-10. Modulação pelo catecol nas concentrações de 100 μ M ou 300 μ M por 72 h. Análise por qRT-PCR. Dados são mostrados como mediana e variação de $2^{-\Delta CT}$ (n = 3). Expressão dos níveis gênicos normalizados por HPRT.

Os dados são sugestivos de que a microglia tem influência sobre os mecanismos detoxificadores dos astrócitos frente o dano pelo catecol e sobre a diferenciação de CEC. A cultura primária dos astrócitos obtidos pelo protocolo 1, mostrou menor resistência ao dano pelo catecol e menor alteração morfofuncional, o que aponta este tipo de cultivo como o mais indicado para o estudo da interação com as células endoteliais, por apresentarem respostas astrócitárias características, sem a influência da interação com outras células gliais.

4.3 INTERAÇÃO PARÁCRINA ENTRE CEC E ASTRÓCITOS

4.3.1 Resistência a toxicidade do catecol em astrócitos induzida por MCCEC

Para avaliar interação parácrina entre CEC e astrócitos mediante a citotoxicidade do catecol em astrócitos, foram utilizadas as concentrações variando entre 10 - 2000 μM . Os dados revelaram uma citotoxicidade dependente da concentração do catecol nos astrócitos a partir da concentração de 28 μM , levando à quase totalidade de morte celular nas concentrações mais altas estudadas (**Fig. 25A**). O catecol induz citotoxicidade nos astrócitos com $\text{EC}_{50} = 88 \mu\text{M}$ (variação: 28 - 151 μM , $n = 8$). O experimento correspondente ao valor próximo da mediana foi definido pela equação [4]:

$$V = \{84,61 / [1 + 10^{(-1,258\text{LogC} - 2,61)}]\} \quad R^2 = 0,916 \quad [4]$$

Para entender o papel das CEC em modular a citotoxicidade do catecol sobre os astrócitos foi realizado o teste de MTT utilizando meio condicionado de CEC a 50 e 100%. O MCCEC a 50% induziu resistência nos astrócitos ao catecol observada pelo aumento na EC_{50} para 531 μM (variação: 184 - 766 μM , $n = 8$) (**Fig. 25B**). O experimento correspondente ao valor próximo da mediana foi definido pela equação [5]:

$$V = 25,39 + \{57,11 / [1 + 10^{(3,88\text{LogC} - 10,44)}]\} \quad R^2 = 0,860 \quad [5]$$

Ao analisar os astrócitos expostos ao catecol na presença de 100% de MCCEC, observa-se a EC_{50} de 389 μM (variação: 181 - 827 μM , $n = 9$) (**Fig. 25C**). O experimento correspondente ao valor próximo da mediana foi definido pela equação [6]:

$$V = 17,88 + \{56,51 / [1 + 10^{(2,28\text{LogC} - 6,02)}]\} \quad R^2 = 0,8376 \quad [6]$$

Quando os astrócitos foram expostos ao catecol na presença de MCCEC a 50% e 100% (**Fig. 25B e C**), observa-se que houve um aumento da sobrevivência destas células em torno de aproximadamente 6 e 4 vezes, respectivamente, quando comparado com o tratamento em meio DMEM HAM F12. Ocorreu também uma redução de 50% na quantidade de quinonas no tratamento com catecol e meio condicionado a 100 %, quando comparado com o controle positivo (células expostas ao catecol em meio DMEM HAM F12).

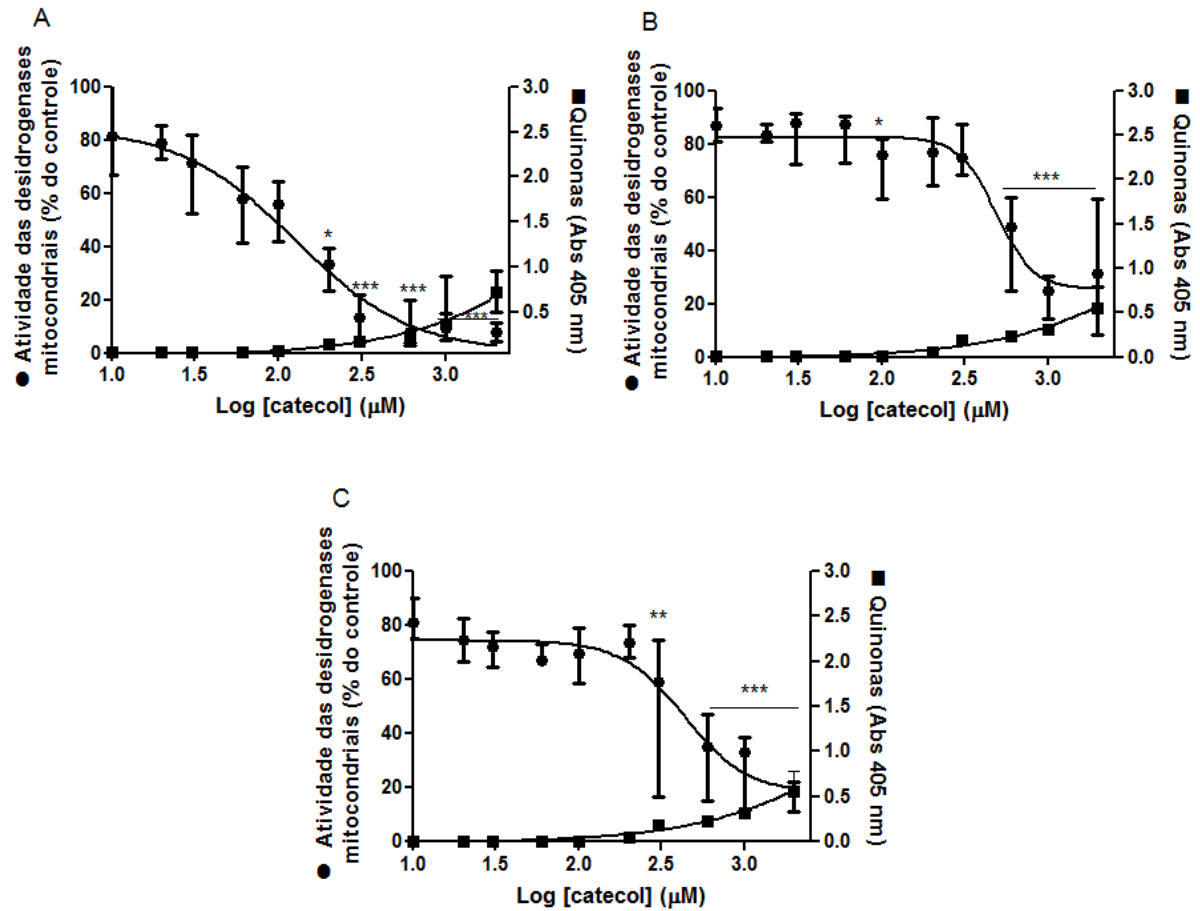


Figura 25. Modulação do meio condicionado de CEC na citotoxicidade do catecol (10 - 2000 μM) em astrócitos após 72 h. **A** - Controle: astrócitos cultivados em meio DMEM HAM F12; **B** - Astrócitos cultivados em MCCEC 50% (v/v); e **C** - Astrócitos em 100% MCCEC; os gráficos representam os dados do experimento com EC_{50} próxima à mediana. Os dados apresentam distribuição não normal, representados por mediana e variação, analisados por *Kruskal-Wallis* seguido por teste de comparação *Dunns*. Significância estatística mostrada como (*) $p < 0,01$; (**) $p < 0,001$; (***) $p < 0,0001$ comparada com o controle tratado com 5×10^{-4} M de HCl.

A diferença de resposta entre o grupo de células expostas ao catecol em meio DMEM e os grupos modulados pelo meio condicionado pelas CEC pode ser melhor visualizadas quando comparadas às medianas da EC_{50} do catecol em cada grupo (**Fig. 26**).

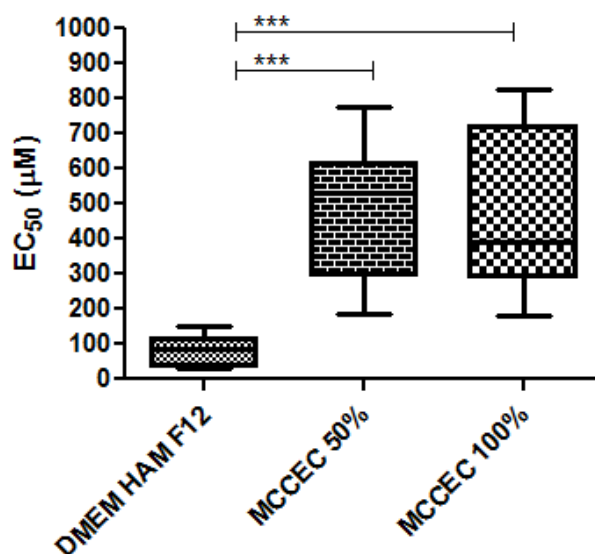


Figura 26. Meio condicionado de CEC confere resistência à toxicidade pelo catecol em astrócitos. Os dados são representados pelas medianas, percentis 75% e 25% e variações para os grupos em meio DMEM HAM F12 (n = 8), em 50% de meio condicionado por CEC (n = 8) e em 100% de meio condicionado por CEC (n = 9). O tempo de exposição foi de 72 h. Comparações entre dois grupos foram feitas com o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Significancia (***) p < 0,0001 comparada com o grupo exposto ao catecol em meio DMEM HAM F12.

Nas análises morfológicas por microscopia de contraste de fase, foi possível observar monocamadas celulares confluentes nos controles (**Fig. 27A, E e I**). Nas imagens das células cultivadas em DMEM HAM F12 e tratadas com 100 µM de catecol (**Fig. 27B**), 300 µM de catecol (**Fig. 27C**) e 2000 µM (**Fig. 27D**) houve diminuição no número de células, conforme aumento nas concentrações do catecol. Nas células expostas a 2000 µM de catecol em DMEM HAM F12, observa-se fragmentação celular (pontas de seta) e agregados celulares (setas brancas) com coloração escura no citosol, sugerindo acúmulo de quinonas ou metabólitos conjugados (**Fig. 27D**). A pigmentação escura ficou mais evidente nas células tratadas com catecol e moduladas com meio condicionado, menos intensa em MCCEC a 50% (**Fig. 27H**) do que em MCCEC a 100% (**Fig. 27L**). O MCCEC protegeu os astrócitos na presença de 2000 µM de catecol (**Fig. 27L**), onde se observa maior número de células aglomeradas comparando com a condição não modulada pelo meio condicionado, mesmo apresentando coloração escura mais intensa no compartimento intracelular (setas brancas).

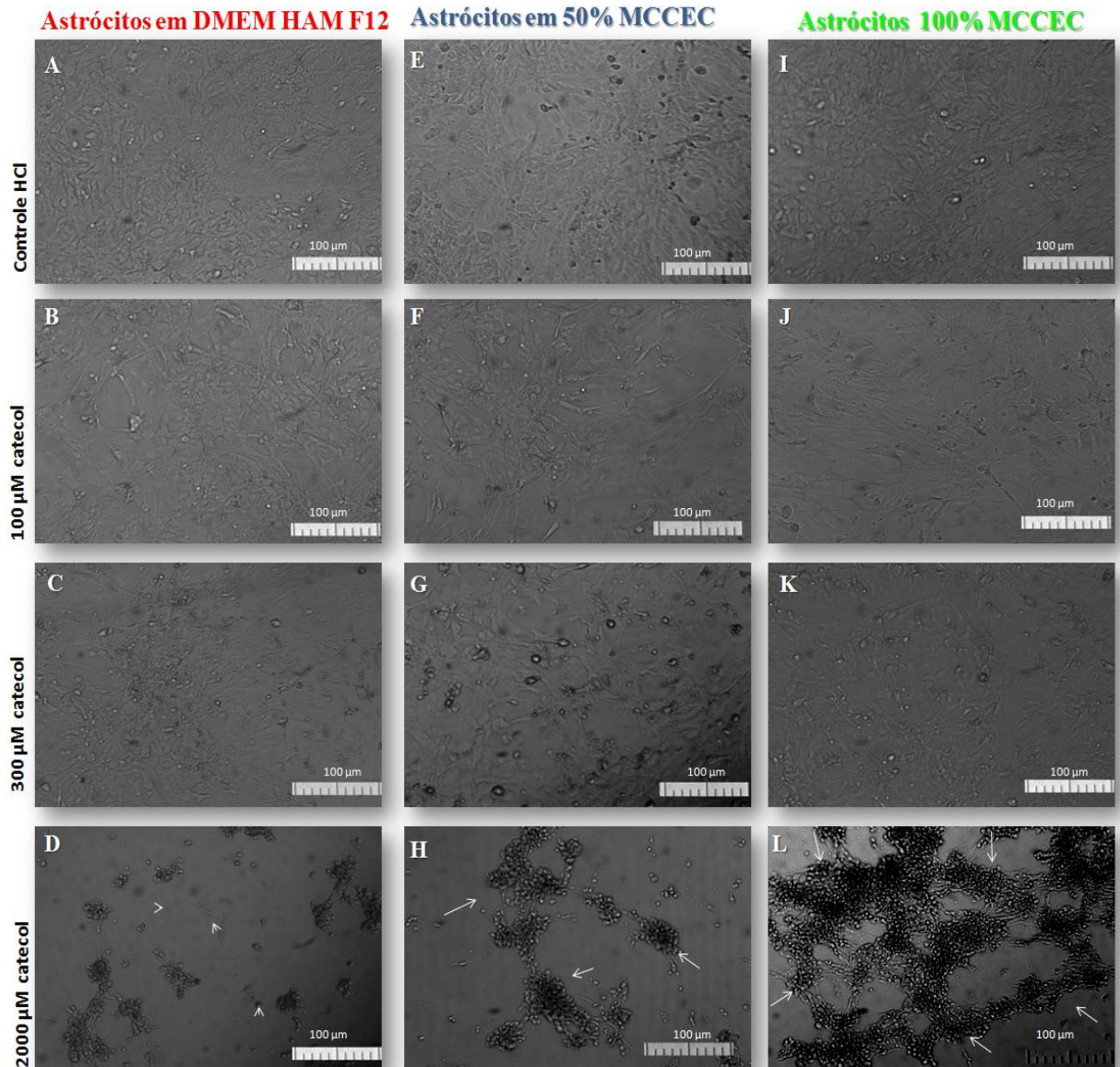


Figura 27. Aspectos morfológicos das culturas primárias de astrócitos expostos ao catecol (100 μ M, 300 μ M e 2000 μ M) por 72 h: **A** - Astrócitos em meio DMEM HAM F12 com 5×10^{-4} M de HCl; **B**, **C** e **D** - Astrócitos em meio DMEM HAM F12 e catecol dissolvido em 5×10^{-4} M de HCl; **E** - Astrócitos em meio MCCEC 50% (v/v); **F**, **G** e **H** - Astrócitos em MCCEC a 50% (v/v) e catecol; **I** - Astrócitos em MCCEC a 100% com 5×10^{-4} M de HCl; **J** e **K**, **L** - Astrócitos em meio MCCEC 100% e catecol. Setas brancas mostram aglomerados celulares. Pontas de setas apontam fragmentos celulares. Microscopia de contraste de fase. Barra equivalente a 100 μ m.

Para analisar melhor as alterações morfológicas dos astrócitos na interação com CEC, mediante o dano, após exposição com 20 μ M de catecol em MCCEC 50% e 100% (**Fig. 28**), foi realizado imunocitoquímica, usando imunomarcador de astrócitos (GFAP), de microglia (OX42) e marcador de núcleo, o DAPI. No controle há presença de células normais, marcação positiva de GFAP (vermelho), predominando o fenótipo poligonal. No grupo tratado com 20

μM de catecol observa-se discreta reatividade astrócitária e marcação aparentemente mais forte para GFAP (**Fig. 28B**) quando comparado com o controle. Nos astrócitos expostos ao catecol e modulados com MCCEC 50% (**Fig. 28C**) e MCCEC 100% (**Fig. 28D**) observou-se alterações pontuais de citoesqueleto, caracterizada pelo acúmulo de filamentos proteicos e pela intensidade da cor vermelha no local. Não foi observada marcação para microglia.

Ao determinar a intensidade de fluorescência resultante da imunomarcação para GFAP nos astrócitos, observou-se diminuição da intensidade de fluorescência nas células dos grupos modulados com MCCEC, quando comparadas com o controle (**Fig. 28E**). Nas imagens dos astrócitos expostos ao catecol na presença de MCCEC 50% apresentaram diminuição significativa ($p < 0.01$) na intensidade de fluorescência da marcação para GFAP, quando comparada com o controle (**Fig. 28E**), porém manteve celularidade preservada.

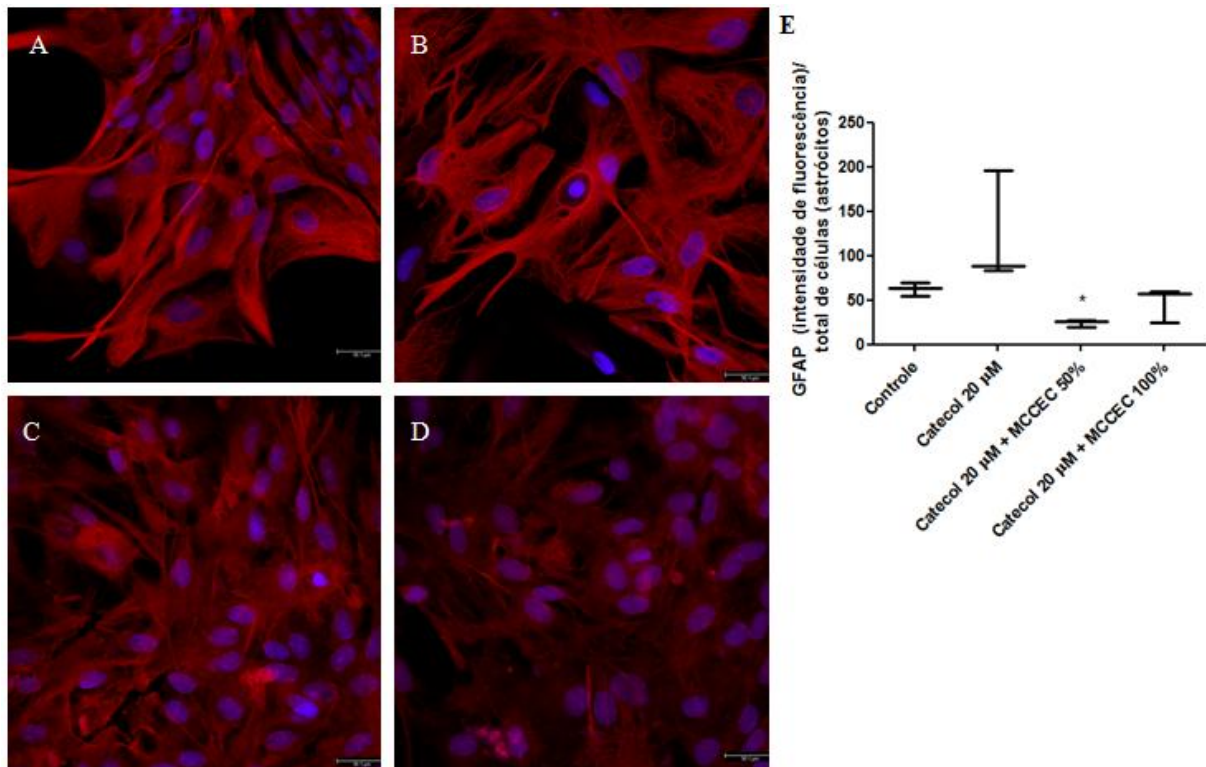


Figura 28. Modulação de GFAP em astrócitos modulados com meio condicionado por CEC. **A** - Astrócitos em meio DMEM HAM F12 com 5×10^{-4} M de HCl; **B** - Astrócitos tratados com 20 μM de catecol em meio DMEM HAM F12; **C** - Astrócitos tratados com 20 μM de catecol em MCCEC 50% (v/v); **D** - Astrócitos tratados com 20 μM de catecol em MCCEC100%. **E** - Intensidade de fluorescência da marcação de GFAP por número de astrócitos. Dados obtidos de teste em triplicata. Análise pelo teste de "Kruskal-Wallis", seguido do teste de "Dunn's" para múltiplas comparações. Significância (*) $p < 0,01$ comparando o grupo controle. Imunomarcador para microglia (verde) OX42, para astrócitos (vermelho) GFAP e DAPI é um marcador de núcleos (em azul). Imagens obtidas por Microscopia confocal após imunocitoquímica. Barra correspondente a 50,1 μm .

Para determinar o tipo de morte celular causada pelo catecol sobre os astrócitos, a concentração utilizada no teste foi de 40 μM , metade aproximada da mediana da EC_{50} do catecol nos testes de avaliação da citotoxicidade. Os *Dot plots* típicos foram utilizados na análise dos efeitos apoptóticos do catecol sobre os astrócitos (**Fig. 29**). Foi possível observar aumento da porcentagem de células em estágio inicial de apoptose e em estágio tardio de apoptose, ao mesmo tempo em que ocorreu diminuição da porcentagem de células viáveis (**Tabela 3**).

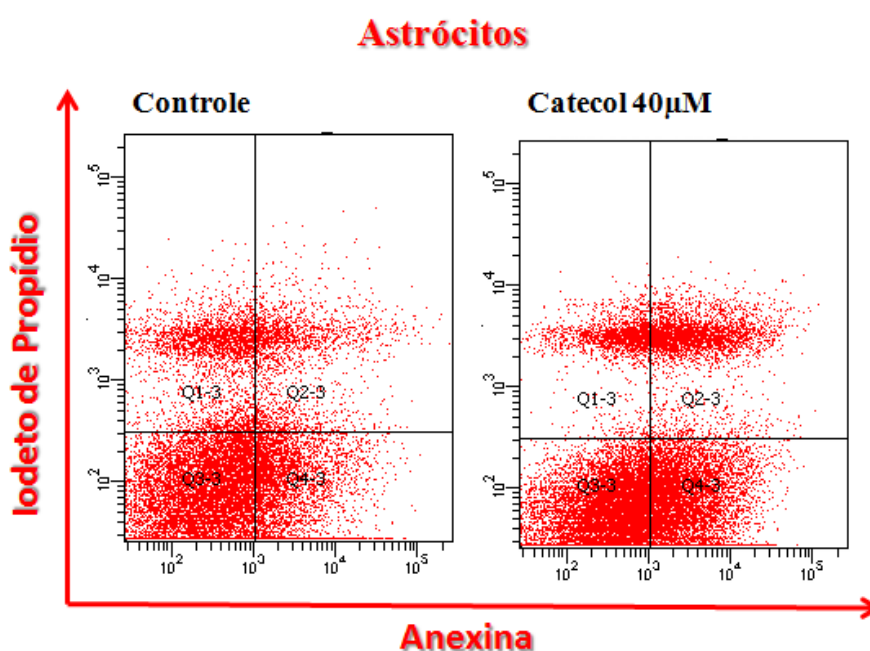


Figura 29. Tipo de morte celular induzida por catecol em astrócitos. À esquerda observa-se astrócitos (controle), não tratados; à direita astrócitos expostos a 40 μM de catecol, por 72 h. As células foram marcadas com Anexina V/Iodeto de Propídio. No Q1 observa-se células em necrose; em Q2 à direita, observa-se células em apoptose tardia; em Q3, células viáveis; em Q4 células que morreram por apoptose. Análise por citometria de fluxo. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Tabela 3. Tipo de morte por catecol em astrócitos.

Cultura primária de Astrócitos		
	Meio 2×10^{-5} M HCl	Catecol 40 μM
Viáveis	72,4 (71,2-77,4)	62,5 (59,0- 62,9)
Apoptose Inicial	12,8 (8,7-14,0)	26,1 (25,5-28,8)
Apoptose Tardia	4,2 (2,8- 4,9)	7,2 (6,5- 7,7)
Necrose	10,6 (9,9- 11,1)	4,6 (4,5- 4,7)

Astrócitos expostos a 5×10^{-4} M de HCl (controle) ou a 40 μ M de catecol por 72 h e depois marcados com anexina V e IP (índice de porcentagem) Os dados representam a mediana e variação dos percentuais de um experimento realizado em triplicata.

4.3.2 Células endoteliais cerebrais são resistentes à toxicidade do catecol

Para avaliar a citotoxicidade do catecol em CEC foram utilizadas as concentrações crescentes de 30 - 6000 μ M. Os resultados com a viabilidade celular a partir das análises das atividades das desidrogenases mitocondriais indicam resistência das CEC aos efeitos deletérios induzidos pelo catecol, mesmo nas concentrações mais altas (**Fig. 30**). O catecol em meio condicionado por astrócitos não alterou o perfil de resistência das CEC na faixa de concentrações utilizadas no teste (**Fig. 30**).

A quantidade de quinonas determinada no meio de culturas das CEC foi pequena (Abs 0,5 nm aproximadamente). Não se observa diferença na produção de quinonas entre o grupo modulado por MCAst 100% e em meio DMEM HAM F12 (**Fig. 31**).

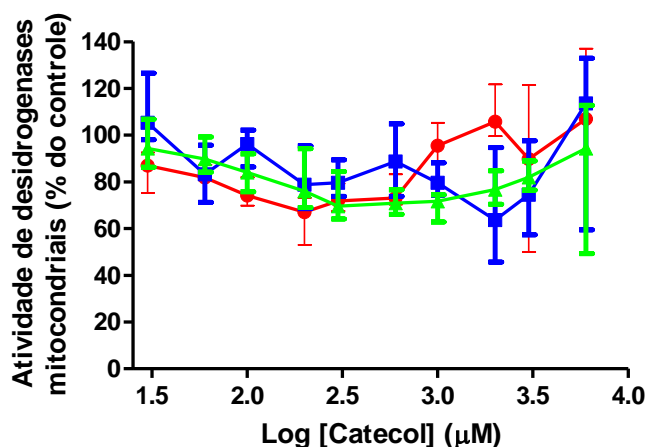


Figura 30. Efeito do catecol na atividade mitocondrial de CEC. ● CEC em meio de cultura DMEM HAM F12; ■ CEC em MCAst 50% (v/v) e catecol; ▲ CEC em MCAst 100%. Exposição ao catecol nas concentrações de 30 - 6000 µM, por 72 h. Os dados foram normalizados para os dados do controle negativo (diluinte do catecol, HCl a 5×10^{-4} M), cujas as medianas foram consideradas como 100%. O experimento foi feito em triplicata com 8 repetições por concentração. Os dados têm distribuição não normal e estão expressos em medianas e variações. O teste de Kruskal-Wallis não demonstrou diferença significativa entre as concentrações testadas e o grupo controle.

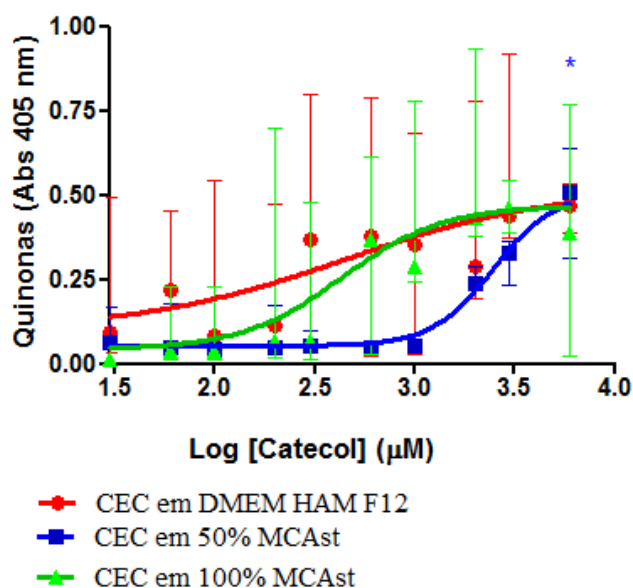


Figura 31. Produção de quinonas por CEC expostas ao catecol. ●CEC em meio de cultura DMEM HAM F12; ■ CEC em MCAst 50% (v/v) e catecol; ▲CEC em MCAst 100%. Exposição ao catecol nas concentrações de 30 - 6000 µM, por 72 h. Os dados foram normalizados para o controle negativo (diluinte do catecol, HCl a 5×10^{-4} M) cujas medianas foram consideradas como 100%. O experimento foi feito em triplicata, com 8 repetições por concentração. Os dados têm distribuição não normal e estão expressos em medianas e variações. Análises foram feitas com o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Significancia estatística * $P < 0,01$ entre grupo modulado pelo MCAst 50% e CEC em DMEM HAM F12.

Nas imagens obtidas por microscopia de contraste de fase visualiza-se CEC em monocamada com aspecto fusiforme, cultivadas em DMEM HAM F12, em MCAst a 50% e MCAst a 100% (**Fig. 32A, E e I**, respectivamente). Observa-se formação de aglomerados celulares com alteração estrutural da monocamada e mudança do padrão morfológico de fusiforme para alongado fino nas CEC expostas a 100 μM de catecol (**Fig. 32B**) e o mesmo aspecto de modo difuso, nas CEC exposta a 1000 μM em meio DMEM HAM F12 (**Fig. 32C**), sugerindo reatividade celular. Nas CEC expostas a 1000 μM de catecol em MCAst a 50% (v/v) (**Fig. 32G**) e MCAst 100% (**Fig. 32K**) observa-se a presença de aglomerados celulares (setas brancas). mais localizados sobre a monocamada aparentemente preservada. No entanto, visualiza-se fragmentos celulares (seta preta) com diminuição da celularidade no campo com CEC tratadas com 6000 μM de catecol em meio DMEM HAM F12 (**Fig. 32D**) e MCAst 50% (v/v) (**Fig. 32H**). Esta citotoxicidade não foi detectada pelo teste de MTT. No entanto, observa-se discreta aglomeração celular e monocamada endotelial preservada em células expostas a 6000 μM de catecol na presença de MCAst a 100% (**Fig. 32L**).

Apesar do catecol não alterar a atividade metabólica das desidrogenases mitocondriais das CEC, morfológicamente observou-se diminuição no número de células expostas à concentração mais alta. Diante da disparidade destes resultados, decidiu-se analisar o percentual de células viáveis e o tipo de morte celular empregando-se citometria de fluxo.

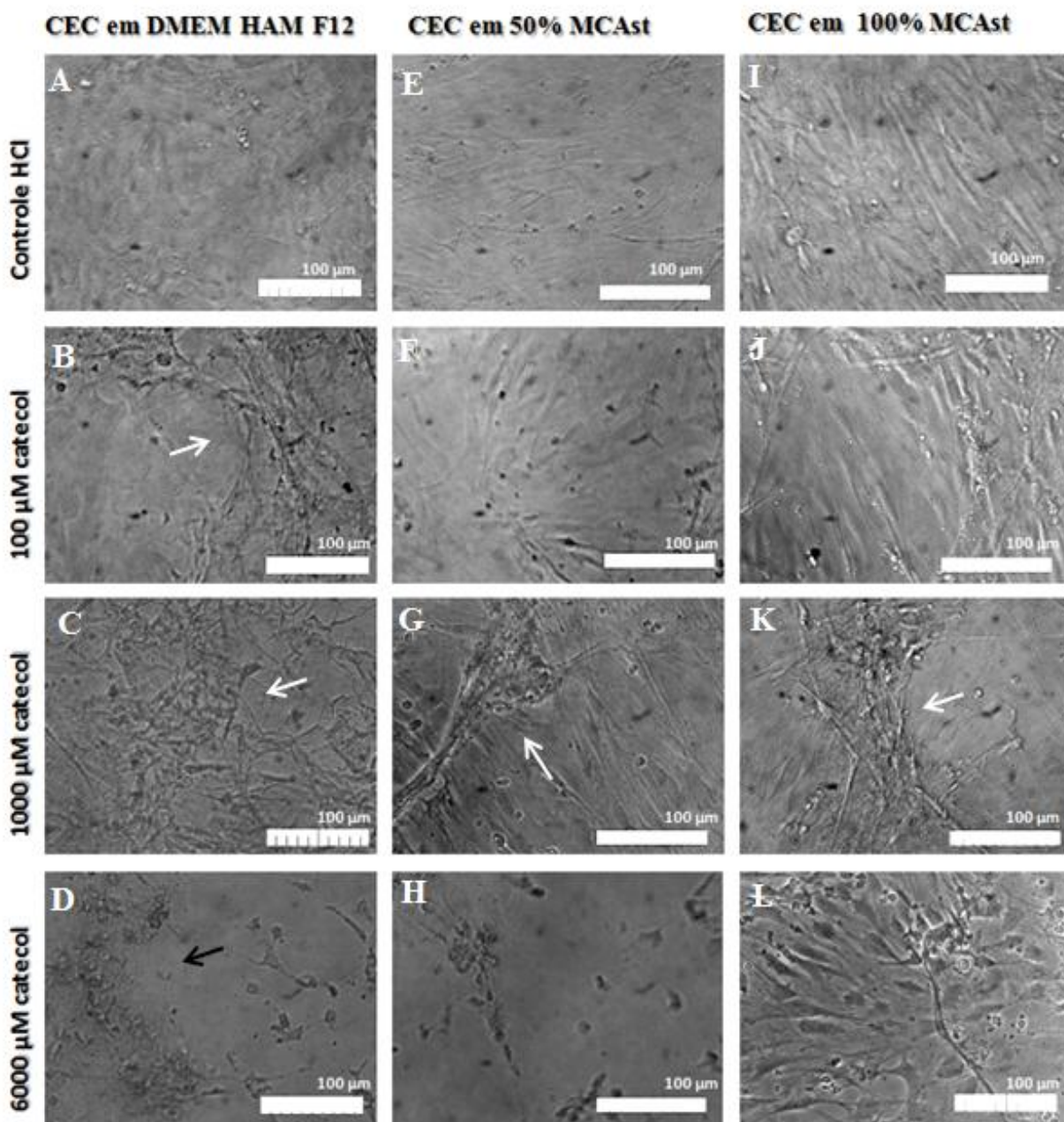


Figura 32. Aspectos morfológicos das culturas primárias de CEC expostas ao catecol em MCAst. Exposição a 100 μ M, 1000 μ M e 6000 μ M de catecol, por 72 h. A - CEC em meio DMEM HAM F12 com 5×10^{-4} M de HCl; B, C e D - CEC em meio DMEM HAM F12 e catecol; E - CEC em meio MCAst 50% (v/v) com 2×10^{-5} M de HCl; F, G e H - CEC em meio MCAst 50% (v/v) e catecol; I - CEC em MCAst 100% com 5×10^{-4} M de HCl; J e K, L - CEC em meio MCAst 100% e catecol. Aglomerados celulares mostrados pela seta branca e fragmentos celulares pela seta preta. Microscopia de contraste de fase. Barra equivalente a 100 μ m.

Para determinar o perfil de morte celular causado pelo catecol, foi realizada dupla marcação com anexina V e IP. Foi possível observar aumento da porcentagem de células em estágio inicial de apoptose ao mesmo tempo em que ocorreu diminuição da porcentagem de células viáveis (**Fig. 33**).

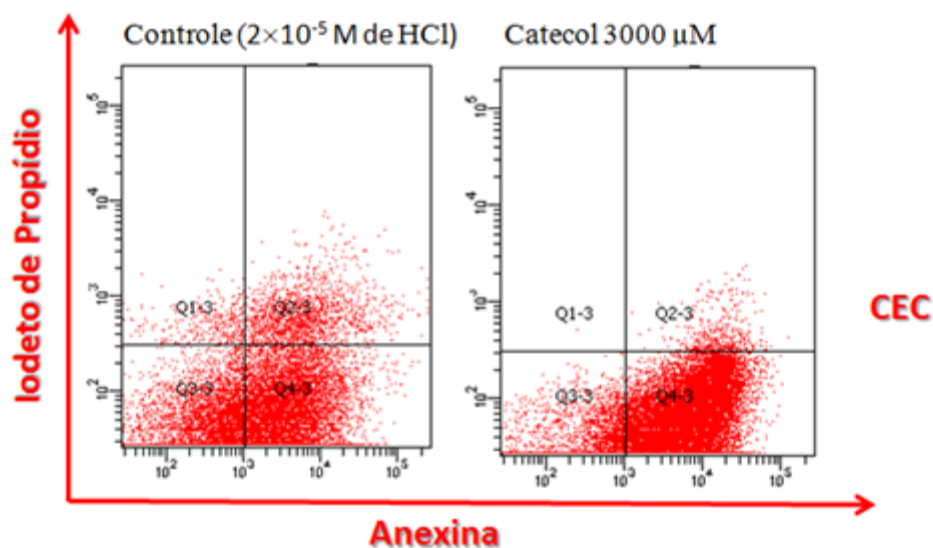


Figura 33. Tipo de morte celular induzida por catecol em CEC. À esquerda, células não tratadas (controle); à direita, CEC expostas a 3000 μM de catecol; As células foram marcadas com Anexina V/Iodeto de Propídio. No quadrante superior à esquerda células em necrose; no quadrante superior à direita células em apoptose tardia; no quadrante inferior à esquerda, células viáveis; no quadrante inferior à direita, células que morreram por apoptose. Análise por citometria de fluxo. Os experimentos foram realizados em triplicata.

O tratamento das CEC com catecol na concentração de 3000 μM levou a apoptose em 77,9 % das células (**Tabela 4**). As CEC, sem catecol, também apresentaram morte por apoptose em 54,7 %. O percentual da diferença (não significativa) entre células expostas ao catecol e controle é de 23,2% de morte celular por apoptose.

Tabela 4. Tipo de morte induzida por catecol em CEC.

Células Endoteliais Cerebrais		
	Meio HCl a 2×10^{-5} M	Catecol 3000 μM
Células viáveis	44,9 (43,3 - 49,1)	21,3 (20,6 - 32,6)
Apoptose inicial	54,7 (46,3 - 56,9)	77,9 (66,7 - 78,8)
Apoptose tardia	2,3 (0,4 - 3,7)	0,6 (0,7 - 0,8)
Necrose	0,5 (0,0 - 0,9)	0,0 (0,0 - 0,1)

Percentual de CEC marcadas com anexina V e IP após exposição a 3000 μM de catecol, por 72 h. Os experimentos foram realizados em triplicata e os dados representam a mediana e variação.

Até então, foi observado que células endoteliais cerebrais são resistentes ao dano pelo catecol nas concentrações de 30 - 6000 μM e que estas células secretam para o meio de cultivo, moléculas capazes de induzir os mecanismos de proteção nos astrócitos contra os efeitos deletérios das quinonas do catecol. Nas etapas seguintes se fez necessário avaliar a interação entre células endoteliais e astrócitos modulando os sistemas detoxificadores da BHE.

4.3.3 Expressão de GSTpi em CEC e Astrócitos

A enzima glutathion *S*-transferases está envolvida diretamente no metabolismo detoxificador do catecol, na fase II de biotransformação, catalisando reações de conjugação entre o tripeptídeo glutathion e quinonas formadas, reduzindo o dano oxidativo e espoliando GSH (Bolton and Dunlap, 2017).

Primeiramente foi verificado se a isoforma GSTpi em CEC sofre modulação pelo catecol e pelo meio condicionado pelos astrócitos, análise feita por citometria de fluxo onde obteve-se os histogramas dos grupos de células analisadas (**Fig. 34A**), média de intensidade de fluorescência (MFI, do inglês mean intensity of fluorescence) (**Fig. 34B**) e frequência (%) de células imunomarcadas (**Fig. 34A**). Observa-se que as CEC do controle apresentam 26,10% (variação: 24 - 28,3%) de frequência de CEC imunomarcadas para GSTpi e média de intensidade de fluorescência de 1,468. Nas células expostas a 3000 μM de catecol em meio DMEM HAM F12, observa-se frequência de imunomarcagem para GSTpi de 13,75% (variação: 12,0 - 15,8%) e a média de fluorescência de 2,471. As CEC expostas ao catecol em MCAst a 50% a frequência de imunomarcagem foi de 29,1% (variação: 27,6 - 30,0%) e média de intensidade de fluorescência de 2,280. Observa-se que houve uma diminuição significativa no número de células expressando GSTpi, quando expostas ao catecol em MCAst 100% quando comparadas as células expostas ao catecol em DMEM HAM F12 (**Fig. 34C**), porém a média de intensidade da expressão desta isoforma nestas células encontra-se aumentada (MFI = 2,008) (**Fig. 34B**).

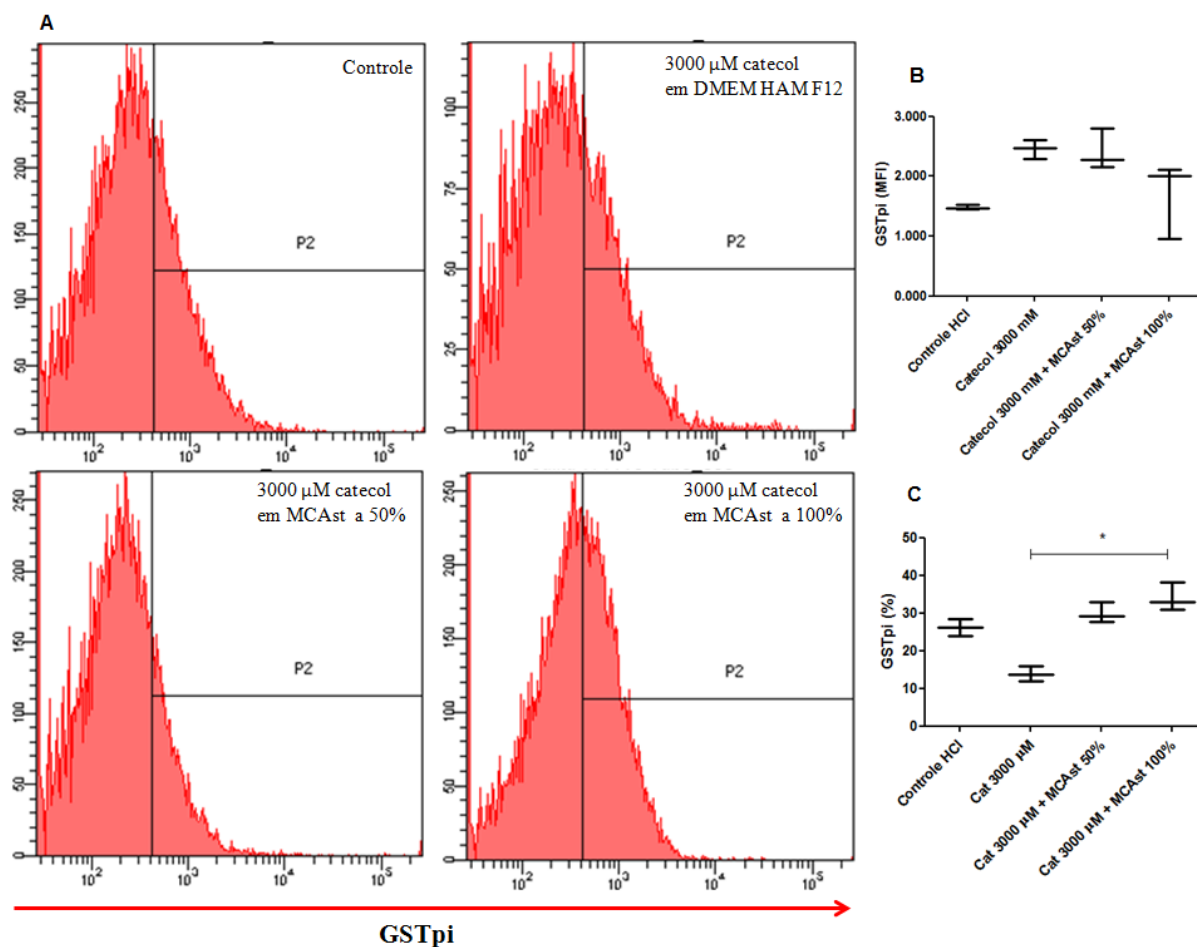


Figura 34. Expressão de GSTpi em CEC na interação com meio condicionado por astrócitos e exposição a 3000 μ M de catecol por 72 h. **A** - Histogramas dos grupos de tratamento: CEC em meio DMEM HAM F12 com 5×10^{-4} M de HCl (controle); CEC expostas a 3000 μ M de catecol em DMEM HAM F12; CEC expostas a 3000 μ M de catecol em MCAst 50% (v/v); CEC expostas a 3000 μ M de catecol em MCAst 100%. **B** - Média da intensidade de fluorescência (MFI) da GSTpi. **C** - Frequência de CEC imunomarcadas para GSTpi. Análise por citometria de fluxo, (n = 3). Comparações entre grupos foram feitas com o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Significancia * P < 0,01 comparada com catecol a 3000 μ M.

Para verificar a interação parácrina entre astrócitos e CEC, foi realizada imunocitoquímica para GSTpi nos astrócitos após tratamento com 20 μ M de catecol e MCCEC a 50% (v/v) e 100%. As imagens foram obtidas por microscopia confocal mostram imunomarcção para GSTpi nos astrócitos na condição controle, com localização predominantemente perinuclear definida pela coloração roseada dos núcleos na imagem (**Fig. 35A**). Na presença do catecol a 20 μ M, a isoforma GSTpi parece distribuir-se uniformemente pelo citosol de algumas células, porém não se observa alteração na intensidade de fluorescência dos astrócitos imunomarcados para GSTpi, quando comparada com o controle (**Fig. 35B**). As células exposta ao catecol na presença do MCCEC 50% e 100% apresentam uma distribuição citosólica e perinuclear de GSTpi, homogenia (**Fig. 35C e D**), com maior

intensidade de fluorescência na presença do MCCEC a 50% quando comparada com o grupo de células do controle (**Fig. 35E**).

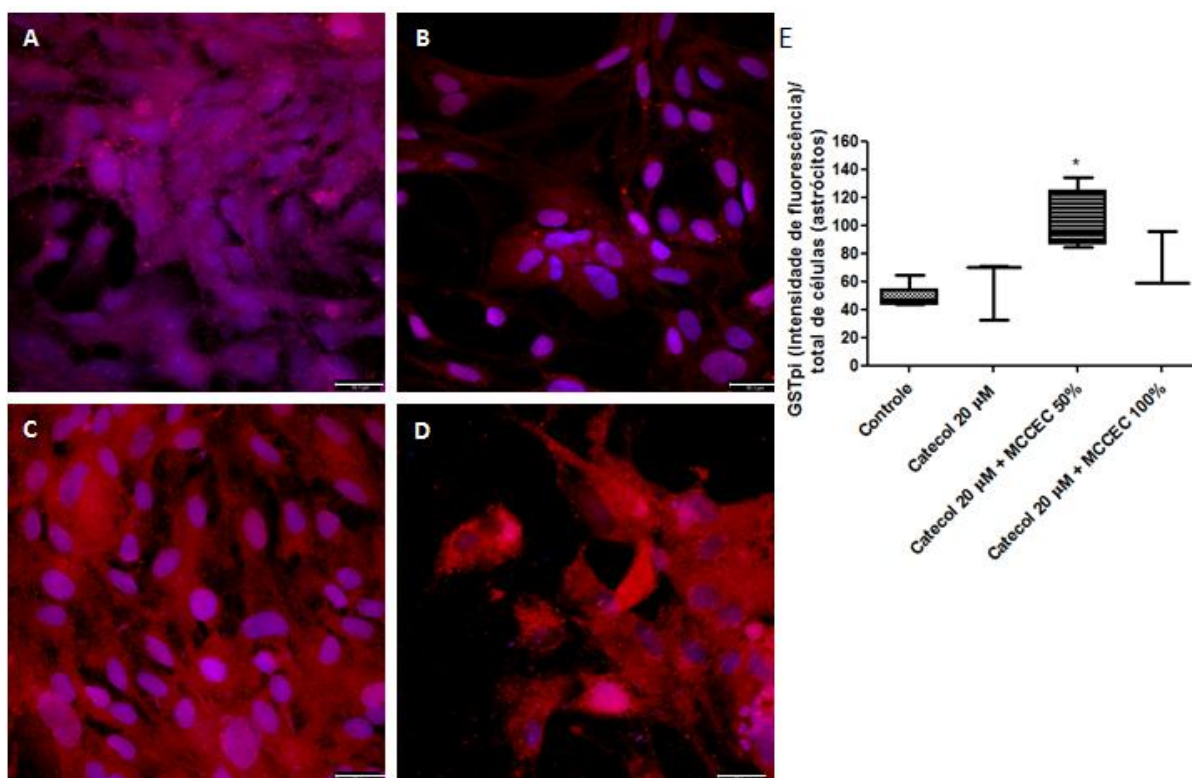


Figura 35. Expressão de GSTpi em astrócitos modulados por CEC no dano pelo catecol. **A** - Astrócitos em DMEM HAM F12 com 5×10^{-4} M de HCl (controle); **B** - Astrócitos em DMEM HAM F12 expostos a 20 μ M de catecol; **C** - Astrócitos em MCCEC a 50% (v/v) expostos a 20 μ M de catecol; **D** - Astrócitos em MCCEC a 100% expostos a 20 μ M de catecol. **E** - Intensidade de fluorescência da imunomarcagem para GSTpi por astrócitos. Comparações entre grupos foram feitas com o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Significância estatística (*) $P < 0,01$) comparada com o grupo controle. Imagens obtidas por microscopia confocal. Barra equivalente a 50,1 μ m.

4.3.4 Expressão da isoforma UGT1A6 em CEC e Astrócitos

Para avaliar a interação entre CEC e astrócitos sobre a expressão de enzimas envolvidas na detoxificação de xenobióticos, a exemplo da isoforma UGT1A6, as células foram cultivadas em meio DMEM HAM F12 e em MCAst (50% e 100%) contendo catecol a 3000 μ M (em CEC) e 20 μ M (em astrócitos).

Nas análises feitas por citometria de fluxo, os dados revelaram que o catecol a 3000 μ M não interferiu na frequência de CEC imunomarcadas para UGT1A6 (**Fig. 36C**), porém

diminuiu a média de intensidade de fluorescência destas células nas condições testadas (**Fig. 36B**). Nas CEC cultivadas em meio DMEM HAM F12 (controle) a frequência foi de 34% de células imunomarcadas para UGT1A6 (**Fig. 36B**) e média de fluorescência de 7,427 (**Fig. 36B**). Células expostas a 3000 μM catecol em DMEM HAM F12 apresentaram uma frequência de 31,4% (**Fig. 36C**) e média de intensidade de fluorescência de 2,214 (**Fig. 36B**). Não se observou diferença significativa na frequência de células imunomarcadas para UGT1A6 entre as CEC expostas ao catecol em meio em MCAst 50 e 100% quando comparadas com células expostas a catecol em DMEM HAM F12 (**Fig. 36C**). As médias de intensidade de fluorescência nas células expostas ao catecol em MCAst 50% e MCAst 100% foram de 2,920 e 4,661, respectivamente (**Fig. 36B**).

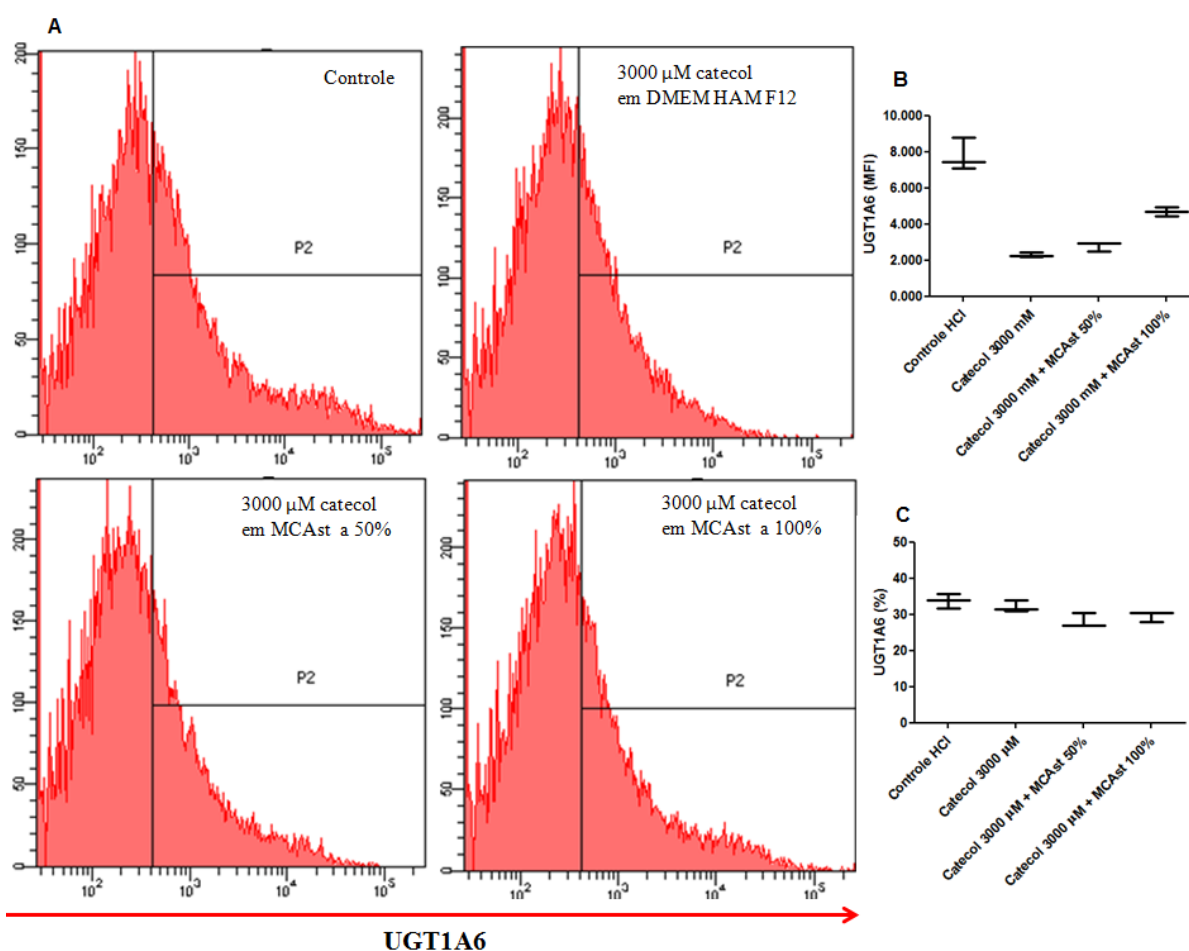


Figura 36. Imunomarcção de UGT1A6 em CEC moduladas com meio condicionado por astrócitos e expostas a 3000 μM de catecol por 72 h. **A** - Histogramas dos grupos de tratamento: CEC em DMEM HAM F12 com 5×10^{-4} M de HCl (controle); CEC em meio DMEM HAM F12 e catecol; CEC em MCAst 50% (v/v) e catecol; CEC em MCAst 100% e catecol. **B** - Média da intensidade de fluorescência (MFI) da UGT1A6. **C** - Porcentagem das CEC imunomarcadas para UGT1A6. Análise por citometria de fluxo. Comparações entre grupos foram feitas com o teste não paramétrico de *Mann-Whitney* ($n = 3$).

Na etapa seguinte do trabalho foi quantificada a UGT1A6 nos astrócitos expostos a 20 μM de catecol e modulados com meio condicionado por CEC, nas proporções de 50 e 100%, por 72 h. Inicialmente foi realizada a imunocitoquímica. Nas imagens obtidas por microscopia confocal observou-se astrócitos em meio DMEM HAM F12 com imunomarcção distribuída de modo homogêneo para UGT1A6 (**Fig. 37A**). Quando as CEC foram tratadas com catecol, visualmente é possível observar lesões de DNA, pontes cromossômicas (setas amarela) e micronúcleos (setas brancas) em algumas células, o que não observado no grupo controle, com forte marcação de UGT1A6 no citoplasma (**Fig. 37B**). No grupo tratado com 20 μM de catecol em MCCEC a 50 e 100% observa-se aparente citoproteção e fluorescência mais homogênea (**Fig. 37C e D**). Nas medidas da intensidade de fluorescência não foi observada diferença estatística entre os grupos.

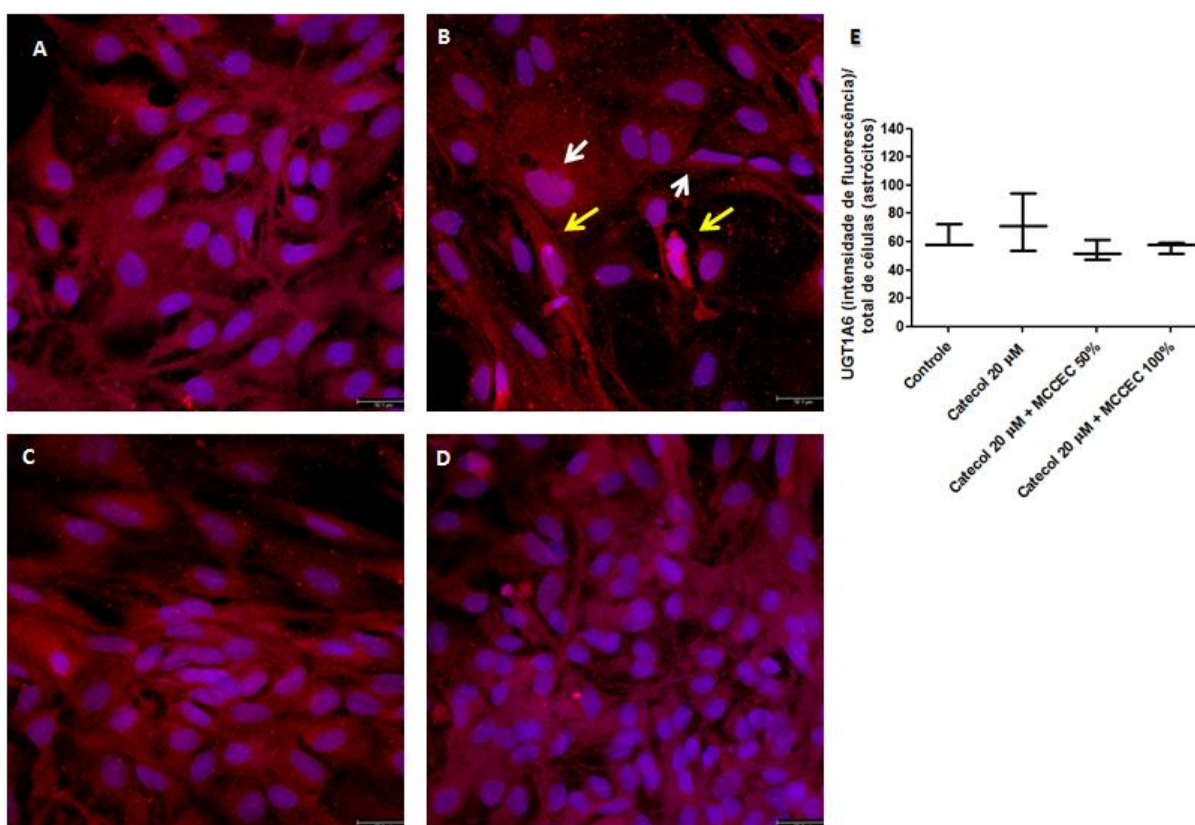


Figura 37. Imunomarcção para UGT1A em astrócitos modulados por meio condicionados por CEC e expostos a 20 μM de catecol por 72 h. **A** - Astrócitos em meio DMEM HAM F12 com 5×10^{-4} M de HCl (controle); **B** - Astrócitos em meio DMEM HAM F12 e 20 μM de catecol; **C** - Astrócitos em MCCEC a 50% (v/v) e 20 μM de catecol; **D** - Astrócitos em MCCEC 100% e 20 μM de catecol; **E** - Intensidade de fluorescência (UGT1A6) por número de astrócitos. Comparações entre grupos foram feitas com o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Dados obtidos em triplicata. Setas amarelas (\rightarrow) apontando pontes cromossômicas e setas brancas apontando micronúcleos. Microscopia confocal. Barra equivalente a 50,1 μm .

A proteção dos astrócitos pelo meio condicionado de CEC, frente ao dano pelo catecol, não pareceu ter a influência da ação de UGT1A6. Para certificar se a modulação do MCCEC influenciava na expressão desta enzima, foi feita a quantificação por *Western blotting*, utilizando β -actina como proteína controle. Os astrócitos tratados com 20 μ M de catecol na presença de MCCEC a 100% apresentaram aumento na expressão de UGT1A6 quando comparados com as células controle (**Fig. 38 A e B**).

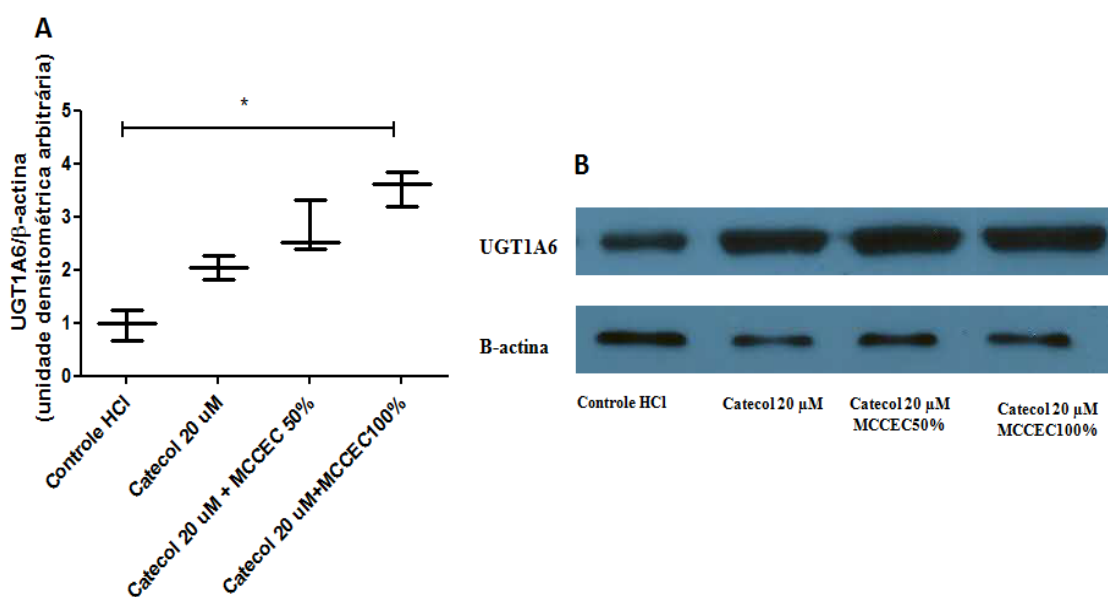


Figura 38. Expressão de UGT1A6 em astrócitos. **A:** Astrócitos em meio DMEM HAM F12 com 5×10^{-4} M de HCl (controle); Astrócitos em meio DMEMHAM F12 e 20 μ M de catecol por 72 h; Astrócitos em MCCEC a 50% (v/v) e 20 μ M de catecol; Astrócitos em MCCEC 100% tratados com 20 μ M de catecol; **B,** Imagem do *western blotting* mostrando a expressão da UGT1A6 de astrócitos na exposição ao catecol e modulados por CEC (5 μ g de proteínas/poço). A β -actina foi utilizada como proteína controle da deposição. Comparações entre grupos foram feitas com o teste não paramétrico de *Mann-Whitney*. Os dados representam a mediana de cada grupo, obtida em testes independentes, n = 3. Significância estatística (*) p < 0,01 comparada com o controle.

4.3.5 Expressão de glicoproteína P

Os metabólitos gerados no meio intracelular, quando não possuem função orgânica, são bombeados para fora das células por proteínas como a gp-P.

Para entender a interação entre CEC e astrócitos frente ao dano pelo catecol, foi feita análise da imunomarcagem de gp-P nas CEC expostas a 3000 μ M de catecol. Os dados obtidos nas análises por citometria de fluxo revelaram que o catecol não alterou a expressão de gp-P nas CEC (**Fig. 39A, B e C**). Os dados evidenciam a frequência de 22% de CEC imunomarcadas por gp-P no grupo controle (CEC em DMEM HAM F12) e media da

intensidade de fluorescência de 3,357 (**Fig. 39B e C**). As CEC tratadas com catecol apresentaram frequência de imunomarcção para gp-P de 24% e média de intensidade de fluorescência de 2,997. Observou-se diminuição significativa na frequência de CEC imunomarcadas por gp-P, após exposição a 3000 μ M de catecol em MCAst 50% (v/v), quando comparadas com as células expostas a catecol em DMEM HAM F12 (**Fig. 39B**), com média de intensidade de fluorescência de 4,142 (**Fig. 39C**). O catecol em MCAst 100% não alterou a frequência de células imunomarcadas para gp-P nas CEC coparada com as células expostas ao catecol em DMEM HAM F12 (**Fig. 39B**), média de intensidade de fluorescência 2,181 (**Fig. 39B**).

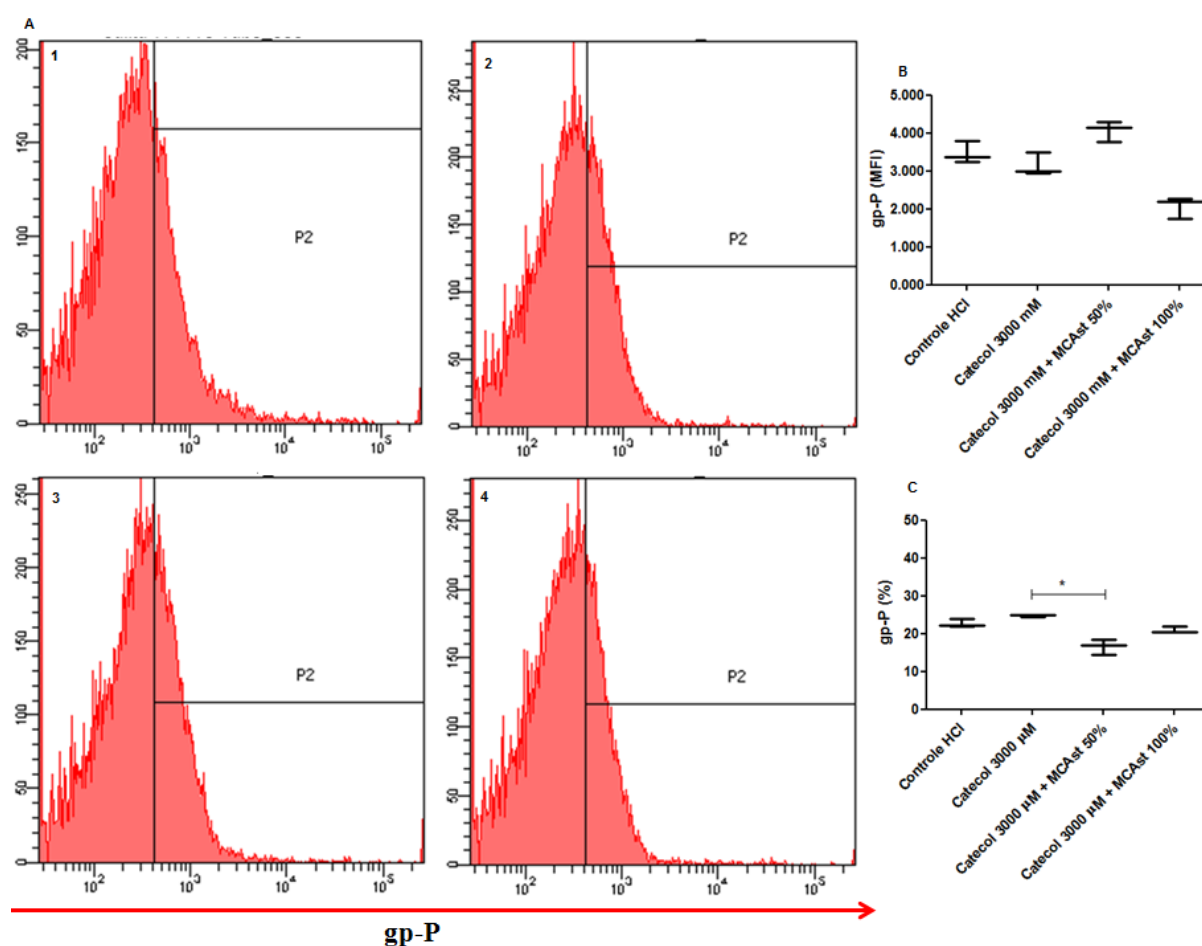


Figura 39. Expressão de gp-P em CEC moduladas com meio condicionado por astrócitos expostos a 3000 μ M de catecol por 72 h. **A** - Histogramas dos grupos de tratamento: 1- CEC em DMEM HAM F12 com 5×10^{-4} M de HCl (controle); 2 - CEC em meio DMEM HAM F12 e catecol; 3 - CEC em MCAst 50% (v/v) e de catecol; 4 - CEC em MCAst 100% e 3000 μ M de catecol. **B** - Média de intensidade de fluorescência da gp-P; **C** - Frequência de células imunomarcadas para gp-P. Análise por citometria de fluxo. Teste realizado em triplicata, análise de distribuição não normal, teste de Mann-Whitney. Significância estatística mostrada (*) p < 0,01.

No intuito de confirmar os dados, foi realizada imunocitoquímica para gp-P nas CEC, desta vez verificando também a influência do meio condicionado por astrócitos na ausência do catecol. Observa-se pouca fluorescência nas células do controle (**Fig. 40A**). O meio condicionado por astrócitos 50 e 100% aumentaram discretamente a fluorescência resultante da imunomarcação para gp-P (**Fig. 40B e C**). O catecol dissolvido em DMEM HAM F12 parece não influenciar a expressão de gp-P (**Fig. 40D**) na dose testada, pois a fluorescência emitida não é diferente da imagem de CEC na condição controle. Porém nas imagens obtidas dos células tratados com catecol com MCAst a 50 e 100%, observa-se aumento da cor fluorescente nas duas condições testadas (**Fig. 40E e F**).

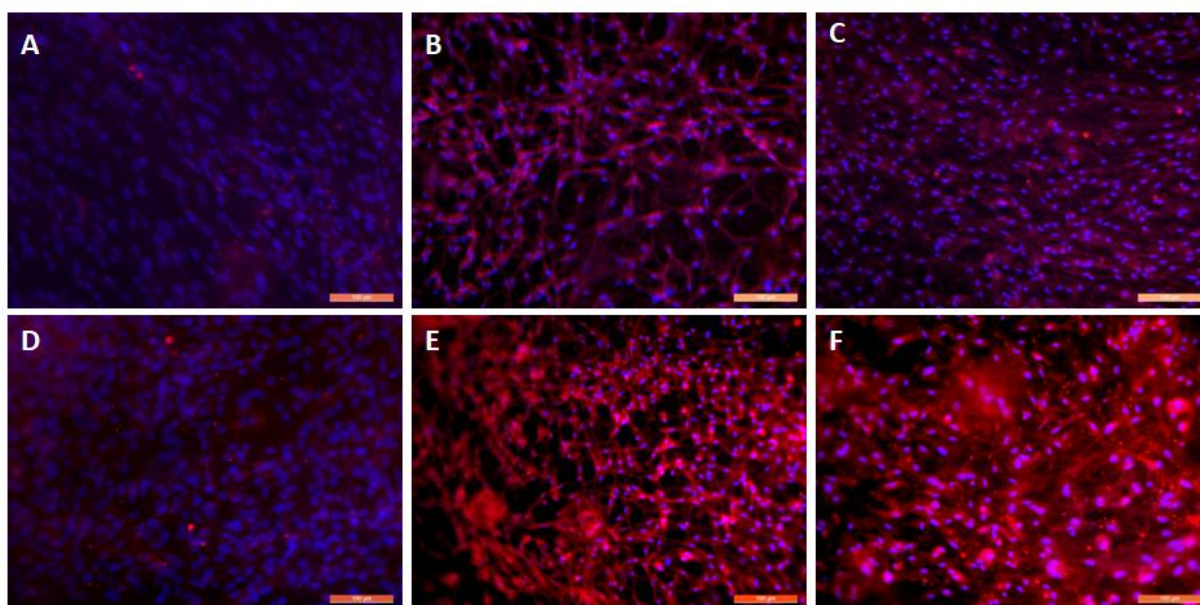


Figura 40. Modulação de gp-P em CEC expostas a 3000 μM de catecol em meio condicionado por astrócitos, por 72 h. **A** - CEC em DMEM HAM F12; **B**- CEC em MCAst a 50%; **C** – CEC em MCAst a 100%; **D** – CEC e catecol em DMEM HAM F12; **E** – CEC em MCAst a 50% e catecol; **F** – CEC em McAst a 100% e catecol. Microscopia de fluorescência. Barra equivalente a 100 μm .

O papel do glioma sobre a transcrição de gp-P nas células endoteliais também foi testado. O meio condicionado por C6 na proporção de 50 e 100% foi capaz de induzir a expressão de gp-P, na exposição por 72 h. Observa-se que houve aumento na fluorescência emitida pelas CEC moduladas com MCC6 a 50 e 100% (**Fig. 41**), quando comparadas com as células cultivadas em meio DMEM HAM F12 (controle).

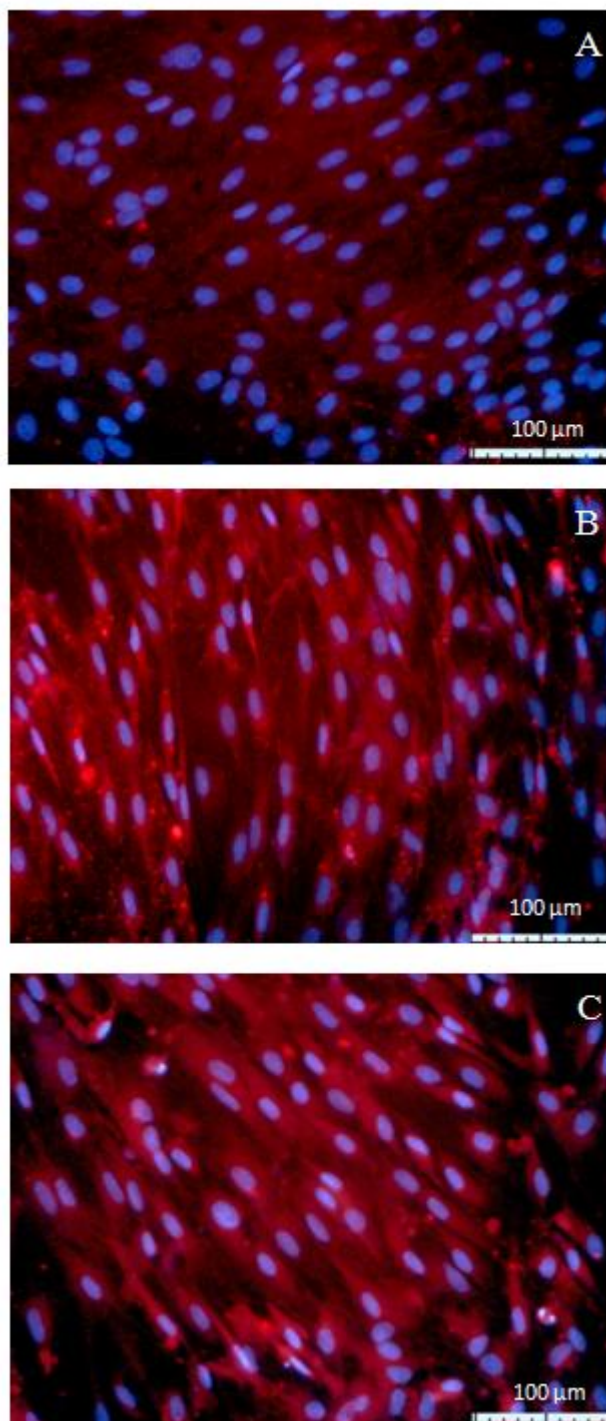


Figura 41. Imunocitoquímica para gp-P em CEC modulada com MCC6. **A** – CEC em DMEM HAM F12; **B** – CEC em MCC6 50% (v/v); **C** – CEC em MCC6 100%; Modulação por 72 h. Barra equivalente a 100 μm.

Para entender a modulação de CEC sobre astrócitos foi importante também verificar a expressão de gp-P em astrócitos expostos ao catecol, análises por citometria de fluxo (**Fig 42A, B e C**). A porcentagem mediana foi de 39% (variação: 35,2 - 42,1%) de células imunomarcada para gp-P do grupo controle (astrócitos em meio DMEM HAM F12) (**Fig.**

42B) e e média de intensidade de fluorescência de 2,703. Os demais grupos não apresentaram diferença significativa na porcentagem de células imunomarcadas para gp-P, quando comparadas com o controle (**Fig. 42B**).

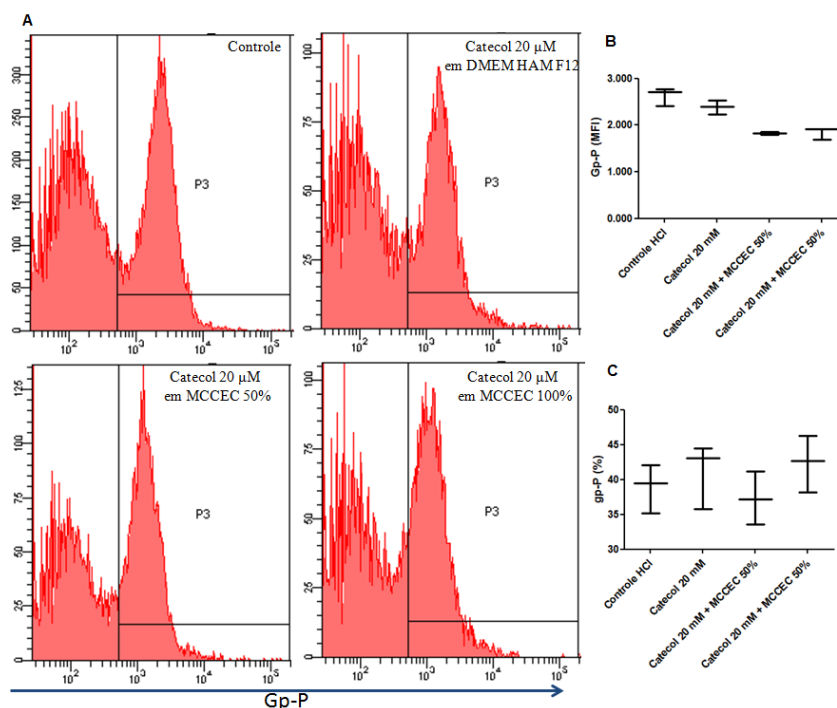


Figura 42. Imunomarcção de gp-P em astrócitos expostos a 20 μM de catecol. **A** - Histogramas dos grupos de tratamento: astrócitos em meio DMEM HAM F12 com 5×10^{-4} M de HCl (controle); astrócitos em meio DMEM HAM F12 e catecol; Astrócitos em MCCEC 50% (v/v) e catecol; Astrócitos em MCCEC100% e catecol em MCCEC100%. **B** - Média de intensidade de fluorescência da gp-P; **C**- Porcentagem dos astrócitos Imunomarcados para gp-P. Análise por citometria de fluxo. Teste realizado em triplicata, análise de distribuição não normal, teste de *Mann-Whitney*.

Foi então realizado imunocitoquímica para observar melhor a imunofluorescência, desta vez por imagem, mantendo o mesmo padrão de exposição ao catecol (DMEM HAM F12 e MCCEC 50 e 100%) e análise por microscopia confocal. Nas imagens foi possível observar que astrócitos (controle) apresentam baixa intensidade de fluorescência resultante da imunomarcção da gp-P (**Fig. 43 A**), ou seja, estas células expressam poucas proteínas de efluxo dessa isoforma. A fluorescência aparece mais intensa nos astrócitos expostos a 20 μM de catecol em meio DMEM HAM F12 (**Fig. 43B**), porém não observa diferença estatística na intensidade de fluorescência mostrada (**Fig. 43E**), quando comparada com o controle. Nos campos correspondentes às células expostas ao catecol e moduladas com MCCEC (50% e 100%) observa-se aumento de fluorescência emitida, com aparente citoproteção (**Fig. 43C** e

D) No entanto, só houve aumento significativo na intensidade de fluorescência nos astrócitos expostos ao catecol na presença de MCCEC a 100% (**Fig. 43E**), quando comparadas com o grupo de células expostas ao catecol em meio DMEM HAM F12.

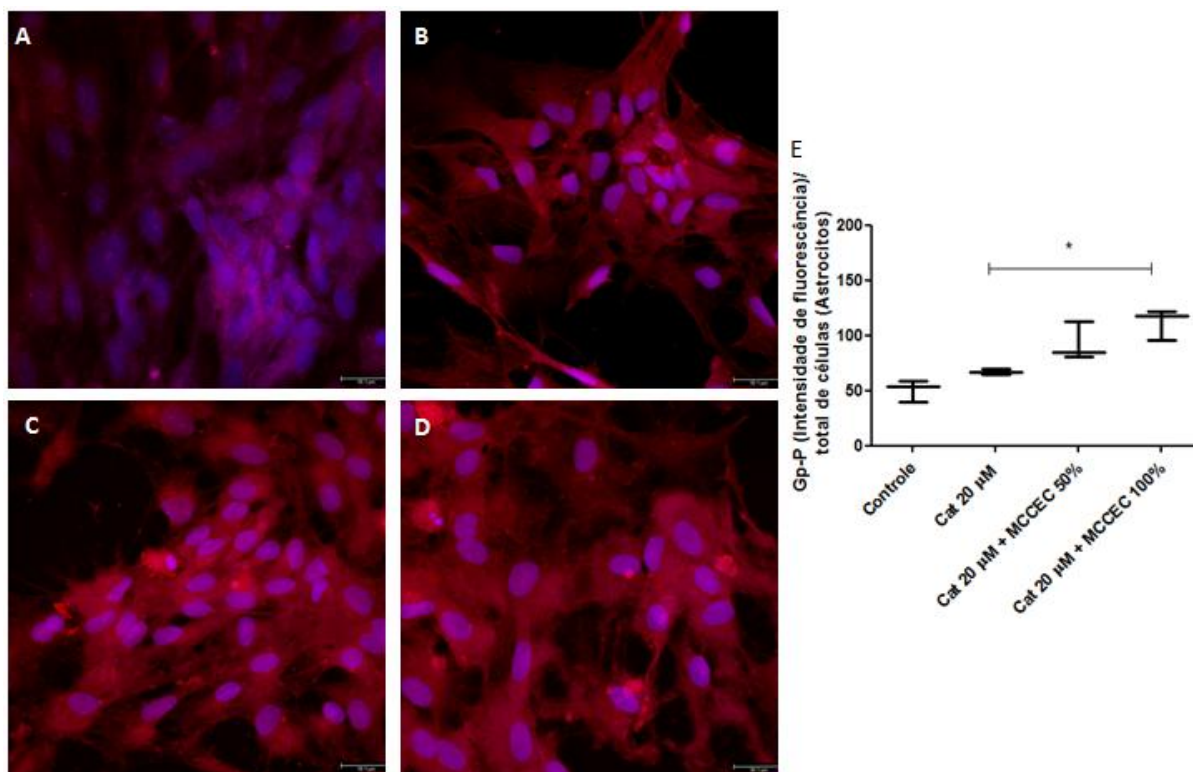


Figura 43. Imunomarcacão para gp-P em astrócitos induzida por catecol: **A** - Astrócitos em meio DMEM HAM F12 com 5×10^{-4} M de HCl; **B** - Astrócitos em meio DMEM HAM F12 com 20 μ M de catecol; **C** - Astrócitos em MCCEC 50% (v/v) com 20 μ M de catecol; **D** - Astrócitos em MCCEC100% com 20 μ M de catecol; **E** - Intensidade de fluorescência (gp-P) por número de células astrócitos - Análise por microscopia confocal. Dados obtidos em triplicata, distribuição não normal, teste de Mann-Whitney. Significância estatística (*) $p < 0.01$.

4.4 INTERAÇÃO PARÁCRINA ENTRE CEC E ASTRÓCITOS E ENTRE GL-15 E CEC NA ESPOLIAÇÃO DE GSH INDUZIDA PELO CATECOL

Um dos sistemas detoxificadores mais importante da BHE no estresse oxidativo é comandado pelo tripeptídeo GSH que atua como substrato para enzimas antioxidantes e detoxificadoras, na proteção dos astrócitos e neurônios contra espécies reativas tóxicas.

Para avaliar a espoliação de GSH pelo catecol, na presença do meio condicionado por astrócitos, as culturas de CEC foram expostas a 3000 μ M de catecol em MCAst 50% e MCAst 100% por 72 h. Após exposição, foi realizada a análise do conteúdo intracelular do

GSH destas células por microscópio de fluorescência. As imagens possibilitaram a visualização da fluorescência azul emitida pelo MCB complexado ao GSH nas células controle, CEC em DMEM HAM F12 com 5×10^{-4} M de HCl (**Fig. 44A**). Nas CEC tratadas com 1 mM de BSO, espoliante de GSH já conhecido, observou-se a diminuição na intensidade da fluorescência azul no controle positivo do teste, (**Fig. 44B**). Quando estas CEC foram expostas a 3000 μ M de catecol houve aumento na espoliação de GSH, visualizada pela diminuição do azul fluorescente (**Fig. 44C**). A espoliação de GSH pelo catecol foi diminuída na presença do MCAst 50% (**Fig.44D**) e MCAst 100 % (**Fig. 44E**) confirmada pelo aumento da fluorescência azul resultante do complexo MCB-GSH. No entanto, na presença de MCAst a 100%, houve maior proteção à espoliação do GSH induzida pelo catecol, visto que a intensidade de fluorescência aproxima da intensidade do controle (**Fig. 44E**).

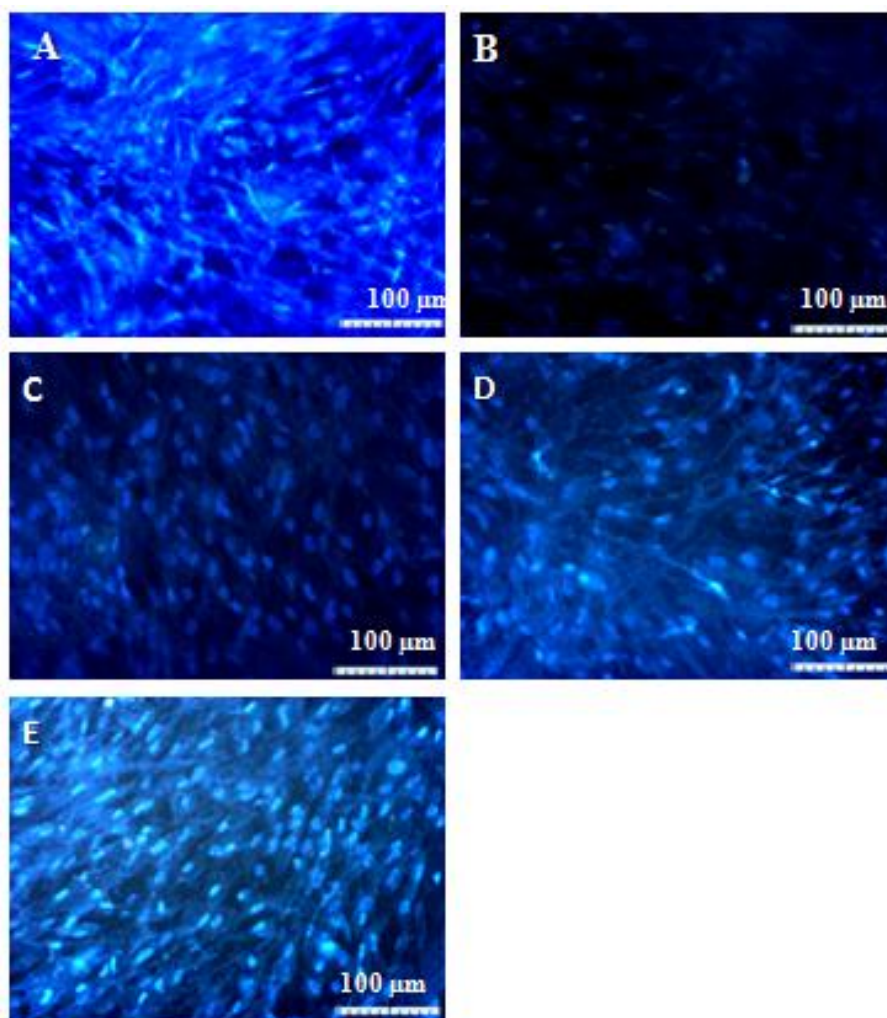


Figura 44. Espoliação de GSH pelo catecol a 3000 μ M, por 72 h, em CEC. **A** - CEC em meio DMEM HAM F12 com 5×10^{-4} M de HCl (controle); **B** - CEC em meio DMEM HAM F12 e 1 mM de BSO; **C**- CEC exposta a catecol em meio DMEM HAM F12; **D** - CEC em MCAst a 50% (v/v) e catecol; **E** - CEC em MCAst a 100% e catecol. As imagens foram obtidas por microscopia de fluorescência e são representativas de diferentes campos da placa. Barra equivalente a 100 μ m.

O meio condicionado por CEC protegeu as células GL-15 da espoliação do GSH induzida pelo catecol. Observou-se a fluorescência azul de intensidade variada nas células do controle (negativo) (**Fig. 45A**). Houve diminuição da intensidade de fluorescência no controle positivo, espoliação de GSH induzida pelo BSO (**Fig. 45B**); intensidade de fluorescência e celularidade bastante diminuídas no grupo tratado com 600 μM de catecol (**Fig. 45C**). Nas imagens dos grupos expostos ao catecol e modulados com MCCEC 50 e 100% e catecol 600 μM observou-se aumento na fluorescência resultante do complexo MCB-GSH, quando comparada com o grupo de células expostas ao catecol sem o meio condicionado.

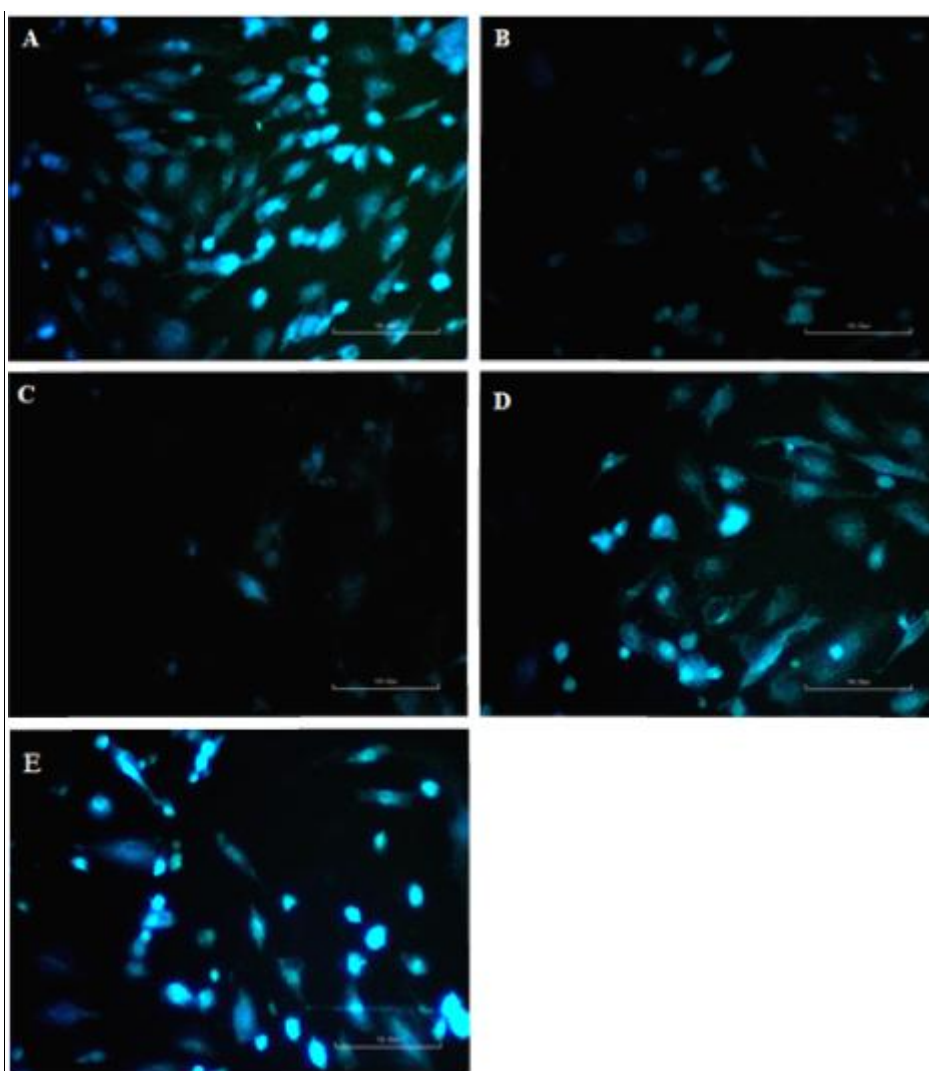


Figura 45. Espoliação de GSH pelo catecol a 600 μM por 72 h em GL-15 (teste MCB). **A** - Células GL-15 em meio DMEM HAM F12 com 5×10^{-4} M de HCl (controle negativo); **B** - Células GL-15 expostas a 1 mM de BSO em meio DMEM HAM F12 (controle positivo); **C** - GL-15 expostas a catecol em meio DMEM HAM F12; **D** - GL-15 expostas a catecol em MCCEC 50% (v/v); **E** - As GL-15 expostas a catecol em MCCEC a 100%. As imagens obtidas por microscopia de fluorescência são representativas de diferentes campos da placa. A barra corresponde a 100 μm .

Os dados acima apontam o meio condicionado por CEC, nas diferentes concentrações, como citoprotetor da espoliação de GSH induzida pelo catecol nas GL-15. Para verificar a interação parácrica entre estas células, em cocultivo, as GL-15 foram semeadas no fundo da placa, abaixo do inserto contendo CEC, onde foi adicionado 600 μM de catecol. Antes de juntar as culturas das células, o fechamento da monocamada de CEC foi acompanhado pelas medidas de TEER (624 Ω/cm^2 no inserto contendo CEC do controle e 654 Ω/cm^2 no inserto do grupo tratado). O catecol ou BSO foi adicionado na porção luminal do inserto, sobre a monocamada endotelial.

Nas imagens obtidas por microscopia, foi possível visualizar fluorescência azul intensa nas GL-15 cultivadas em DMEM HAM F12 com 5×10^{-4} M de HCl (**Fig. 46A**). Houve diminuição da fluorescência nas células GL-15 do grupo controle positivo (BSO adicionado na porção luminal do inserto com filme de colágeno, sem CEC) (**Fig. 46B**). Observou-se espoliação de GSH e diminuição da celularidade nas GL-15 expostas a 600 μM de catecol (adicionado sobre inserto com filme de colágeno, sem CEC) (**Fig. 46C**). A espoliação de GSH pelo catecol em GL-15 foi protegida na presença de CEC, (**Fig. 46D**), pois observou-se na imagem destas células fluorescência azul similar ao controle.

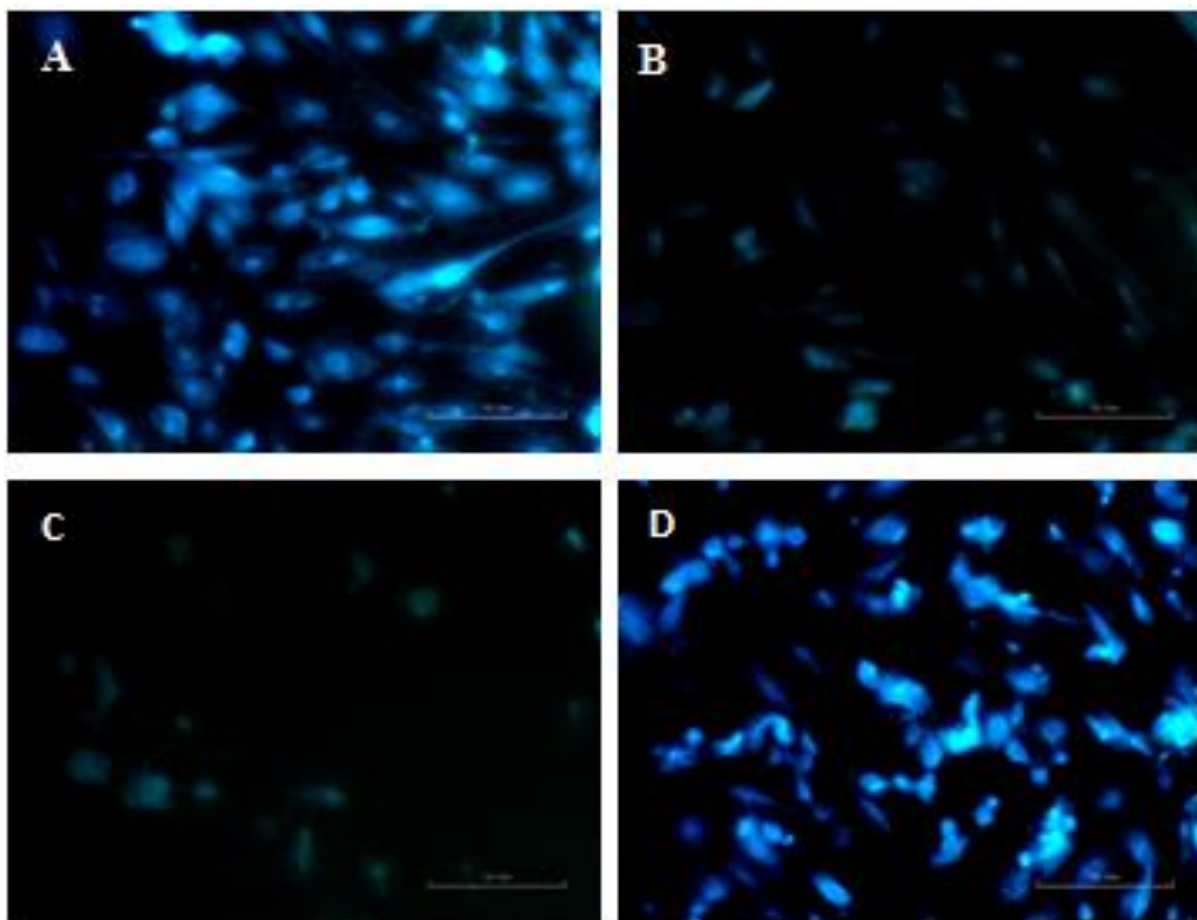


Figura 46. Espoliação do GSH pelo catecol em GL15 na interação parácrina com CEC em cocultivo. **A** - GL15 em meio DMEM HAM F12 com 5×10^{-4} de M HCl (controle) na presença de CEC; **B** - GL-15 expostas a 1 mM de BSO, inserto sem CEC; **C** - GL-15 expostas a 600 μ M de catecol, inserto sem CEC; **D** - GL-15 expostas a 600 μ M de catecol, inserto com CEC. As imagens foram obtidas por microscopia de fluorescência e são representativas de diferentes campos. A barra corresponde a 100 μ m.

4.5 INTERAÇÃO ENTRE CEC E ASTRÓCITOS MEDIANTE A GENOTOXICIDADE DO CATECOL

Ao avaliar a genotoxicidade induzida pelo catecol em CEC, nas imagens obtidas por microscopia de fluorescência, observa-se núcleos preservados, esférico e íntegro, na condição controle negativo (**Fig. 47A**). Nas CEC expostas a Luz UV (controle positivo), observa-se fragmentação nuclear resultando na formação de cometa (seta branca) e presença de pontes cromossômicas (seta amarela) (**Fig. 47B**). No entanto, quando as CEC foram expostas a 3000 μ M de catecol em meio DMEM HAM F12, apresentaram núcleos picnóticos e fragmentados (**Fig. 47C**). Nas imagens dos grupos de células expostas ao catecol na presença do MCAst 50% (**Fig. 47D**) e 100% (**Fig. 47E**) foram observados aglomerados nucleares (apontados pelas setas vermelhas) em vários pontos da lâmina, com núcleos picnóticos.

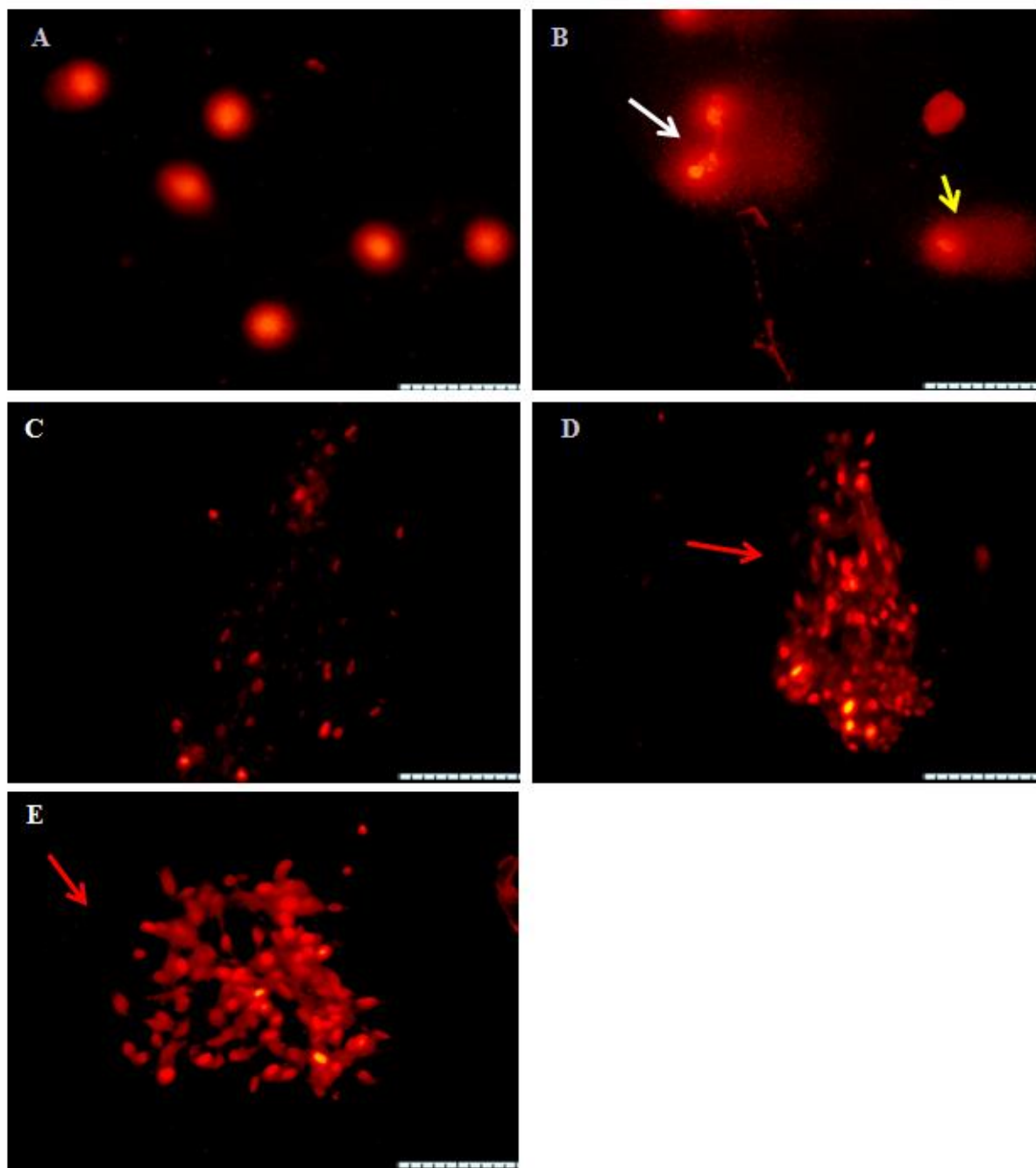


Figura 47. Fragmentação nuclear em CEC expostas ao catecol. Núcleos marcados com Gel *red* (teste de cometa). **A** - CEC em DMEM HAM F12 com 5×10^{-4} M de HCl (controle); **B** - CEC em meio DMEM HAM F12 expostas a luz UV por 1 h (controle positivo); **C** - CEC em meio DMEM HAM F12 e 3000 μ M de catecol; **D** - CEC em MCAst 50% (v/v) e 3000 μ M de catecol; **E** - CEC em MCAst 100% e 3000 μ M de catecol. Exposição por 72 h. Imagens obtidas por microscopia de fluorescência. Seta branca mostra ponte cromossômica; seta vermelha aponta aglomerados nucleares e seta amarela mostra formação de cometa. Barra equivalente a 100 μ m.

Os aglomerados celulares apontados nas imagens de CEC em MCAst, sugerem modulação do meio condicionado de astrócitos sobre as proteínas de junção, mediante o dano pelo catecol, dificultando a dissociação das células durante o teste. A abertura osmótica prévia

da monocamada de CEC, antes de iniciar o teste de cometa, aponta uma opção para abertura da monocamada e reduzir a formação de aglomerados celulares.

Para avaliar a interação parácrina entre astrócitos e CEC na genotoxicidade induzida pelo catecol em astrócitos foi utilizado o meio condicionado por CEC, nas proporções de 50 e 100%. As imagens obtidas por microscopia de fluorescência mostraram lesões de DNA caracterizadas pela formação de cometas de variados comprimentos e padrões, nos astrócitos cultivados em DMEM HAM F12 submetidos a luz UV por 1 h (controle positivo de lesão física) (**Fig. 48A**) e a 50 μM de peróxido de hidrogênio (controle positivo de lesão química) (**Fig. 48B**). Quando os astrócitos foram tratados com H_2O_2 a frequência de danos no material genômico foi de 98% (**Tabela 5**). No grupo de astrócitos expostos a luz UV houve fragmentação nuclear em todos os núcleos analisados, com lesões classificadas como 2, 3 e 4, sendo que 26% destes foram classificados como danos máximos no DNA (**Tabela 5**).

Nos astrócitos cultivados em DMEM HAM F12 com 5×10^{-4} M de HCl (controle negativo), os núcleos mantiveram-se esféricos e íntegros (**Fig. 48C**). No grupo controle negativo observou-se frequência de 99% de núcleos normais (classe 0), apenas 1% de lesão grau 1 (**Tabela 5**).

Astrócitos expostos ao catecol em meio DMEM HAM F12 apresentaram seus núcleos fragmentados em forma de cometas (**Fig. 48D**), com formação de lesões de DNA variadas em 93% dos núcleos (**Tabela 5**). O grupo de astrócitos expostos ao catecol, apresentou 7% de núcleos íntegros, 93% de lesões de DNA, destas 2% de dano máximo (**Tabela 5**).

Nos astrócitos expostos ao catecol em MCCEC 50% foi observado nos núcleos um padrão de imagem semelhante ao controle (células em DMEM HAM F12) com núcleos íntegros (**Fig. 48E**) e 30 % de lesões leves, classificadas como classe 1 (**Tabela 5**).

No grupo de células expostas ao catecol, na presença de MCCEC a 100% foi visualizado genoproteção parcial (**Fig. 48F**), com maior proporção de lesões leves a moderadas (classe 1 e 2) e 38% de núcleos normais (**Tabela 5**).

Ao analisar a porcentagem de fragmentação do DNA, os dados revelaram mediana de 88.9 % (variação: 1,20 - 98,43%) na cauda dos cometas do grupo de astrócitos expostos a 40 μM de catecol (**Fig. 48**). O MCCEC na proporção de 50% promoveu genoproteção, diminuindo a porcentagem de DNA fragmentado pelas quinonas do catecol, apresentando uma mediana de 3,25% (variação: 0,0 - 5.49%) com diferença significativa ($P < 0,0001$) quando comparada com o grupo exposto ao catecol sem o meio condicionado.

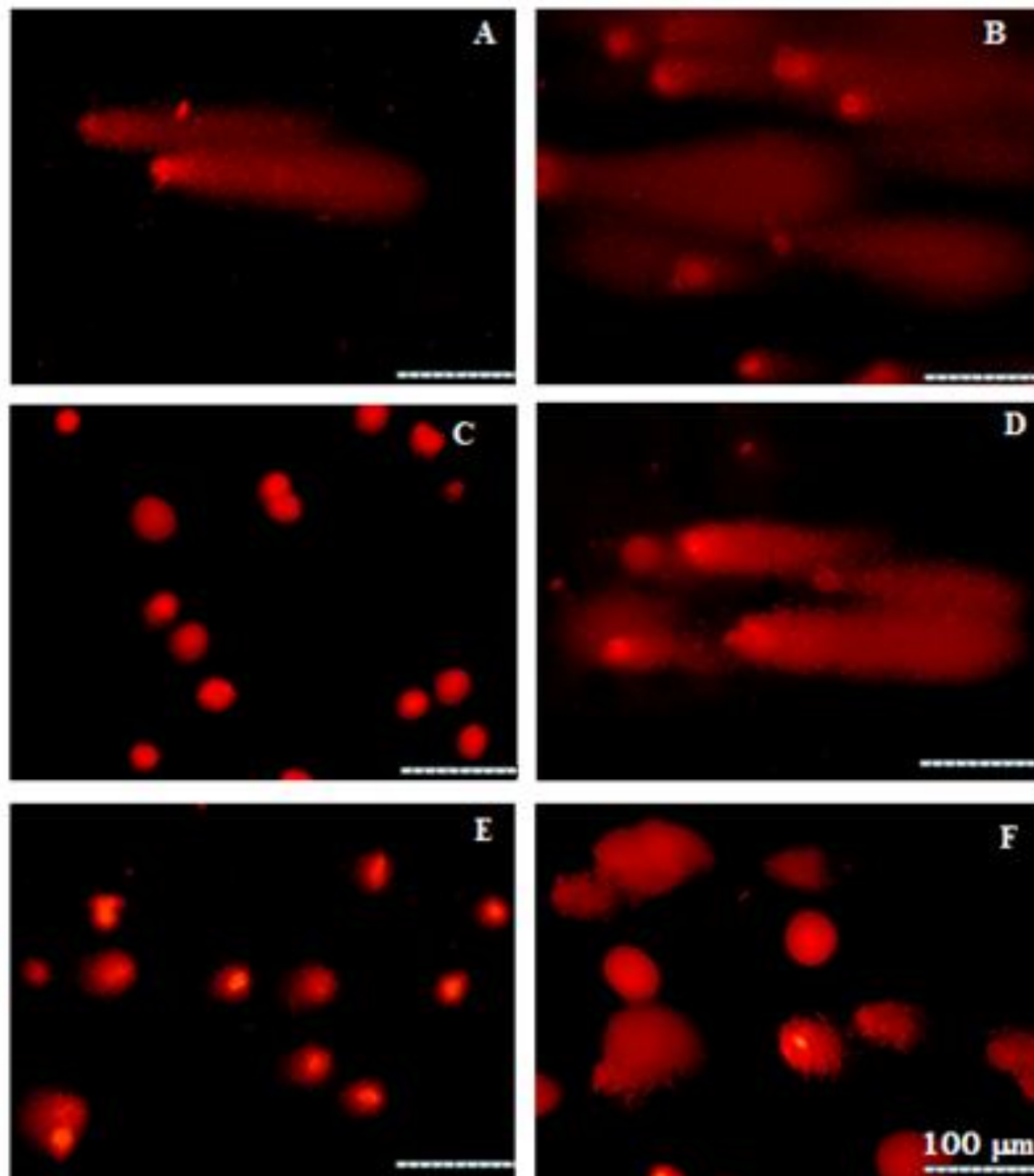


Figura 48. Danos em DNA de astrócitos expostas ao catecol. Núcleos marcados com Gel *red* (teste de cometa). **A** - Astrócitos em meio DMEM HAM F12 expostos a luz UV por 1 h (controle positivo); **B** - Astrócitos em meio DMEM HAM F12 expostos a 50 µM de H₂O₂ por 1 h (controle positivo); **C** Astrócitos em DMEM HAM F12 com 5×10^{-4} M de HCl (controle); **D** - Astrócitos em meio DMEM HAM F12 expostos a 40 µM de catecol; **E** - Astrócitos em MCCEC 50% (v/v) expostos a 40 µM de catecol; **F** - Astrócitos em MCCEC 100% expostos a 40 µM de catecol. Exposição por 72 h. Imagens obtidas por microscopia de fluorescência. Barra equivalente a 100 µm.

Tabela 5: Classificação de danos no DNA conforme padrão de imagem dos cometas formados pelos núcleos.

	Grau de lesões de DNA (%)					
	Classe 0	Classe 1	Classe 2	Classe 3	Classe 4	Dano máximo
Controle UV			12	11	51	26
Controle H ₂ O ₂	2	2	15	5	25	51
Controle HCl	99	1				
Ast cat 40 uM	7	3	29	16	43	2
Ast cat 40 uM + MCCEC50%	70	30				
Ast cat 40 uM + MCCEC100%	38	24	22	5	0	11

A genoproteção foi parcial no grupo de astrócitos expostos ao catecol em MCCEC 100%, apresentando porcentagem mediana de DNA fragmentado na cauda de 33,05 (variação: 0,0 - 97,5%) (**Fig. 49**), significativa ($P < 0.0001$) quando comparada com o grupo tratado com catecol em DMEM HAM F12.

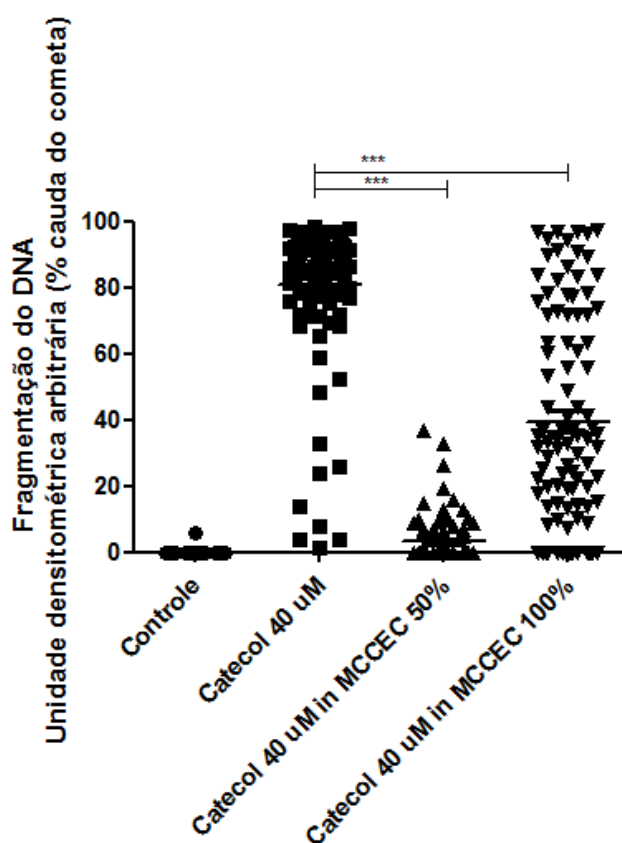


Figura 49. Genoproteção em astrócitos pelo MCCEC mediante danos pelo catecol. Astrócitos em DMEM HAM F12 com 5×10^{-4} M de HCl (controle); Astrócitos em meio DMEM HAM F12 expostos a 40 μ M de catecol; Astrócitos em MCCEC 50% (v/v) expostos a 40 μ M de catecol; Astrócitos em MCCEC 100% expostos a 40 μ M de catecol. Exposição por 72 h. Análise de distribuição não normal, teste de *Mann-Whitney*. Significância *** $P < 0.0001$ comparado com o grupo tratado com catecol em DMEM HAM F12.

O catecol é genotóxico aos astrócitos na concentração de 40 μM . O MCCEC (nas proporções de 50% (v/v) e 100%) promoveu genoproteção aos astrócitos contra o dano induzido pelo catecol, reduzindo tanto a frequência como a gravidade das lesões no DNA. No entanto, a genoproteção é mais evidenciada na presença do MCCEC 50% (v/v).

4.6 INTERAÇÃO PARÁCRINA ENTRE CEC E ASTRÓCITOS MODULANDO A BARREIRA FÍSICA

4.6.1 Astrócitos influenciam o fechamento da monocamada endotelial

A monocamada endotelial da BHE é fisicamente envolvida pelos pés terminais astrocíticos. É proposto que este contato seja crucial para desenvolver nestas células características próprias de BHE. Para verificar a interação parácrina entre estas células, as CEC foram mantidas em cultivo em insertos com MCAst nas proporções de 50% e 100%. As medidas do TEER em insertos com CEC em meio DMEM HAM F12/EGM apresentaram um aumento gradual e lento quando comparado aos grupos modulados pelo MCAst nas diferentes proporções (50 e 100%). O fechamento da monocamada de CEC em 50% de meio condicionado por astrócitos foi aumentando mais rápido, apresentando o maior TEER ($536 \Omega \times \text{cm}^2$) entre os grupos, no menor tempo (7 dias) (**Fig. 50**). Não se observa diferença estatística entre grupos.

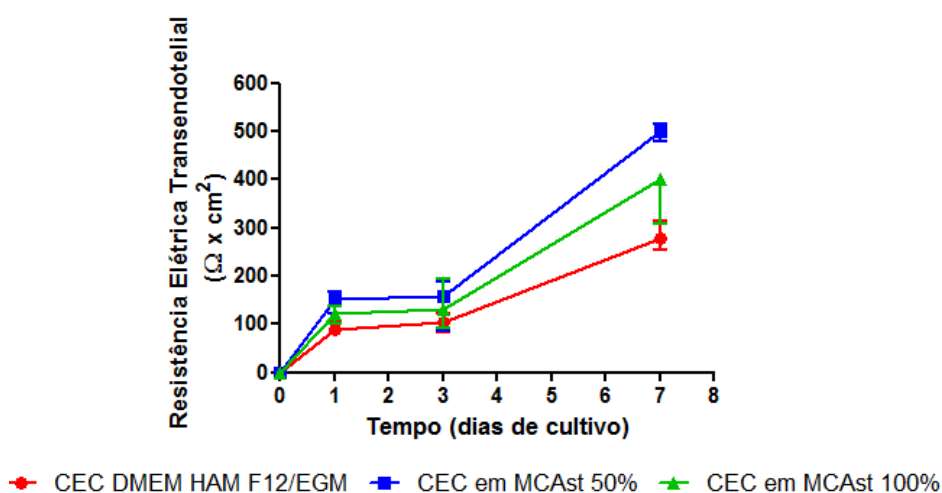


Figura 50. Medidas de TEER em CEC. ● CECs cultivadas em DMEM HAM F12/EGM; ■ CEC em MCAst 50% e ▲ CEC em MCAst 100%. n=3 experimentos de cultura de células independentes. Comparações entre dois grupos foram feitas com o teste não paramétrico de Mann-Whitney.

Observa-se que o fechamento da monocamada em 7 dias na presença do meio condicionado e conseqüentemente o aumento da TEER é conferido à monocamada endotelial sem a presença física dos astrócitos.

4.6.2 Catecol inibe a expressão de Fator VIII de vonWillebrand

O fator VIII é expresso por células endoteliais. Foram realizadas análises de imunocitoquímica em CEC após 72 h de exposição a 3000 μ M de catecol na presença e ausência do meio condicionado por astrócitos. As CEC cultivadas em DMEM HAM F12 apresentam marcação para fator VIII, com distribuição homogênea (**Fig. 51A**). Na presença do catecol, algumas células parecem retrair a membrana plasmática, permitindo poros na monocamada e a maioria das células apresenta diminuição na emissão da fluorescência resultante da imunomarcção do fator VIII (**Fig. 51B**) quando comparadas com as células nas condições do controle. O MCAst 50% reverte parcialmente o efeito do catecol, as células expressam fator VIII, porém com fluorescência menor que nas células da condição controle (**Fig. 51C**).

O MCAst na proporção de 100% diminui o efeito do catecol sobre a monocamada endotelial, com distribuição homogênea da expressão do Fator VIII e fluorescência diminuída quando comparada às células do controle (**Fig. 51D**).

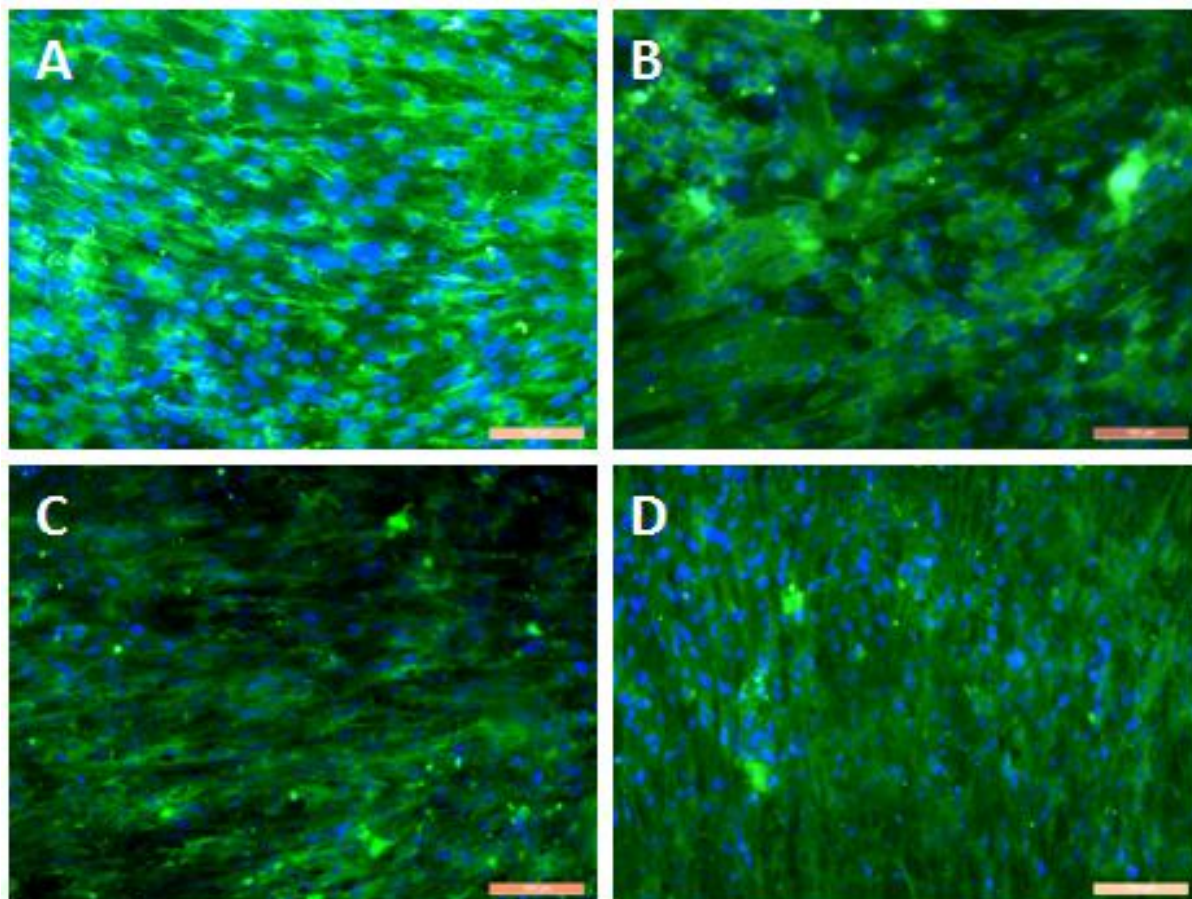


Figura 51. Imunocitoquímica para Fator VIII de vonWillebrand em CEC moduladas com MCAst e 3000 μ M de catecol por 72 h. A - CEC em DMEM HAM F12; B- CEC em DMEM HAM F12 e catecol; C – CEC em 50% em MCAst 50% e catecol; D – CEC em MCAst 100% e catecol.. Microscopia de fluorescência. Barra equivalente a 100 μ m.

4.6.3 Catecol induz a expressão de ocludina em CEC

A proteína ocludina tem importante função nas junções ocludentes da BHE. As células endoteliais foram cultivadas por 72 h expostas ao catecol na presença e ausência do MCAst nas proporções de 50 e 100%. As CEC cultivadas em DMEM HAM F12 apresentam expressão de ocludina diminuída na maioria das células (**Fig. 52A**). Na presença do catecol (**Fig. 52E**), observa-se aumento da cor fluorescente, resultante da imunomarcagem de ocludina, distribuição mais homogênea e maior junção entre as células na monocamada (**Fig. 52D**). O MCAst a 50% aumentou a expressão de ocludina em CEC (**Fig. 52B**) quando comparadas às células cultivadas em DMEM HAM F12. No entanto as CEC expostas a 3000 μ M de catecol em MCAst 50% aparecem reativas, retraídas e alongadas com alteração morfológica no arranjo celular que parece comprometer a permeabilidade da monocamada endotelial.

O MCAst a 100% parece aumentar a expressão de ocludina em CEC quando comparadas com as células cultivadas em DMEM HAM F12 (**Fig. 52C**). Na presença de 3000 μM de catecol, o MCAst 100 % diminuiu a reatividade e consequentemente o espaço entre as células, conferindo uma camada celular aumentada e mais homogênea, comparada com as células expostas ao catecol na presença do MCAst 50%.

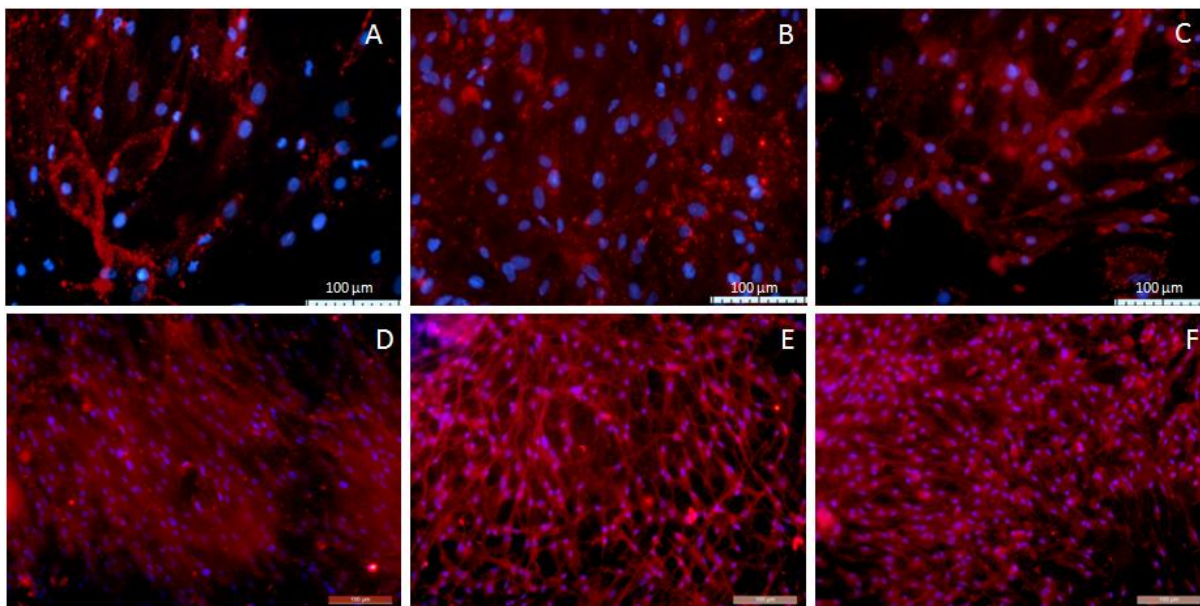


Figura 52. Catecol induz expressão de **occludina** em CEC após 72 h. **A** – CEC cultivadas em DMEM HAM F12; **B** – CEC cultivadas em MCAst 50% (v/v); **C** – CEC cultivadas em MCAst 100%; **D** – CEC em 3000 μM de catecol e DMEM HAM F12; **E** - CEC expostas a 3000 μM de catecol em MCAst 50% (v/v); **F** - CEC expostas a 3000 μM de catecol em MCAst 100%; Imunocitoquímica para ocludina (vermelho) e DAPI marcador de núcleos (azul). Microscopia de fluorescência. Barra equivalente a 100 μm .

4.7 FATORES NEUROTÓFICOS DE ASTRÓCITOS INFECTADOS COM *NEOSPORA* MODULANDO A RESPOSTA DAS CEC

4.7.1 Citocinas (TNF- α e IL-10) e neurotrofinas produzidas por astrócitos infectados com *Neospora*

Estudos realizados anteriormente no LabNq tornaram público que há aumento na expressão de citocinas em astrócitos infectados por *Nc* (Pinheiro et al., 2006a). Para investigar a influência de citocinas e neurotrofinas sobre as CEC, astrócitos foram infectados com *Nc*, da cepa *Nc*-Bahia, na proporção de 1:1. O meio de cultivo condicionado por estes

astrócitos foi adicionado sobre as CEC. O primeiro passo foi entender a expressão de citocinas por astrócitos, cultivados sem microglia, infectados por *Nc* por 72 h.

Primeiramente determinou-se a expressão do gene de β -actina que variou quando os astrócitos foram infectados com *Nc*, a infecção aumentou essa expressão de 2,4 vezes (**Fig. 53A**).

Também foi feita uma comparação entre o gene de HPRT de astrócitos infectados e não infectado por *Nc*. Em relação à expressão de HPRT, a infecção dos astrócitos pelo *Nc* diminuiu a sua expressão em 1,5 vezes (**Fig. 53B**). Considerando que a variação da expressão deste gene foi menor que a expressão do gene da outra proteína controle, a β -actina, optou-se pelo HPRT como controle interno.

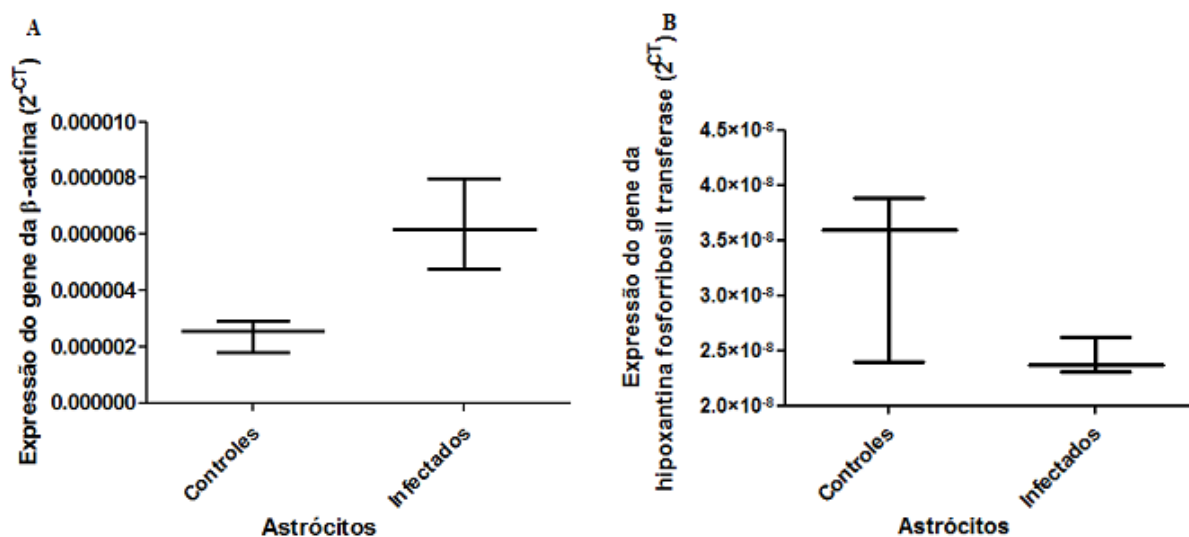


Figura 53. Expressão dos genes da β -actina e HPRT em astrócitos controles ou infectados por *Nc*. **A** - Expressão gênica da β -actina e **B** - Expressão gênica da HPRT, Análise por qRT-PCR.

Os dados quantificados por qRT-PCR nos astrócitos infectados mostrou um aumento na expressão do Fator de Necrose Tumoral (TNF), considerando o HPRT como controle interno, de apenas 3,9 vezes (**Fig. 54A**).

A expressão gênica da citocina IL-10 também foi avaliada e mostrou um aumento de 149 vezes considerando-se o gene de HPRT como controle (**Fig. 54B**).

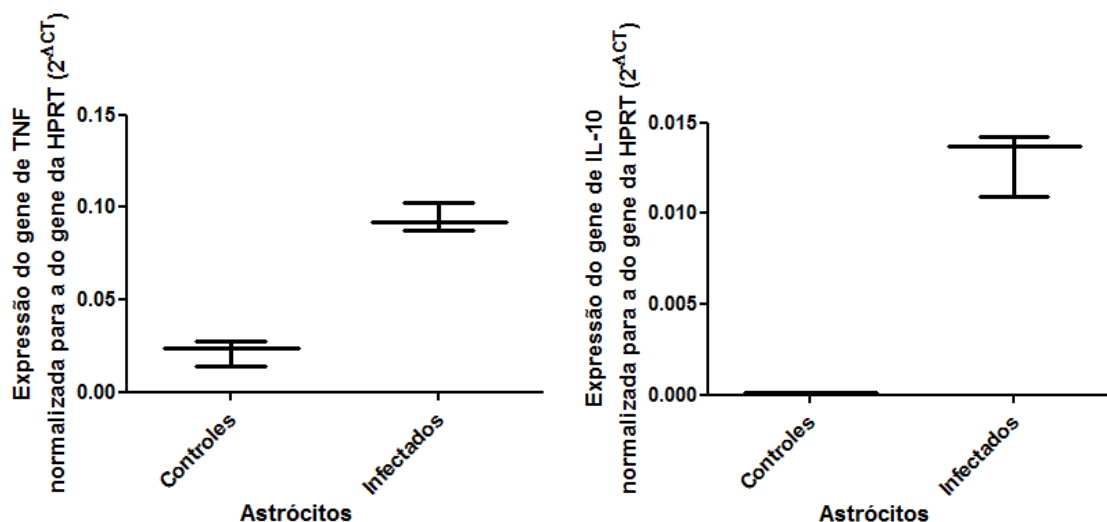


Figura 54. Expressão relativa de gene do TNF e IL-10 em astrócitos, normalizada para a expressão mediana do gene de HPRT em astrócitos não infectados e astrócitos infectados com *Nc*. A - Expressão gênica de TNF e B - Expressão gênica de IL-10. Análise por qRT-PCR.

Outro questionamento importante conduziu à busca pelo tipo de sinalização neurotrófica feita pelos astrócitos quando infectados por *Nc*. A análise da expressão do gene do fator neurotrófico derivado da glia (GDNF) nos astrócitos infectados possibilitou visualizar a diminuição mediana de 1,5 vezes considerando os níveis basais de astrócitos não infectados (**Fig. 55A**).

Quando analisado os dados relativos ao gene do Fator de Crescimento do Nervo (NGF), observou-se um aumento mediano de 9,7 vezes considerando a expressão do gene de HPRT como controle (**Fig. 55B**).

Em relação à expressão do gene do fator de crescimento derivado do cérebro (BDNF), houve uma diminuição mediana de 2,5 vezes considerando-se o gene da HPRT como controle (**Fig. 55C**).

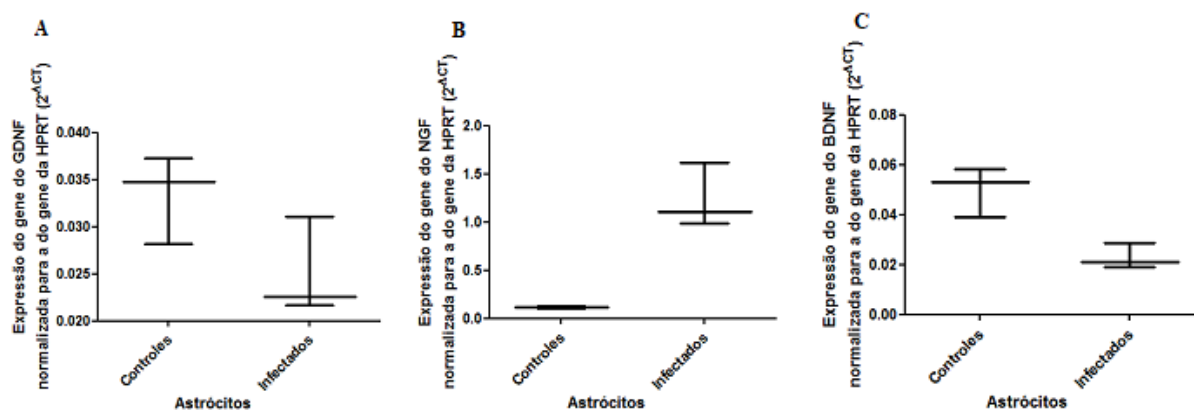


Figura 55 – Expressão dos genes dos fatores neurotróficos GDNF, NGF e BDNF em astrócitos. Expressão normalizada para a expressão mediana do gene da HPRT em astrócitos (controles ou contaminados com *Nc*). **A** - Expressão gênica de GDNF; **B** - Expressão gênica de NGF; **C** - Expressão gênica de BDNF. Análise por qRT-PCR.

4.7.2 Expressão de neurotrofinas e citocinas por CEC moduladas por Meio condicionado de astrócitos infectados por *Neospora*

Para entender a interação entre as células da BHE (CEC e astrócitos) na condição de infecção por *Nc*, inicialmente foi comparado o perfil dos genes das proteínas de controle interno do teste modulados pelo MCAst e MCAst-*Nc*. Observou-se que a HPRT diminuiu de 1,5 vezes quando as CEC foram cultivadas em meio condicionado de astrócitos infectados em comparação às células controles cultivadas em meio condicionado de astrócitos não infectados (**Fig. 56**). Por outro lado, a expressão do gene da β -actina diminuiu de 1,2 vezes quando as CEC foram cultivadas em meio condicionado de astrócitos infectados em comparação às células controles cultivadas em meio condicionado de astrócitos não infectados (**Fig. 56**). Sendo uma diferença pequena e menor do que a encontrada para o gene da HPRT, o gene da β -actina foi usado como controle interno para normalizar os resultados em CEC.

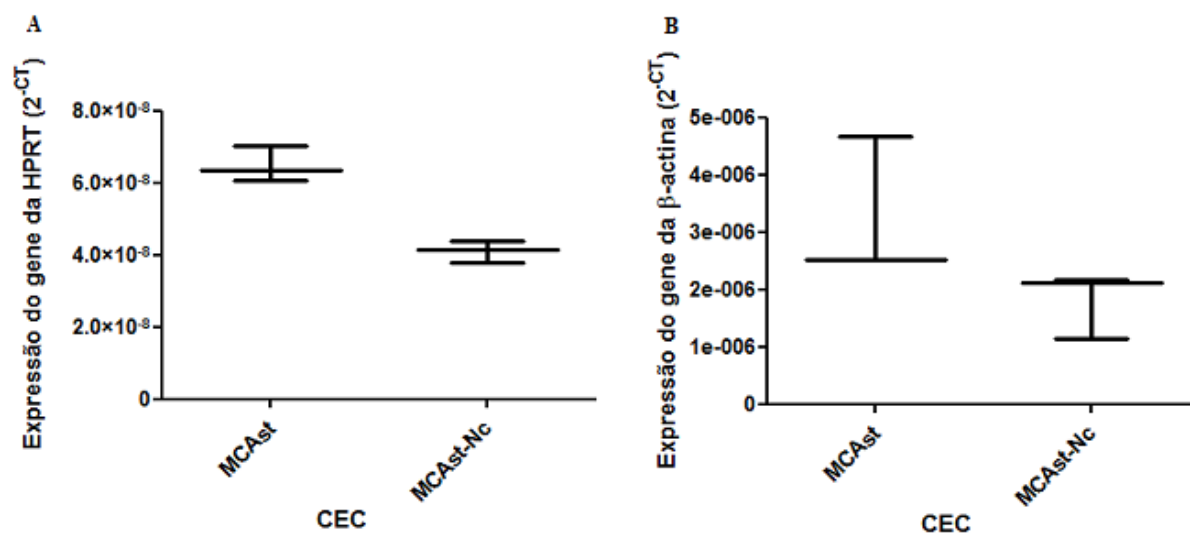


Figura 56. Expressão dos genes β -actina e HPRT em CEC de ratos. Células em meio condicionado de astrócitos infectados por *Nc* (MCAst-*Nc*) comparando com células cultivadas em meio condicionado de astrócitos não infectados (MCAst). **A** - Expressão gênica de HPRT; **B** - expressão gênica de β -actina. Análise por qRT-PCR.

Ao avaliar as respostas das CEC tratadas com meio condicionado de astrócitos infectados por *Neospora*, foi observado um aumento na expressão do gene de TNF de 2439 vezes em relação às células controles, cultivadas em meio condicionado de astrócitos não infectados (**Fig. 57**).

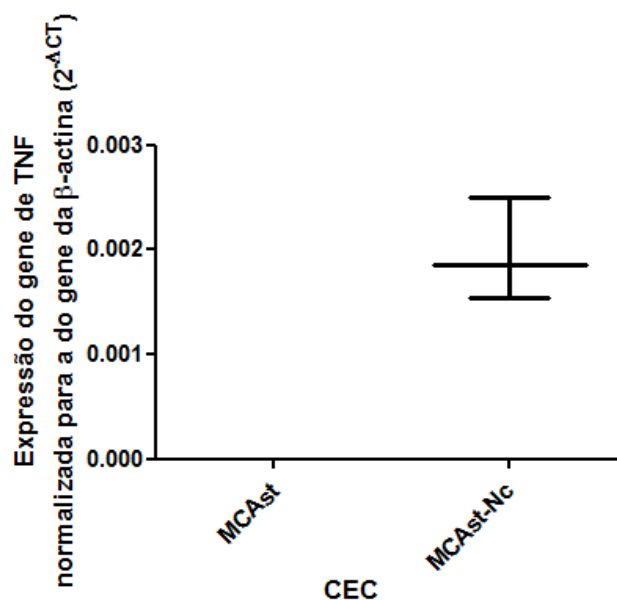


Figura 57. Expressão relativa de gene de TNF em CEC. Células em meio condicionado de astrócitos infectados por *Nc* (MCAst-*Nc*), comparando com células cultivadas em meio condicionado de astrócitos não infectados (MCAst). Análise por qRT-PCR.

A expressão do gene de IL-10 também foi avaliada nestas células. A expressão do gene de IL-10 nas CEC cultivadas em meio condicionado de astrócitos não infectados teve

um valor mediano indeterminado, por estar abaixo do limite de detecção, as células cultivadas em meio condicionado de astrócitos infectados apresentaram um valor mediano de $2^{-\Delta CT}$ de $2,5 \times 10^{-5}$ normalizando-se para a expressão do gene da β -actina.

A expressão relativa de GDNF em CEC tratadas com meio condicionado por astrócitos infectados, diminuiu de 109 vezes em comparação com células cultivadas em meio condicionado de astrócitos não infectados e normalizando-se os dados para a expressão do gene da β -actina (**Fig. 58A**).

A expressão do gene de NGF diminuiu de 38 vezes nas CEC cultivadas em meio condicionado de astrócitos infectados por *Nc* em comparação com células cultivadas em meio condicionado de astrócitos não infectados e normalizando-se os dados para a expressão do gene da β -actina (**Fig. 58B**).

Ao avaliar a expressão do gene de BDNF, foi observado que houve diminuição de 7,6 vezes nas CEC cultivadas em meio condicionado de astrócitos infectados por *Nc* em comparação com células cultivadas em meio condicionado de astrócitos não infectados e normalizando-se os dados para a expressão do gene da β -actina (**Fig. 58C**).

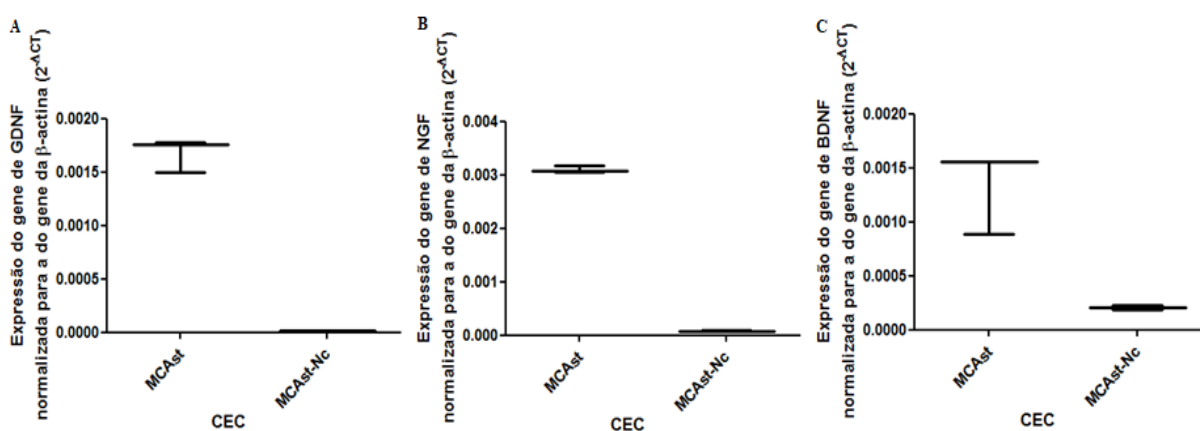


Figura 58 Avaliação da expressão relativa dos genes de GDNF, NGF e BDNF. Células em CEC tratadas com meio condicionado de astrócitos infectados por *Nc* (MCAst-*Nc*) comparando com células cultivadas em meio condicionado de astrócitos não infectados (MCAst). **A** - Expressão gênica de GDNF; **B** - Expressão gênica de NGF; **C** - Expressão gênica de BDNF - Análise por qRT-PCR.

4.7.3 Expressão de ocludina em CEC induzida pelo meio condicionado de astrócitos infectados por *Neospora*.

As CEC foram expostas ao MCAst a 50 e 100% (condição controle) e MCAst-Nc (esterilizado por filtração através de membrana a 0,22 μ m de poro) na proporção de 50% e

100% por 72 h. As imagens da imunomarcação para ocludina foram obtidas por microscopia de fluorescência. Já foi observado em imagens anteriores que o MCAst aumenta a expressão de ocludina, com maior efeito a 50 % do que por 100%.

As CEC na presença do MCAst-*Nc* a 50% apresentaram maior expressão de ocludina e de celularidade quando comparadas com as células cultivadas em meio condicionado de astrócitos não infectados. Com a exposição das CEC por MCAst-*Nc* 100%, observa-se diminuição da celularidade e alterações morfológicas pontuadas por núcleos picnóticos, com retração celular resultando em abertura da monocamada por espaçamento entre as células, citoplasma espiculado e alargado em algumas células (**Fig. 59**).

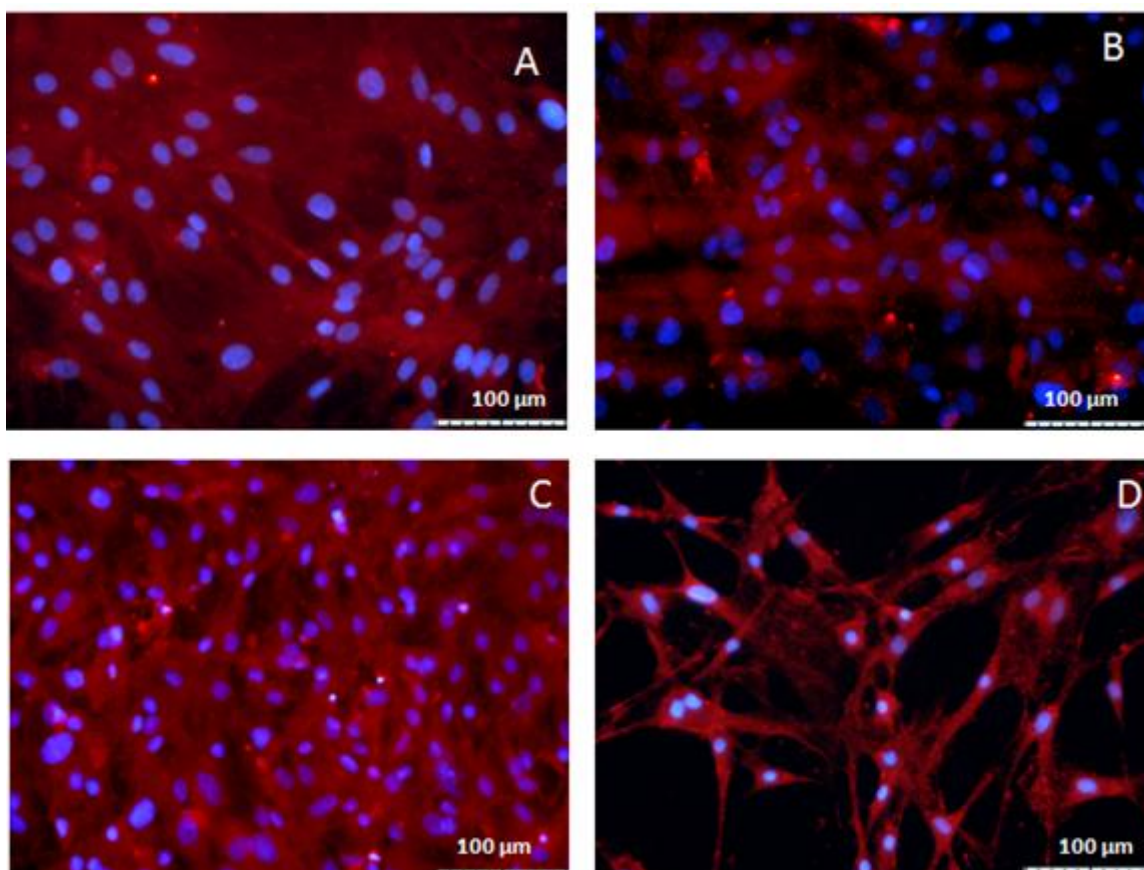


Figura 59. Modulação de ocludina em CEC em meio condicionado de astrócitos infectados por *Nc*. A - CEC em 50% (v/v) em MCAst; B - CEC cultivadas em 100% de MCAst; C - CEC cultivadas em 50% (v/v) MCAst-*Nc*; D - CEC cultivadas em 100% MCAst-*Nc*; Exposição por 72 h. Imunocitoquímica observada por microscopia de fluorescência. Barra equivalente a 100 µm.

O que ficou evidenciado é que astrócitos infectados por *Nc* têm a expressão dos genes das citocinas (IL-10 e TNF) aumentados e os fatores neurotróficos BDNF e GDNF diminuídos e NGF aumentado. O meio condicionado por estes astrócitos levou a

superexpressão de TNF em CEC, com redução de BDNF, NGF e GDNF, induziu a expressão de ocludina, promoveu alterações morfológicas e redução da celularidade da monocamada celular, comprometendo os mecanismos neuroprotetores nestas células.

5 DISCUSSÃO

A integridade da BHE é essencial para manter a homeostase do SNC (CABEZAS et al., 2014). A compreensão sobre o que torna a monocamada de CEC especializada em proteger o SNC contra xenobióticos parece ser um ponto de partida para o entendimento das patogêneses do cérebro e uma ferramenta importante no desenvolvimento de novos agentes terapêuticos capazes de atravessar a BHE e promover a ação preventiva e/ou terapêutica destas doenças. Células gliais têm importante função regulatória sobre a manutenção da BHE (BROUX et al., 2015), mas não se sabe exatamente o caminho ativado por elas para manutenção das CEC. Astrócitos contribuem com várias propriedades na BHE, como a expressão de gama-glutamil transpeptidase e transportadores de glicose do cérebro em células endoteliais não neurais (KUCHLER-BOPP ET AL., 1999).

Inicialmente, foi observado que, após o isolamento, as CEC de ratos necessitam de estímulo para crescimento. As CEC, após isolamento, que ficaram quiescentes em cultivo por mais de 20 dias e depois apresentaram alteração morfológica e proliferação por indução dos MCAst. Há estudos que mostram que algumas funções específicas da BHE são mantidas por pés terminais de astrócitos que envolvem as células endoteliais (RUBIN et al., 1991; GAILLARD et al., 2005; ABBOTT et al., 2006).

O Citrato de sódio em concentrações elevadas conduziu à citotoxicidade das CEC, tanto reduzindo a celularidade como a capacidade de captação de nutrientes por estas células (FREESE et al., 2012). A dissociação enzimática total gera células únicas com características cerebrais limitadas e reprodutibilidade diminuída ou ausente, devido a proteólise durante o processo de isolamento (CECHELLI ET AL., 2007).

O MCC6 (50%) estimulou o crescimento das CEC, em velocidade maior quando comparado com o meio de células normais (os astrócitos). Estes resultados sugerem que o meio condicionado destas células possui moléculas capazes de estimular a proliferação das CEC, aumentando a confluência da monocamada celular da barreira, o que pode impedir que fatores estimuladores do tumor atravessem a BHE e modulem mecanismos que facilitam a invasão tumoral em outros compartimentos. O glioma raramente apresenta metástase. Há estudos que mostram que algumas funções específicas da BHE são mantidas por pés terminais de astrócitos que envolvem as células endoteliais (RUBIN et al., 1991; GAILLARD et al., 2005; ABBOTT et al., 2006). Em condição de cocultivo, observou-se que células imortalizadas de glioma (C6) induziram propriedades de integridade da BHE em células endoteliais de cordão umbilical (HURST; FRITZ, 1996). No entanto, não há registro de dados

na literatura testando a interação entre estas células em culturas separadas, como mostrado neste trabalho.

A imunomarcagem para fator VIII de vonWillebrand foi positiva em CEC quiescentes e em células cuja diferenciação foi iniciada por meio condicionado por astrócitos. Porém, em células diferenciadas por indução dos meios condicionados a intensidade de fluorescência foi maior, quando comparada à imunomarcagem de Fator VIII de vonWillebrand em células não diferenciadas. O fator VIII de vonWillebrand é um marcador específico de células endoteliais (SORDI et al., 2017) e é expresso em altos níveis durante a angiogênese em células endoteliais em cultura (ZANETTA et al., 2000). Este fator foi utilizado para identificar células endoteliais periféricas diferenciadas a partir de cultivo de células endoteliais progenitoras (SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ et al., 2010).

O meio condicionado pela microglia também mostrou ter um importante papel na morfologia das CEC quiescentes, pois induziu alterações morfológicas e reprodutibilidade em nestas células, o que sugere que nesse meio condicionado há outros fatores secretados pela microglia, competentes na diferenciação e fenótipo de células endoteliais. A microglia tem importante influência sobre a função da BHE em condições fisiológicas e inflamatória por reação imediata em condições de ameaças do desequilíbrio do microambiente do SNC (BROUX et al., 2015). A microglia ativada (M2) pode alterar a permeabilidade da BHE por interferir na expressão de proteínas de junção (NIMMERJAHN et al., 2005). No entanto não se sabe ainda qual o mecanismo envolvido na modulação funcional promovida pela microglia na forma não ativada (M1), em condições fisiológicas, sobre células do SNC.

A cultura primária confluyente de CEC de ratos, confluentes, suportou bem o teste de dissociação enzimática por tripsina e o congelamento, mantendo características morfológicas e reprodutibilidade, melhorando o grau de pureza das culturas. Estas observações têm respaldo da literatura, sendo que CEC podem ser submetidas a subcultivos e estocadas em nitrogênio líquido para uso em experimentos posteriores, mantendo fenótipo característico até a sétima passagem (CECHELLI et al., 2007).

O uso do meio preconizado para células endoteliais, o EGM-2, foi ajustado à proporção de 50% em DMEM HAM F12 para otimizar o tempo de diferenciação das células em cultura. O meio EGM-2 foi apontado, em estudo comparativo, como o meio de cultura ideal para o cultivo de células endoteliais cerebrais (RBEC) e células da espinha dorsal (RSCEC) de ratos (WATSON et al., 2013). O meio EGM-2 foi o meio de escolha utilizado em cultura de células endoteliais de cordão umbilical e cultura primária de células endoteliais cerebrais num estudo envolvendo o receptor gC1qR/HABP1/p32, ligante do *Plasmódium*

falciparum para adesão no endotélio vascular (BISWAS et al 2007) e em cultura de células endoteliais progenitora na investigação dos canais de Ca^{2+} (SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ et al., 2010).

A microglia interage com os astrócitos durante o cultivo, e após a separação destas células, essa interação continua influenciando na resposta dos astrócitos ao dano provocado pelo catecol. O catecol foi mais citotóxico para astrócitos isolados, com separação precoce da microglia desde as primeiras 48 h de cultivo (P1), com mediana de EC_{50} de 82 μM do que os astrócitos isolados que sofreram separação da microglia após 7 dias de cultivo, situação em que a mediana da EC_{50} foi de 229 μM . Os astrócitos mostraram ser mais resistentes ao dano provocado pelo catecol do que as células de N2 de neuroblastoma, linhagens de origem neuronal, onde a EC_{50} determinada foi 38 μM após 72 h, com dose mínima citotóxica de 20 μM (LIMA et al., 2008). Os métodos desenvolvidos para estabelecer a cultura de astrócitos isolados da microglia já são bastante utilizados (CROCKER et al., 2008). Em estudos anteriores, já foi comparada a resposta da microglia/astrócitos em cultura, sendo que astrócitos apresentam resposta antiinflamatória diferente em cultura mista, quando comparados com culturas isoladas (WILLIS, 2011; LOSCIUTO et al., 2012). Porém, no presente trabalho, estas células estavam em culturas isoladas em ambos os protocolos.

Astrócitos isolados de ambos os protocolos (P1, remoção precoce da microglia e P2, remoção tardia da microglia) apresentaram fluorescência resultante da imunomarcação para GS, sendo que a expressão da enzima parece maior nos astrócitos isolados do protocolo 2, onde houve remoção tardia da microglia. GS é uma enzima citosólica particularmente encontrada em astrócitos e catalisa a conversão dependente de ATP, de amônia e glutamato que são liberados pelos neurônios, para formar glutamina que será utilizada no metabolismo neuronal do glutamato (HERTZ, 1979). Dessa maneira, os astrócitos promovem neuroproteção contra a excitotoxicidade pelo glutamato e também previne os danos causados pela hiperamonemia, responsável pelo edema cerebral (SUAREZ et al., 2002; ROSE et al., 2013). O aumento da expressão de GS em áreas de neurônios glutamatérgicos pode resultar em neuroproteção por impedir a degeneração neuronal, e a expressão diminuída dessa enzima, pode comprometer a interação metabólica neurônio glia (VERKHRATSKY et al., 2015).

As imagens de imunocitoquímica não revelaram presença destas células reveladas pela imunomarcação negativa para OX42. Mesmo após a separação destas células, os mecanismos citoprotetores anteriormente ativados continuam manifestando ação, sugerindo que há um "legado" da interação da microglia com os astrócitos durante o cultivo que os tornam mais resistentes.

O catecol, em diferentes concentrações, induz reatividade astrocitária com alterações importantes de citoesqueleto. Estas alterações são mais evidentes em astrócitos cultivados em mistura glial com remoção da microglia após 7 dias de cultivo (P2), em comparação com os astrócitos cultivados sem microglia desde as primeiras 48 h (P1). A reatividade astrocitária ao catecol foi diminuída pelo GSH nas células dos dois protocolos, mesmo utilizando no teste uma dose supra terapêutica. Em pH fisiológico, o catecol auto oxida gerando grande quantidade de espécies reativas de oxigênio (MELIKIAN et al., 2008). O GSH atua como substrato para enzimas antioxidantes e detoxificadoras, transferindo o tripeptídeo para as espécies reativas, protegendo os astrócitos e neurônios contra o dano oxidativo (DRINGER et al., 2003).

A reatividade astrócitária é uma resposta aguda, que limita o dano tecidual, promovendo a proteção ao SNC até o reestabelecimento da homeostase (PEKNY; PEKNA, 2014). A astrogliose está diretamente relacionada a expressão de GFAP, principal componente dos filamentos intermediários dos astrócitos e um importante marcador de reatividade astrócitária em estudos com vários modelos de SNC (ENG et al., 2000).

De algum modo, além das modificações morfológicas mediante a exposição ao catecol, os astrócitos também desencadearam mecanismos de proteção contra o dano, pois as células que foram cultivadas com microglia apresentaram maior reatividade astrócitária e coincidentemente maior resistência ao dano. Isso foi confirmado quando astrócitos do protocolo 1 foram expostos ao catecol na presença do meio condicionado pela microglia. Ou seja, o MCMG promoveu proteção dose dependente aos astrócitos, diminuindo a toxicidade ao catecol em 8 vezes com 20% do MCMG e citoproteção total quando modulados com 50% de MCMG frente ao dano, não apresentando diferença em relação ao controle.

A reatividade astrocitária recruta microglia em situação de lesão (RENAULT-MIHARA et al., 2008; ROBEL et al., 2011). Em contrapartida, a microglia ativada recruta astrócitos para regiões afetadas (NAKAZAWA et al., 2007). Os resultados foram obtidos da modulação dos astrócitos por meio condicionado pela microglia, mas não cocultivo. Portanto, a interação não é resultante de reação celular e sim da interação dos componentes do meio condicionado pela microglia com os astrócitos. Este meio condicionado leva a respostas de citoproteção aos astrócitos em situações de dano, independente do contato celular, embora não se saiba qual o mecanismo envolvido. Foi observada também uma diminuição na quantidade de quinonas, além da citoproteção dos astrócitos pelo meio condicionado pela microglia com aumento da viabilidade celular.

Os astrócitos isolados pelo protocolo 1 (P1) não alteram a expressão do gene da citocina IL-10 quando tratados com catecol. Há diminuição na expressão dessa citocina na presença do catecol por 72 h somente em astrócitos P2. Ácidos graxos saturados, como ácido palmítico, láurico e esteárico induzem aumento de TNF e IL-6 em astrócitos (GUPTA et al., 2012).

Foi observado que o catecol diminui a expressão de IL-1 β nos astrócitos isolados tanto do protocolo 1 como pelo protocolo 2. O catecol induz estresse oxidativo pela produção de espécies reativas de oxigênio e formação de quinonas. A microglia ativada por ácido palmítico e lipopolissacarídeo induz a expressão e secreção de IL-1 β e IL-6 (Wang et al., 2012). ROS ativa o NF- κ B por fosforilação dos resíduos de serina e induz inflamação, onde se observa aumento de citocinas como IL-1 β , IL-6 e TNF pela microglia (AKHTAR et al., 2017). A indução na expressão das citocinas IL-1 β e TNF por meio condicionado pela microglia em astrócitos expostos a radiação ionizante, foi relacionada à indução da expressão de ICAM-1 nestas células (KYRKANIDES et al., 1999). Parece que a microglia é crucial no estabelecimento de um estado inflamatório.

Os fatores neurotróficos, BDNF, NGF e GDNF possuem importante influência sobre a sobrevivência e função celular. O NGF é mediador da dor periférica, principalmente em processos inflamatórios (PEZET et al., 2006) e tem associação com resposta autoimune pelo bloqueio das vias de sinalização entre as células gliais, modulando a resposta patogênica e a dor (SCHOLZ et al., 2007). O catecol parece não influenciar a expressão dos fatores neurotróficos NGF, BDNF e GDNF. Porém, astrócitos isolados com remoção tardia de microglia apresentam níveis diminuídos de NGF, quando comparados com as células isoladas obtidas pelo protocolo 1.

Se por um lado, culturas isoladas de células gliais permitem estudar a responsabilidade de cada tipo de célula a agentes pró-inflamatórios, por outro lado, o uso de culturas mistas poderia refletir a condição mais próxima da fisiológica e ser útil para observar modificações globais e interações celulares, caracterizando desordens do CNS. Como foi visto, há citoproteção resultante da interação da microglia com os astrócitos na mistura glial. Diante desse fato, no sentido de evitar a interferência de fatores secretados pela microglia, o método de isolamento de astrócitos com eliminação da microglia desde as primeiras 48 h de cultivo foi escolhido nos estudos sobre a interação entre astrócitos e CEC.

As CEC são resistentes ao dano pelo catecol. Os resultados obtidos pelo teste de MTT mostraram que CEC sobrevivem à toxicidade pelo catecol, pois não se observou alteração significativa na atividade das desidrogenases mitocondriais. No entanto foi observado morte

celular nas imagens, obtidas durante o teste, por microscopia de contraste de fase na concentração de 6000 μM de catecol, caracterizada pela redução na celularidade. Nas análises por citometria de fluxo foi determinado que o catecol induz morte em CEC por apoptose. As CEC crescem aderidas ao filme de colágeno e fazem junções ocludentes quando confluentes. Para análise no citômetro de fluxo as células foram mantidas em suspensão após descolamento da placa por ação enzimática da tripsina, isso pode ter contribuído com a morte por apoptose observada no controle. No entanto a porcentagem de morte de CEC por apoptose no grupo exposto ao catecol é maior em comparação com o grupo controle. A oxidação do catecol em pH fisiológico eleva a quantidade de quinonas, o que contribui para o estresse oxidativo. O dano oxidativo ativa vias pró apoptóticas por regulação de Bcl-2 mitocondrial via ubiquitina-proteossoma, conduzindo a apoptose em células endoteliais de cordão umbilical, a HUVEC (LI et al., 2016). Outro estudo também mostrou que dano oxidativo induzido por cobre, dose dependente, também conduz a citotoxicidade e morte por apoptose em células endoteliais cerebrais (WANG et al., 2016). Em contraposição, um estudo envolvendo modelo de hipóxia e reoxigenação, por ativação do ciclo redox de quinonas, mostra que astrócitos de camundongos são mais resistentes ao dano oxidativo comparado com uma linhagem de células endoteliais derivadas de porco, clonadas (BRESGEN et al., 2006).

As CEC e astrócitos interagem entre si, em resposta ao dano pelo catecol. Catecol foi citotóxico aos astrócitos isolados, onde se observou diminuição da atividade das desidrogenases mitocondriais e aumento da produção de quinonas. O MCCEC protege os astrócitos da citotoxicidade induzida pelo catecol. Os constituintes do meio condicionado por CEC reduziram a reatividade astrócitária e a expressão de GFAP destas células mediante o dano oxidativo causado pelas quinonas, quando expostas a 20 μM de catecol. Vários estudos têm mostrado a função dos astrócitos na modulação das células endoteliais, em cocultivo, principalmente sobre as características que conferem a BHE (ABBOTT, 2002; ABBOTT et al., 2006; BARRETO et al., 2011; CHAITANYA et al., 2014). Estudo envolvendo meio condicionado por astrócitos mostrou modulação em células endoteliais humanas (HBMEC) aumentando a expressão de proteínas de zonas de oclusão, a ZO-1 (SIDDHARTHAN et al., 2007).

O catecol induz a morte nos astrócitos por apoptose. Em sistema mitocondrial, o aumento na produção de quinonas por catecol a 1 mM foi capaz de inibir o complexo II da cadeia respiratória, diminuindo o consumo de O_2 , potencializando o efeito tóxico (BARRETO et al., 2005). O estresse oxidativo leva a perda da permeabilidade mitocondrial devido a peroxidação lipídica, com liberação de moléculas pró apoptóticas, por ex. citocromo c, forma

apoptossomos que ativam caspase 9 e na sequência caspase 3, ocasionando apoptose (GOTTLIEB, 2001). Em outro estudo, a viabilidade celular em astrócitos também foi diminuída após exposição a 107 μM de 3-metilcatecol após 72 h (BARRETO et al., 2007).

Os resultados obtidos evidenciaram também que a interação dos astrócitos com o meio condicionado de CEC promovem o aumento da expressão da isoforma de GST, a GSTpi, e de proteínas de efluxo, a gp-P. O aumento na expressão de enzimas envolvidas nos mecanismos detoxificadores da barreira metabólica, em astrócitos na presença do meio condicionado por CEC, e em CEC na presença do meio condicionado pelos astrócitos, pode ter importante implicação na redução do dano pelo catecol, o que fortalece a hipótese de que há interação entre células da BHE independente do contato entre as células. As GST estão envolvidas na biotransformação de drogas, na detoxificação de xenobióticos endógenos e exógenos e na esteroidogênese (BASIC BARONICA et al., 2014). Células cerebrais de ratos, sofrem indução na expressão do gene de GSTpi por dexametazona e pregnenolona-16 α -acarbonitrila (BAUER et al., 2008). O aumento da expressão de GSTpi pode estar indiretamente envolvido com a diminuição do dano oxidativo, por eliminação das espécies oxidantes (HAYES *et al.*, 2005). O polimorfismo de GSTpi, exemplo do genótipo C341T, em pessoas saudáveis comparado com pacientes de esclerose múltipla parece amenizar o surgimento do fenótipo clínico (BASIC BARONICA et al., 2014). Por outro lado, aumento na expressão de GSTpi durante o uso de quimioterápicos está diretamente relacionado a diminuição do efeito, associado ao surgimento da resistência a drogas em tumores cerebrais (CALATOZZOLO et al., 2005; FRUEHAUF et al., 2006; YAO et al., 2012).

Foi observado aumento na expressão de UGT1A6 por astrócitos tratados com catecol na presença do meio condicionado por CEC em análise feita por *western blot*. Pelas imagens de imunocitoquímica obtidas por microscopia confocal observou-se que o estresse oxidativo causado pelo catecol aumentou a expressão dessa isoforma nas células com alterações genômicas importantes. Parece que estes efeitos foram diminuídos na presença de MCCEC a 50% e 100%. Astrócitos sobreviventes de condições de estresse oxidativo, apresentam uma superexpressão de enzimas envolvidas no metabolismo na detoxificação de xenobióticos, como resposta adaptativa (GRADINARU et al., 2012), o que possivelmente pode estar acontecendo nas células onde se observa fluorescência mais intensa coincidindo com lesões cromossômicas. Culturas primárias de astrócitos de ratos expressam UGT1A6 e 1A7, constitutivamente e indutivamente (GRADINARU et al., 1999). A UGT1A6 é uma isoforma que catalisa as reações do ácido glucurônico com variedades de compostos endógenos e drogas com ação no SNC (EL-BACHÁ et al., 1999; COURT et al., 2001; ETHELL et al.,

2003; SAKAKIBARA et al., 2016a; b). Glucuronídeos de catecol já foram caracterizados em microssomos intestinais, gástricos e hepáticos (ANTONIO et al., 2003). No entanto, espécies reativas provocam oxidação de proteínas diminuindo assim a atividade enzimática (FERNANDES et al., 2011). As isoformas de UGT catalisam a formação de conjugados de glucuronídeos por ligação a dihidrodióis, reduzindo assim a ligação destas espécies com o material genômico, proteínas e lipídeos (ZHANG et al., 2013).

As CEC apresentaram resultados divergentes nos diferentes métodos utilizados para análise de gp-P. Observa-se nas imagens da imunocitoquímica que o MCAst aumenta muito a fluorescência resultante da imunomarcagem para gp-P no grupo de células expostas ao catecol, comparando com células expostas ao catecol em meio DMEM HAM F12. No entanto, quando as análises foram realizadas por citometria de fluxo, observa-se diminuição na imunomarcagem de gp-P das células expostas ao catecol em MCAst na proporção de 50%, frente ao dano, quando comparadas com as células tratadas com catecol em DMEM HAM F12. Para análise no citômetro, as células foram dissociadas enzimaticamente com tripsina e mantidas em suspensão. A tripsina (EC 3.4.21.40) é uma serina protease que cliva os aminoácidos, arginina e lisina na posição R1, da cadeia lateral positiva de proteínas de membrana celular, exceto seguidos de prolina. A gp-P é uma proteína de membrana que possui sítios de clivagem (ATM: [LYS] 96:A. CA e ATM: [ARG] 96:A. CA, no organismo de *Mus musculus* PDB ID: 3G60 (ABCB1) e do *Rattus norvegicus* UniProtKB - P43245) com potencial para o reconhecimento da tripsina pela lisinas da sequência do domínio de ligação da gp-P (LMLVFGYMTDSFTPSRDPHSDRAITNQSEINSTHTVSDTSLEEDMAMYAY), na alça externa da membrana das células, coincidindo com a região do sítio de ligação dos anticorpos (**Fig. 60**) (<http://www.rcsb.org>; www.uniprot.org).

Em estudo de comparação entre as duas células, cultura primária glial e linhagem imortalizada de glioma, ambas foram capazes de aumentar os níveis de gp-P e a expressão de mRNA de VEGF, com alterações nas propriedades estruturais e funcionais de células endoteliais em cocultivo, sugerindo uma interação resultante na expressão de gp-P dependente do contato físico (BOVERI et al., 2005).

O meio condicionado das CEC induziu a expressão de gp-P em astrócitos expostos ao catecol. O antineoplásico doxorubicina também mostrou esse papel indutor da expressão de gpP (ABCB1) em cultura primária de astrócitos, apontando como fator caracterizador da resistência dessa droga (MERCIER et al., 2003). Em recente estudo foi mostrado que astrócitos e pericitos em co-cultivo têm importante papel sobre diferenciação das células endoteliais cerebrais e que astrócitos são essenciais na manutenção das características de

barreira como a expressão e atividade de proteínas da bomba de efluxo, por polarização de gp-P (AL AHMAD et al., 2011). Um estudo mostra que a regulação resultante do aumento de gp-P é dependente do tempo, em exposição crônica, mediante estresse oxidativo (NWAOUZU *et al.*, 2003).

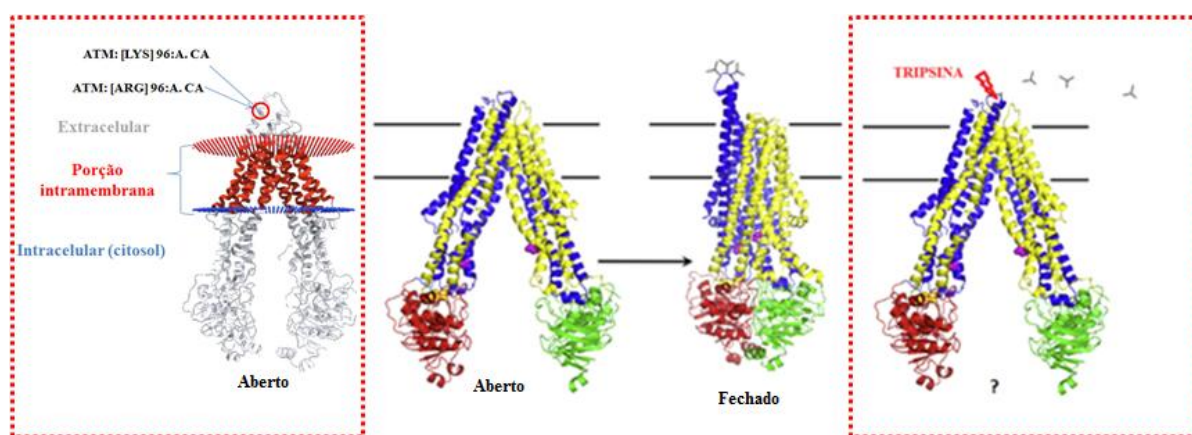


Figura 60. Possíveis sítios de ligação da serina na alça externa da gp-P de organismo *Mus musculus* (<http://www.rcsb.org>). Após ligação do anticorpo, a molécula muda de conformação e fecha a abertura intramembrana. A tripsina cliva a alça externa, dificultando a ligação do anticorpo (modificado de Loo and Clarke, 2016)

A exposição das CEC ao catecol gera grande produção de quinonas e promove espoliação de GSH. Em condições de interação com MCAst, nas concentrações de 50 e 100% foi observada a proteção contra a espoliação do GSH pelo catecol em CEC. As GST têm importante papel na catálise da reação de conjugação de glutation com espécies reativas geradas na auto oxidação do catecol, além de reduzir a quantidade de epóxido (HARRIS et al., 2013). A biosíntese de GSH ocorre no meio intracelular e pode ser inibida por butionina sulfoxamina (YOUNG; VILLALOBOS, 2014). Um estudo com astrócitos expostos a espécies reativas de oxigênio, mostrou diminuição nos níveis de GSH coincidindo com aumento na oxidação de proteínas (HEURTAUX et al., 2004). Quando o GSH é transferido para as quinonas pelas GST, o grupo tiol do GSH num ataque nucleofílico a macromoléculas eletrofílicas celulares promove pareamento dos elétrons, formando o complexo GSH-quinonas, resultando em citoproteção e espoliação de GSH. Qualquer alteração neste sistema de proteção antioxidante pode potencializar a neurodegeneração por perda de células neuronais (AL NIMER et al., 2013).

O Catecol promoveu espoliação de GSH em células de glioblastoma humano, em 72 h. A espoliação de GSH em GL-15 induzida pelo catecol foi determinada após exposição de

24h (DE OLIVEIRA et al., 2010), o que mostra que estas células não conseguem superar esta espoliação e por isso há redução da celularidade observada nas imagens obtidas dos experimentos. O MCCEC protegeu GL-15 contra a espoliação do GSH, *in vitro*. Isso reforça a hipótese que existe uma interação entre estas células e que isso não é dependente do contato físico. No entanto, também se observou proteção conferida pelas CEC à espoliação de GSH pelo catecol em GL-15 em condições de cocultivo. Esta proteção pode ter sido por eficácia da barreira metabólica na conjugação das quinonas e do sistema de efluxo, bombeando-as para a porção luminal e/ou por modulação das CEC sobre as GL-15, ativando nestas células mecanismos protetores. O GSH é sintetizado em variadas quantidades em diferentes regiões do cérebro, sendo os astrócitos e a microglia as células com maior relação enzima atividade com níveis de GSH (KANG et al., 1999).

Catecol foi genotóxico em 93% dos astrócitos. Foi observado que o MCCEC a 50% protege os núcleos dos astrócitos das fragmentações de DNA induzidas pelo catecol. Houve também redução da instabilidade genômica dos astrócitos expostos ao catecol na presença de MCCEC na proporção de 100%. O método utilizado no estudo toxicogénico foi o teste de cometa que permite detectar lesões no DNA (SINGH et al., 1988; TICE et al., 2000; VILLELA et al., 2006; OLIVE, 2009; KARLSSON et al., 2014). As lesões de DNA são geradas diariamente, em condições fisiológicas pelo próprio metabolismo celular. No entanto o teste foi ajustado para minimizar migração dos danos dos cometas, tendo como base o controle, aumentando a sensibilidade do teste. Já foi mostrado que o catecol também induz genotoxicidade em células GL-15 (DE OLIVEIRA et al., 2010). Em modelo de estresse oxidativo em astrócitos, por indução do metabolismo desencadeado pelo α -gliceril-fosforilcolina e em tratamento cocomitante com a mistura racêmica de ácido α -lipoico (uso clínico como antioxidante) observou-se reparo de lesões do DNA visualizadas pela redução na formação de cometas (GRASSO et al., 2014). De algum modo, o meio condicionado das CEC em contato com os astrócitos mediante o dano pelo catecol promoveu a genoproteção destas células. O mecanismo envolvido precisa ser melhor elucidado.

Em condições similares à patológica, foi observado que astrócitos infectados com *Nc* aumentam muito a expressão gênica de IL-10 e TNF quando comparados com astrócitos não infectados. Nesta mesma condição foi observado também que astrócitos infectados apresentaram diminuição na expressão dos genes de BDNF e GDNF e aumento da expressão gênica de NGF. Em estudos anteriores já foram mostrados que *Nc* aumenta a expressão de citocinas (IL-10 e TNF) em astrócitos (PINHEIRO et al., 2006a), sinalizando grande resposta inflamatória à invasão parasitária. *Nc* é um protozoário que causa alterações neuromusculares

em vertebrados, sem relatos de infecção humana, porém devido similaridade de invasão, este modelo pode ser usado como parâmetro de invasividade do SNC por toxoplasma. A IL-10 é a primeira citocina a ser sintetizada com objetivo de inativar o invasor e ao mesmo tempo induzir processos protetores, como aumento de NGF em astrócitos (OTTEN et al., 2000). Os astrócitos secretam GDNF (ALVAREZ et al., 2013). O que não ficou bem estabelecido foi a relação do aumento de TNF com os mecanismos de redução da expressão de GDNF e BDNF pelos astrócitos infectados.

Foi observado um aumento de 20 vezes na expressão do gene de TNF em CEC moduladas com meio condicionado por astrócitos infectados por *Nc* quando comparada com CEC cultivadas com meio condicionado de astrócitos não infectados. No entanto, a expressão do gene de IL-10 pelas CEC cultivadas em meio condicionado de astrócitos não infectados teve um valor mediano indeterminado, por estar abaixo do limite de detecção. O meio condicionado por astrócitos infectados diminuiu a expressão do gene de GDNF 109 vezes, do gene de NGF em 38 vezes e BDNF em 7,6 vezes em comparação com células cultivadas em meio condicionado de astrócitos não infectados. A diminuição de BDNF em CEC foi observada em córtices de ratos em longos períodos com diabetes *mellitus* (NAVARATNA et al., 2011). As CEC são a principal fonte de secreção de BDNF no cérebro (NAKAHASHI et al., 2000). Por ser uma proteína neuroprotetora, essa diminuição está relacionada com o aumento de doenças neurodegenerativa (KALINOWSKA-LYSZCZARZ; LOSY, 2012; BUDNI et al., 2015). O BDNF se liga ao receptor de baixa afinidade pT75^{NTR}, sinalizando para sobrevivência celular por ativação das vias Ras/ERK e Akt/PI3K (ASSIMAKOPOULOU et al., 2007). O receptor pT75^{NTR} pode agir como co-receptor dimerizando trk por trans auto fosforização podendo sinalizar a sobrevivência celular, via ativação de NF- κ B, ou apoptose, por ativação de Rac1/Jun N-terminal cinase, JNK (ASSIMAKOPOULOU et al., 2007). Porém este receptor também é reconhecido por TNF e a modulação depende da concentração do ligante no sítio ativo. Em células endoteliais isoladas, TNF apresenta efeito bifásico, em baixas doses, provoca redução de gp-P, em altas doses promove aumento da expressão, porém sem aumentar a atividade de transporte (PAN et al., 2006; PAN et al., 2008; VON WEDEL-PARLOW et al., 2009; POLLER et al., 2010). Receptor de GDNF, o GDNFR- α 1 é expresso por CEC na região do córtex (ALVAREZ et al., 2013).

Aumento nos níveis de citocinas e TNF- α está associado com o aumento da permeabilidade da monocamada e redução da resistência elétrica trans endotelial (WONG et al., 2004). Os valores de TEER obtidos da monocamada endotelial fornece um indicador de

integridade de membrana celular baseado no princípio de que células confluentes constituem uma barreira para trocas iônicas através da membrana (BOUHET et al., 2004; LIN et al., 2005; PRESS e DI GRANDI, 2008). No entanto, aumento de proteínas de junção e da TEER são estimulados por GDNF (IGARASHI et al., 1999). A redução dos fatores neurotróficos na presença do meio condicionado por astrócitos infectados por *Nc*, sinaliza a redução na neuroproteção conferida por estas proteínas.

6 CONCLUSÕES

Os meios condicionados pelos astrócitos, de glioma murino e de microglia induzem a proliferação e alteração morfológica das CEC quiescentes, mantendo o fenótipo de células endoteliais.

O catecol é mais citotóxico para astrócitos isolados, com separação precoce da microglia a partir de 48 h, quando comparado com a resposta dos astrócitos com separação tardia da microglia (após 7 d). O meio condicionado pela microglia confere resistência a estes astrócitos.

As CEC de ratos são resistentes ao dano induzido pelo catecol.

O meio condicionado por CEC protege os astrócitos contra o dano provocado pelo catecol, aumentando a expressão da isoforma GSTpi, a UGT1A6 e de bomba de efluxo gp-P.

O meio condicionado pelos astrócitos aumenta a expressão de GSTpi e reduz a expressão de gp-P em CEC mediante o dano pelo catecol. As CEC e astrócitos expressam UGT1A6.

O meio condicionado CEC, na presença do catecol, aumenta a expressão de UGT1A6 em astrócitos. Porém não se observou alteração de UGT1A6 em CEC entre os grupos tratados com catecol e na presença do MCAst.

O catecol leva à espoliação parcial de GSH em CEC, porém o MCAst protege as CEC da espoliação de GSH.

Catecol leva a espoliação de GSH em GL15. O MCCEC e as próprias CEC em cocultivo protegem as GL-15 contra a espoliação de GSH induzida pelo catecol. O MCCEC é genoprotetor aos astrócitos contra os danos oxidativos induzidos pelo catecol.

O meio condicionado de astrócitos induz o fechamento da monocamada, definido pelas medidas de TEER, a expressão do fator VIII e de proteínas de oclusão, a ocludina em CEC.

Em astrócitos infectados por *Nc* observou-se o aumento da expressão dos genes de IL-10 e TNF e do NGF e diminuição da expressão dos genes de BDNF e GDNF.

O MCAst-*Nc* levou a superexpressão de TNF em CEC, com redução de BDNF, NGF e GDNF. Na presença do MCAst-*Nc*, as CEC apresentam maior expressão de ocludina e alteração morfológica que comprometem a permeabilidade da monocamada endotelial.

Os dados deste trabalho sugerem que CEC e astrócitos interagem entre si, independente do dano, porém resulta em citoproteção quando há dano.

Os mecanismos detoxificadores são ativados nos astrócitos pelo meio condicionado pelas CEC, e nas CEC pelo meio condicionado pelos astrócitos, mediante o dano pelo catecol, em situações fisiológicas ou patológicas. Esta interação parácrina parece existir independente da sinalização positiva ou negativa das células envolvidas e sim, pela simples dinâmica da sobrevivência celular, independente do contato físico.

7 REFERÊNCIAS

ABBOTT, N. J. Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability. **J. Anat.**, v. 200, n. 6, p. 629-638, jun. 2002.

_____. Dynamics of CNS barriers: evolution, differentiation, and modulation. **Cell Mol. Neurobiol.**, v. 25, n. 1, p. 5-23, feb. 2005.

_____. Blood-brain barrier structure and function and the challenges for CNS drug delivery. **J. Inherit. Metab. Dis.**, v. 36, n. 3, p. 437-49, may. 2013.

ABBOTT, N. J.; REVEST, P. A. Control of brain endothelial permeability. **Cerebrovasc. Brain Metab. Rev.**, v. 3, n. 1, p. 39-72, Spring. 1991.

ABBOTT, N. J.; RONNBACK, L.; HANSSON, E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. **Nat. Rev. Neurosci.**, v. 7, n. 1, p. 41-53, jan. 2006.

ABDEL-RAHMAN, A.; SHETTY, A. K.; ABOU-DONIA, M. B. Disruption of the blood-brain barrier and neuronal cell death in cingulate cortex, dentate gyrus, thalamus, and hypothalamus in a rat model of Gulf-War syndrome. **Neurobiol. Dis.**, v. 10, n. 3, p. 306-326, aug. 2002.

AKHTAR, F. et al. Acute maternal oxidant exposure causes susceptibility of the fetal brain to inflammation and oxidative stress. **J. Neuroinflam.**, v. 14, n. 1, p. 195, sep. 2017.

AL AHMAD, A. et al. Astrocytes and pericytes differentially modulate blood-brain barrier characteristics during development and hypoxic insult. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, v. 31, n. 2, p. 693-705, feb. 2011.

ALBERT, B. **Biologia Molecular. Célula I.** 5ª ed. Atmed., 2010.

AL NIMER, F. et al. Naturally occurring variation in the glutathione-s-transferase 4 gene determines neurodegeneration after traumatic brain injury. **Antioxid. Redox Signal**, v. 18, n. 7, p. 784-794, mar. 2013.

ALI, F. T. et al. Redox dysregulation, immuno-inflammatory alterations and genetic variants of BDNF and MMP-9 in schizophrenia: Pathophysiological and phenotypic implications. **Schizophr. Res.**, jan. 2017.

ALVAREZ, J. I.; KATAYAMA, T.; PRAT, A. Glial influence on the blood brain barrier. **Glia**, v. 61, n. 12, p. 1939-1958, dec. 2013.

AMERATUNGA, M. et al. CNS cancer immunity cycle and strategies to target this for glioblastoma. **Oncotarget**, v. 9, n. 32, p. 22802-22816, 2018.

ANTONIO, L. et al. Glucuronidation of catechols by human hepatic, gastric, and intestinal microsomal UDP-glucuronosyltransferases (UGT) and recombinant UGT1A6, UGT1A9, and UGT2B7. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 411, n. 2, p. 251-261, mar. 2003.

ASSIMAKOPOULOU, M. et al. Neurotrophin receptors expression and JNK pathway activation in human astrocytomas. **BMC Cancer**, v. 7, p. 202, oct. 2007.

BABU, R.; ADAMSON, D. C. Rindopepimut: an evidence-based review of its therapeutic potential in the treatment of EGFRvIII-positive glioblastoma. **Core Evid.**, v. 7, p. 93-103, 2012.

BARBACID, M. Neurotrophic factors and their receptors. **Curr. Opin. Cell. Biol.**, v. 7, n. 2, p. 148-55, Apr. 1995.

BACIC BARONICA, K. et al. Progression of multiple sclerosis is associated with gender differences in glutathione S-transferase P1 detoxification pathway. **Acta Neurobiol. Exp. (Wars)**, v. 74, n. 3, p. 257-65, 2014.

BACOLOD, M. D. et al. Mechanisms of resistance to 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea in human medulloblastoma and rhabdomyosarcoma. **Mol. Cancer. Ther.**, v. 1, n. 9, p. 727-36, Jul. 2002.

BARRETO, G. E. et al. Catechol inhibits FADH₂-linked respiration in rat liver mitochondrial fraction. **Acta Cir. Bras.**, v. 20 Suppl 1, p. 72-7, 2005.

_____. Astrocytic-neuronal crosstalk: implications for neuroprotection from brain injury. **Neurosci. Res.** v. 71, n. 2, p. 107-13, Oct. 2011.

BARRETO, G. E. S. et al. Investigation of toxic factors affecting cells of rat brains exposed to 3-methylcatechol. **Braz. Arch. Biol. Technol.**, v. 50, p. 839-849, 2007.

BAUER, B. et al. Coordinated nuclear receptor regulation of the efflux transporter, Mrp2, and the phase-II metabolizing enzyme, GSTpi, at the blood-brain barrier. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, v. 28, n. 6, p. 1222-34, Jun. 2008.

BAYOL-DENIZOT, C. et al. Xenobiotic-mediated production of superoxide by primary cultures of rat cerebral endothelial cells, astrocytes, and neurones. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1497, n. 1, p. 115-26, Jun. 2000.

BRADSHAW, R. A. et al. Nerve growth factor revisited. **Trends Biochem. Sci.**, v. 18, n. 2, p. 48-52, Feb. 1993.

BELOUS, A. R. et al. Cytochrome P450 1B1-mediated estrogen metabolism results in estrogen-deoxyribonucleoside adduct formation. **Cancer Res.**, v. 67, n. 2, p. 812-7, Jan. 15 2007.

BERKEMEIER, L. R. et al. Neurotrophin-5: a novel neurotrophic factor that activates trk and trkB. **Neuron.**, v. 7, n. 5, p. 857-66, Nov. 1991.

BISAGLIA, M. et al. Molecular characterization of dopamine-derived quinones reactivity toward NADH and glutathione: implications for mitochondrial dysfunction in Parkinson disease. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1802, n. 9, p. 699-706, Sep. 2010.

BISWAS, A. K. et al. Plasmodium falciparum uses gC1qR/HABP1/p32 as a receptor to bind to vascular endothelium and for platelet-mediated clumping. **PLoS Pathog.**, v. 3, n. 9, p. 1271-80, Sep. 2007.

BOCCHINI, V. Changes in glial fibrillary acidic protein and karyotype during culturing of two cell lines established from human glioblastoma multiforme. **Cell. Tissue Res.**, v. 265, p. 73-81, 1991.

BOLTON, J. L.; DUNLAP, T. Formation and Biological Targets of Quinones: Cytotoxic versus Cytoprotective Effects. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 30, n. 1, p. 13-37, Jan. 2017.

BOLTON, J. L. et al. Role of quinones in toxicology. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 13, n. 3, p. 135-160, Mar. 2000.

BOUHET, S. et al. The mycotoxin fumonisin B1 alters the proliferation and the barrier function of porcine intestinal epithelial cells. **Toxicol. Sci.**, v. 77, n. 1, p. 165-171, Jan. 2004.

BOUKHARY, R. et al. Anti-Inflammatory and Antioxidant Activities of Salvia fruticosa: An HPLC Determination of Phenolic Contents. **Evid. Based Complement Alternat Med.**, v. 2016, p. 7178105, 2016.

BOVERI, M. et al. Induction of blood-brain barrier properties in cultured brain capillary endothelial cells: comparison between primary glial cells and C6 cell line. **Glia**, v. 51, n. 3, p. 187-198, Aug. 2005.

BREEDVELD, P.; BEIJNEN, J. H.; SCHELLENS, J. H. Use of P-glycoprotein and BCRP inhibitors to improve oral bioavailability and CNS penetration of anticancer drugs. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 27, n. 1, p. 17-24, Jan. 2006.

BRESGEN, N. et al. Astrocytes are more resistant than cerebral endothelial cells toward geno- and cytotoxicity mediated by short-term oxidative stress. **J. Neurosci. Res.**, v. 84, n. 8, p. 1821-1828, Dec. 2006.

BROUX, B.; GOWING, E.; PRAT, A. Glial regulation of the blood-brain barrier in health and disease. **Semin. Immunopathol.**, v. 37, n. 6, p. 577-590, Nov. 2015.

BUDNI, J. et al. The involvement of BDNF, NGF and GDNF in aging and Alzheimer's disease. **Aging Dis.**, v. 6, n. 5, p. 331-341, Sep. 2015.

BUNGERT, S.; MOLDAY, L. L.; MOLDAY, R. S. Membrane topology of the ATP binding cassette transporter ABCR and its relationship to ABC1 and related ABCA transporters: identification of N-linked glycosylation sites. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 26, p. 23539-46, Jun. 2001.

CABEZAS, R. et al. Astrocytic modulation of blood brain barrier: perspectives on Parkinson's disease. **Front. Cell. Neurosci.**, v. 8, p. 211, 2014.

CALATOZZOLO, C. et al. Expression of drug resistance proteins Pgp, MRP1, MRP3, MRP5 and GST-pi in human glioma. **J. Neurooncol.**, v. 74, n. 2, p. 113-121, Sep. 2005.

CASTRO, M. G. et al. Gene therapy and targeted toxins for glioma. **Curr. Gene Ther.**, v. 11, n. 3, p. 155-180, Jun. 2011.

CECHELLI, R. et al. Modelling of the blood-brain barrier in drug discovery and development. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 6, n. 8, p. 650-661, Aug. 2007.

CHAITANYA, G. V.; MINAGAR, A.; ALEXANDER, J. S. Neuronal and astrocytic interactions modulate brain endothelial properties during metabolic stresses of in vitro cerebral ischemia. **Cell. Commun Signa.**, v. 12, p. 7, 2014.

CHI, A. S. et al. Angiogenesis as a therapeutic target in malignant gliomas. **Oncologist.**, v. 14, n. 6, p. 621-636, Jun. 2009.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Anal Biochem.**, v. 162, n. 1, p. 156-159, Apr. 1987.

COOKSON, M. R.; PENTREATH, V. W. Alterations in the glial fibrillary acidic protein content of primary astrocyte cultures for evaluation of glial cell toxicity. **Toxicol. In Vitro**, v. 8, n. 3, p. 351-359, Jun. 1994.

CORREA, F. et al. Activated microglia decrease histone acetylation and Nrf2-inducible anti-oxidant defence in astrocytes: restoring effects of inhibitors of HDACs, p38 MAPK and GSK3beta. **Neurobiol. Dis.**, v. 44, n. 1, p. 142-151, Oct. 2011.

COURT, M. H. et al. Interindividual variability in acetaminophen glucuronidation by human liver microsomes: identification of relevant acetaminophen UDP-glucuronosyltransferase isoforms. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 299, n. 3, p. 998-1006, Dec. 2001.

CROCKER, S. J. et al. A novel method to establish microglia-free astrocyte cultures: comparison of matrix metalloproteinase expression profiles in pure cultures of astrocytes and microglia. **Glia**, v. 56, n. 11, p. 1187-1198, Aug. 2008.

DAVIS, S. et al. alpha-Tocopherols modify the membrane dipole potential leading to modulation of ligand binding by P-glycoprotein. **J. Lipid Res.**, v. 56, n. 8, p. 1543-1550, Aug. 2015.

DAUCHY, S. et al. ABC transporters, cytochromes P450 and their main transcription factors: expression at the human blood-brain barrier. **J. Neurochem.**, v. 107, n. 6, p. 1518-1528, Dec 2008.

DAWLING, S. et al. Catechol-O-methyltransferase (COMT)-mediated metabolism of catechol estrogens: comparison of wild-type and variant COMT isoforms. **Cancer Res.**, v. 61, n. 18, p. 6716-6722, Sep. 2001.

DE JESUS, E. E. et al. Role of IFN-gamma and LPS on neuron/glia co-cultures infected by *Neospora caninum*. **Front. Cell. Neurosci.**, v. 8, p. 340, 2014.

DE OLIVEIRA, D. M. et al. Catechol cytotoxicity in vitro: induction of glioblastoma cell death by apoptosis. **Hum. Exp. Toxicol.**, v. 29, n. 3, p. 199-212, Mar. 2010.

DEMEULE, M. et al. Drug transport to the brain: key roles for the efflux pump P-glycoprotein in the blood-brain barrier. **Vascul. Pharmacol.**, v. 38, n. 6, p. 339-348, Jun. 2002.

DEMEULE, M. et al. Involvement of the low-density lipoprotein receptor-related protein in the transcytosis of the brain delivery vector angiopep-2. **J. Neurochem.**, 106, 1534–1544. 2008.

DENKINS, Y. et al. Brain metastases in melanoma: roles of neurotrophins. **Neuro Oncol.**, v. 6, n. 2, p. 154-165, Apr. 2004.

DE OLIVEIRA, D. M. et al. Catechol cytotoxicity in vitro: induction of glioblastoma cell death by apoptosis. **Hum. Exp. Toxicol.**, v. 29, n. 3, p. 199-212, Mar. 2010.

DEORAH, S. et al. Trends in brain cancer incidence and survival in the United States: Surveillance, Epidemiology, and End Results Program, 1973 to 2001. **Neurosurg. Focus**, v. 20, n. 4, p. E1, 2006.

DI, L. et al. Comparison of blood-brain barrier permeability assays: in situ brain perfusion, MDR1-MDCKII and PAMPA-BBB. **J. Pharm. Sci.**, v. 98, n. 6, p. 1980-1991, Jun. 2009.

DRINGEN, R.; HIRRLINGER, J. Glutathione pathways in the brain. **Biol. Chem.**, v. 384, n. 4, p. 505-16, Apr. 2003.

EISENHOFER, G.; KOPIN, I. J.; GOLDSTEIN, D. S. Catecholamine metabolism: a contemporary view with implications for physiology and medicine. **Pharmacol. Rev.**, v. 56, n. 3, p. 331-349, Sep. 2004.

EHRlich, P. Das Sauer stof fbedürfnis des Organismus. **Eine Farbenanalytische Studie**. Berlin: Hirschwald, 1885.

EL-BACHA, R. S.; MINN, A. Drug metabolizing enzymes in cerebrovascular endothelial cells afford a metabolic protection to the brain. **Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)**, v. 45, n. 1, p. 15-23, Feb. 1999.

EL-BACHA, R. S.; NETTER, P.; MINN, A. Mechanisms of apomorphine cytotoxicity towards rat glioma C6 cells: protection by bovine serum albumin and formation of apomorphine-protein conjugates. **Neurosci. Lett.**, v. 263, n. 1, p. 25-28, Mar. 1999.

ENG, L. F.; GHIRNIKAR, R. S.; LEE, Y. L. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). **Neurochem. Res.**, v. 25, n. 9-10, p. 1439-1451, Oct. 2000..

ENGELHARDT, B.; SOROKIN, L. The blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: function and dysfunction. **Semin. Immunopathol.**, v. 31, n. 4, p. 497-511, Nov. 2009.

ERNFORS, P. et al. Identification of cells in rat brain and peripheral tissues expressing mRNA for members of the nerve growth factor family. **Neuron**, v. 5, n. 4, p. 511-526, Oct. 1990.

ETHELL, B. T.; ANDERSON, G. D.; BURCHELL, B. The effect of valproic acid on drug and steroid glucuronidation by expressed human UDP-glucuronosyltransferases. **Biochem. Pharmacol.**, v. 65, n. 9, p. 1441-149, May. 2003.

FAHNESTOCK, M. et al. The precursor pro-nerve growth factor is the predominant form of nerve growth factor in brain and is increased in Alzheimer's disease. **Mol. Cell. Neurosci.**, v. 18, n. 2, p. 210-220, Aug. 2001.

FERGUSON, C. S.; TYNDALE, R. F. Cytochrome P450 enzymes in the brain: emerging evidence of biological significance. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 32, n. 12, p. 708-714, Dec. 2011.

FERNANDES, S. P. et al. Inactivation of astrocytic glutamine synthetase by hydrogen peroxide requires iron. **Neurosci. Lett.**, v. 490, n. 1, p. 27-30, Feb. 18 2011.

FREESE, C. et al. Uptake and cytotoxicity of citrate-coated gold nanospheres: Comparative studies on human endothelial and epithelial cells. **Part. Fibre Toxicol.**, v. 9, p. 23, Jul. 03 2012.

FRUEHAUF, J. P. et al. In vitro drug response and molecular markers associated with drug resistance in malignant gliomas. **Clin. Cancer Res.**, v. 12, n. 15, p. 4523-4532, Aug. 2006.

GAILLARD, P. J.; VISSER, C. C.; DE BOER, A. G. Targeted delivery across the blood-brain barrier. **Expert Opin. Drug Deliv.**, v. 2, n. 2, p. 299-309, Mar. 2005.

GERENU, G. et al. Modulation of BDNF cleavage by plasminogen-activator inhibitor-1 contributes to Alzheimer's neuropathology and cognitive deficits. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1863, n. 4, p. 991-1001, Apr. 2017.

GOTTLIEB, R. A. Mitochondria and apoptosis. **Biol. Signals Recept.**, v. 10, n. 3-4, p. 147-161, May-Aug. 2001.

GRADINARU, D. et al. Effect of oxidative stress on UDP-glucuronosyltransferases in rat astrocytes. **Toxicol. Lett.**, v. 213, n. 3, p. 316-324, Sep. 18 2012.

_____. UDP-glucuronosyltransferase in the rat olfactory bulb: identification of the UGT1A6 isoform and age-related changes in 1-naphthol glucuronidation. **Neurochem. Res.**, v. 24, n. 8, p. 995-1000, Aug. 1999.

GRASSO, S. et al. Effect of lipoic acid and alpha-glycerol-phosphoryl-choline on astroglial cell proliferation and differentiation in primary culture. **J. Neurosci. Res.**, v. 92, n. 1, p. 86-94, Jan. 2014.

GROSSMAN, X. Y. et al. Current survival statistics for patients with newly diagnosed glioblastoma treated with radiation and temozolomide on research studies in the United States. **Atividade quimiossensibilizante e antitumoral in vitro do 8-metoxipsoraleno, um novo inibidor da glutatona s-transferase- π .** **J. Clin. Oncol.**, v. 27, p. 2443-2449, 2009.

GUPTA, S. et al. Saturated long-chain fatty acids activate inflammatory signaling in astrocytes. **J. Neurochem.**, v. 120, n. 6, p. 1060-1071, Mar. 2012.

HACHEY, D. L. et al. Sequential action of phase I and II enzymes cytochrome p450 1B1 and glutathione S-transferase P1 in mammary estrogen metabolism. **Cancer Res.**, v. 63, n. 23, p. 8492-8499, Dec. 2003.

HAORAH, J. et al. Stabilization of superoxide dismutase by acetyl-l-carnitine in human brain endothelium during alcohol exposure: novel protective approach. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 51, n. 8, p. 1601-1609, Oct. 2011.

HARDWICK, J. P. et al. PPAR/RXR Regulation of Fatty Acid Metabolism and Fatty Acid omega-Hydroxylase (CYP4) Isozymes: Implications for Prevention of Lipotoxicity in Fatty Liver Disease. **PPAR Res.**, p. 1-20, 2009.

HARRIS, K. L. et al. Bioaccessibility of polycyclic aromatic hydrocarbons: relevance to toxicity and carcinogenesis. **Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.**, v. 9, n. 11, p. 1465-1480, Nov. 2013.

HAWKINS, B. T.; DAVIS, T. P. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. **Pharmacol. Rev.**, v. 57, n. 2, p. 173-185, Jun. 2005.

HAWKINS, R. A. et al. Structure of the blood-brain barrier and its role in the transport of amino acids. **J. Nutr.**, v. 136, n. 1 Suppl, p. 218s-26s, Jan. 2006.

HAYES, J. D.; FLANAGAN, J. U.; JOWSEY, I. R. Glutathione transferases. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 45, p. 51-88, 2005.

HEDLUND, E.; GUSTAFSSON, J. A.; WARNER, M. Cytochrome P450 in the brain; a review. **Curr. Drug Metab.**, v. 2, n. 3, p. 245-263, Sep. 2001.

HELMS, H. C. et al. In vitro models of the blood-brain barrier: An overview of commonly used brain endothelial cell culture models and guidelines for their use. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, Feb. 2016.

HERTZ, L., Functional interactions between neurons and astrocytes i. Turnover and metabolism of Putative amino acid transmitters **Progr. Neurobiol.**, v. 13, p. 277-323, 1979.

HEURTAUX, T. et al. Redox state alteration modulates astrocyte glucuronidation. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 37, n. 7, p. 1051-1063, Oct. 2004.

HEYDEL, J. et al. Rat olfactory bulb and epithelium UDP-glucuronosyltransferase 2A1 (UGT2A1) expression: in situ mRNA localization and quantitative analysis. **Brain Res. Mol. Brain Res.**, v. 90, n. 1, p. 83-92, May. 2001.

HONDA, S. et al. Rat primary cultured microglia express glial cell line-derived neurotrophic factor receptors. **Neurosci. Lett.**, v. 275, n. 3, p. 203-206, Nov. 1999.

HUBER, C. P. P-glycoprotein and multidrug resistance: structure-activity relationships of modulators. In: MARUIAMA, C. H.; ALMEIDA, W. P. **Química Nova**, v. 33, p. 2148-2154, 2010.

HURST, R. D.; FRITZ, I. B. Properties of an immortalised vascular endothelial/glioma cell co-culture model of the blood-brain barrier. **J. Cell. Physiol.**, v. 167, n. 1, p. 81-88, Apr. 1996.

HUTAMEKALIN, P. et al. Effect of nicotine and polyaromatic hydrocarbons on cerebral endothelial cells. **Cell. Biol. Int.**, v. 32, n. 2, p. 198-209, Feb. 2008.

IGARASHI, Y. et al. Glial cell line-derived neurotrophic factor induces barrier function of endothelial cells forming the blood-brain barrier. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 261, n. 1, p. 108-112, Jul. 1999.

ITO, K. et al. Apical/basolateral surface expression of drug transporters and its role in vectorial drug transport. **Pharm. Res.**, v. 22, n. 10, p. 1559-1577, Oct. 2005.

JACOBS, V. L. et al. Current review of in vivo GBM rodent models: emphasis on the CNS-1 tumour model. **ASN Neuro**, v. 3, n. 3, p. e00063, 2011.

KALINOWSKA-LYSZCZARZ, A.; LOSY, J. The role of neurotrophins in multiple sclerosis-pathological and clinical implications. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 13, n. 10, p. 13713-13725, Oct. 2012.

KAMIICHI, A. et al. Establishment of a new conditionally immortalized cell line from human brain microvascular endothelial cells: a promising tool for human blood-brain barrier studies. **Brain Res.**, v. 1488, p. 113-122, Dec. 2012.

KANG, Y. et al. Brain gamma-glutamyl cysteine synthetase (GCS) mRNA expression patterns correlate with regional-specific enzyme activities and glutathione levels. **J. Neurosci. Res.**, v. 58, n. 3, p. 436-441, Nov. 1999.

KANNAN, R. et al. GSH transport in human cerebrovascular endothelial cells and human astrocytes: evidence for luminal localization of Na⁺-dependent GSH transport in HCEC. **Brain Res.**, v. 852, n. 2, p. 374-382, Jan. 2000.

KAPCZINSKI, F. et al. Increased oxidative stress as a mechanism for decreased BDNF levels in acute manic episodes. **Rev. Bras. Psiquiatr.**, v. 30, n. 3, p. 243-245, Sep. 2008.

KARLSSON, O. et al. Protein association of the neurotoxin and non-protein amino acid BMAA (beta-N-methylamino-L-alanine) in the liver and brain following neonatal administration in rats. **Toxicol. Letters**, v. 226, n. 1, p. 1-5, Apr. 2014.

KLEIHUES, P. et al. The WHO classification of tumors of the nervous system. **J Neuropathol. Exp. Neurol.**, v. 61, n. 3, p. 215-225, Mar. 2002.

KOLAROW, R. et al. BDNF-induced nitric oxide signals in cultured rat hippocampal neurons: time course, mechanism of generation, and effect on neurotrophin secretion. **Front Cell. Neurosci.**, v. 8, p. 1-12. art. 323, 2014.

KYRKANIDES, S. et al. TNF α and IL-1 β mediate intercellular adhesion molecule-1 induction via microglia-astrocyte interaction in CNS radiation injury. **J. Neuroimmunol.**, v. 95, n. 1-2, p. 95-106, 1999.

KRABBE, K. S. et al. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and type 2 diabetes. **Diabetologia**, v. 50, n. 2, p. 431-438, Feb. 2007.

KRUH, G. D.; BELINSKY, M. G. The MRP family of drug efflux pumps. **Oncogene**, v. 22, n. 47, p. 7537-7352, Oct. 2003.

KUCHLER-BOPP, S. et al. Astrocytes induce several blood-brain barrier properties in non-neural endothelial cells. **Neuroreport**, v. 10, n. 6, p. 1347-1353, Apr. 1999.

LAGRANGE, P. et al. Transendothelial permeability changes induced by free radicals in an in vitro model of the blood-brain barrier. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 27, n. 5-6, p. 667-72, Sep. 1999.

LAQUINTANA, V. et al. New strategies to deliver anticancer drugs to brain tumors. **Exp. Opin. Drug Deliv.**, v. 6, n. 10, p. 1017-1032, Oct. 2009.

LEHRBACH, D. M.; NITA, M. E.; CECCONELLO, I. Molecular aspects of esophageal squamous cell carcinoma carcinogenesis. **Arq. Gastroenterol.**, v. 40, n. 4, p. 256-61, Oct-Dec. 2003.

LEE, R. et al. Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. **Science**, v. 294, n. 5548, p. 1945-1948, Nov. 2001.

LIMA, R.M.F, et al Cytotoxic effects of catechol to neuroblastoma N2a cells. **Gen. Physiol. Biophys.**, 27, 306–314; 2008).

LI, Z. et al. Conditioned medium from neural stem cells inhibits glioma cell growth. **Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)**, v. 62, n. 12, p. 68-73, Oct. 31 2016.

LI, T. et al. Camelid single-domain antibodies: A versatile tool for in vivo imaging of extracellular and intracellular brain targets. **J. Control, Release**, v. 243, p. 1–10, 2016.

LI-MIN, M. et al. Lipid vesicles containing transferrin receptor binding peptide TfRT12 and octa-arginine conjugate stearyl-R8 efficiently treat brain glioma along with glioma stem cells. **Scientific Rep.**, v. 7, p. 3487, jun. 2017.

LIN, H. et al. Transport of anti-allergic drugs across the passage cultured human nasal epithelial cell monolayer. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v. 26, n. 2, p. 203-210, Oct. 2005.

LIU, W. et al. Brain derived neurotrophic factor in newly diagnosed diabetes and prediabetes. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 429, p. 106-113, Jul. 2016.

LOO, T. W.; CLARKE, D. M. P-glycoprotein ATPase activity requires lipids to activate a switch at the first transmission interface. **Biochem. Biophys. Res. Commun**, v. 472, n. 2, p. 379-383, Apr. 2016.

LOSCIUTO, S. et al. An efficient method to limit microglia-dependent effects in astroglial cultures. **J. Neurosci. Meth.**, v. 207, n. 1, p. 59-71, May. 30 2012.

- LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v. 193, n. 1, p. 265-275, Nov. 1951.
- MANSUR, R. B. et al. Inter-relation between brain-derived neurotrophic factor and antioxidant enzymes in bipolar disorder. **Bipolar Disord.**, v. 18, n. 5, p. 433-439, Aug. 2016.
- MECHA, M. et al. An easy and fast way to obtain a high number of glial cells from rat cerebral tissue: A beginners approach. **Nature**, 2011. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/protex.2011.218> >.
- MELIKIAN, A. A. et al. The role of nitric oxide on DNA damage induced by benzene metabolites. **Oncol. Rep.**, v. 19, n. 5, p. 1331-1337, May 2008.
- MELO, F. H. et al. Antidepressant-like effect of carvacrol (5-Isopropyl-2-methylphenol) in mice: involvement of dopaminergic system. **Fundam. Clin. Pharmacol.**, v. 25, n. 3, p. 362-367, Jun. 2011.
- MERCIER, C. et al. P-glycoprotein (ABCB1) but not multidrug resistance-associated protein 1 (ABCC1) is induced by doxorubicin in primary cultures of rat astrocytes. **J. Neurochem.**, v. 87, n. 4, p. 820-830, Nov. 2003.
- MEYER, R. P. et al. Expression and function of cytochrome p450 in brain drug metabolism. **Curr. Drug Metab.**, v. 8, n. 4, p. 297-306, May 2007.
- MIKSYS, S. et al. Smoking, alcoholism and genetic polymorphisms alter CYP2B6 levels in human brain. **Neuropharmacology**, v. 45, n. 1, p. 122-132, Jul. 2003.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, Dec. 1983.
- MOTAMEDI, S.; KARIMI, I.; JAFARI, F. The interrelationship of metabolic syndrome and neurodegenerative diseases with focus on brain-derived neurotrophic factor (BDNF): Kill two birds with one stone. **Metab. Brain Dis.**, p 651-665 Mar. 2017.
- MULDOON, L.L. et al. Immunologic privilege in the central nervous system and the blood-brain barrier. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, v. 33, p. 13-21, 2012.
- NAKADA, M. et al. Molecular targets of glioma invasion. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 64, n. 4, p. 458-478, Feb. 2007.
- NAKASHASHI, T. et al. Vascular endothelial cells synthesize and secrete brain-derived neurotrophic factor. **FEBS Lett.**, v. 470, n. 2, p. 113-117, Mar. 2000.
- NAKAZAWA, T. et al. Attenuated glial reactions and photoreceptor degeneration after retinal detachment in mice deficient in glial fibrillary acidic protein and vimentin. **Invest Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 48, n. 6, p. 2760-2768, Jun. 2007.
- NAPOLITANO, A.; MANINI, P.; D'ISCHIA, M. Oxidation chemistry of catecholamines and neuronal degeneration: an update. **Curr. Med. Chem.**, v. 18, n. 12, p. 1832-1845, 2011.

NAVARATNA, D. et al. Decreased cerebrovascular brain-derived neurotrophic factor-mediated neuroprotection in the diabetic brain. **Diabetes**, v. 60, n. 6, p. 1789-1796, Jun. 2011.

NIMMERJAHN, A.; KIRCHHOFF, F.; HELMCHEN, F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. **Science**, v. 308, n. 5726, p. 1314-1318, May. 2005.

NISHIYAMA, T. et al. UDP-glucuronosyltransferases 1A6 and 1A10 catalyze reduced menadione glucuronidation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 371, n. 2, p. 247-250, Jun. 2008.

NWAOZUZU, O. M.; SELLERS, L. A.; BARRAND, M. A. Signalling pathways influencing basal and H₂O₂-induced P-glycoprotein expression in endothelial cells derived from the blood-brain barrier. **J. Neurochem.**, v. 87, n. 4, p. 1043-1051, Nov. 2003.

NYKJAER, A. et al. Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death. **Nature**, v. 427, n. 6977, p. 843-848, Feb. 2004.

OLIVE, P. L. Impact of the comet assay in radiobiology. **Mutat. Res.**, v. 681, n. 1, p. 13-23, Jan-Feb. 2009.

Organismo Mus musculus PDB ID: 3G60 (ABCB1). Disponível em: <http://www.rcsb.org>
Acesso: dez. 2017.

OTTEN, U. et al. Cytokines and neurotrophins interact in normal and diseased states. **Ann. NY Acad. Sci.**, v. 917, p. 322-330, 2000.

PELEKANOS, M. et al. Establishing sheep as an experimental species to validate ultrasound-mediated blood-brain barrier opening for potential therapeutic interventions. **Theranostics**. 3;8(9):2583-2602. Apr. 2018.

PAN, W. et al. Stroke upregulates TNF α transport across the blood-brain barrier. **Exp. Neurol.**, v. 198, n. 1, p. 222-233, Mar. 2006.

_____. Neuroinflammation facilitates LIF entry into brain: role of TNF. **Am. J. Physiol. Cell. Physiol.**, v. 294, n. 6, p. C1436-1442, Jun. 2008.

PAOLINELLI, R. et al. The molecular basis of the blood brain barrier differentiation and maintenance. Is it still a mystery? **Pharmacol. Res.**, v. 63, n. 3, p. 165-171, Mar. 2011.

PARDRIDGE, W.M. et al. Human insulin receptor monoclonal antibody undergoes high affinity binding to human brain capillaries in vitro and rapid transcytosis through the blood-brain barrier in vivo in the primate. **Pharm. Res.**, v.12, p. 807-816, 1995.

PARDRIDGE, W. M. Blood-brain barrier drug targeting: the future of brain drug development. **Mol. Interv.**, v. 3, n. 2, p. 90-105, 51, Mar. 2003.

PARSONS, D. W. et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. **Science**, v. 321, n. 5897, p. 1807-1812, Sep. 2008.

PATEL, M. et al. Amino acid prodrug of quinidine: An approach to circumvent P-glycoprotein mediated cellular efflux. **Int. J. Pharm.**, v. 464, n. 1-2, p. 196-204, Apr. 2014.

PEKNY, M.; PEKNA, M. Astrocyte reactivity and reactive astrogliosis: costs and benefits. **Physiol. Rev.**, v. 94, n. 4, p. 1077-1098, Oct. 2014.

PEREIRA, M. R. G. et al. Cytotoxicity of catechol towards human glioblastoma cells via superoxide and reactive quinones generation. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 40, p. 80-85, 2004.

PEZET, S. et al. Reversal of neurochemical changes and pain-related behavior in a model of neuropathic pain using modified lentiviral vectors expressing GDNF. **Mol. Ther.**, v. 13, n. 6, p. 1101-1109, Jun. 2006.

PICADA, J. N. et al. DNA damage in brain cells of mice treated with an oxidized form of apomorphine. **Brain Res. Mol. Brain Res.**, v. 114, n. 1, p. 80-85, May. 26 2003.

PINHEIRO, A. M. et al. Astroglial cells in primary culture: a valid model to study *Neospora caninum* infection in the CNS. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 113, n. 1-2, p. 243-247, Sep. 15 2006.

_____. *Neospora caninum*: infection induced IL-10 overexpression in rat astrocytes in vitro. **Exp. Parasitol.**, v. 112, n. 3, p. 193-197, Mar. 2006.

_____. *Neospora caninum*: early immune response of rat mixed glial cultures after tachyzoites infection. **Exp. Parasitol.**, v. 124, n. 4, p. 442-447, Apr. 2010.

_____. Host/parasite relationship in the in vitro infection of rat gliocytes by *Neospora caninum*: evaluation of cell respiration. **Res. Vet. Sci.**, v. 83, n. 1, p. 27-29, Aug. 2007.

POLLER, B. et al. Regulation of BCRP (ABCG2) and P-glycoprotein (ABCB1) by cytokines in a model of the human blood-brain barrier. **Cell. Mol. Neurobiol.**, v. 30, n. 1, p. 63-70, Jan. 2010.

PRESS, B.; DI GRANDI, D. Permeability for intestinal absorption: Caco-2 assay and related issues. **Curr. Drug. Metab.**, v. 9, n. 9, p. 893-900, Nov 2008.

RAJAN, N. et al. Preparation of ready-to-use, storable and reconstituted type I collagen from rat tail tendon for tissue engineering applications. **Nat. Protoc.**, v. 1, n. 6, p. 2753-2758, 2006.

RENAULT-MIHARA, F. et al. Spinal cord injury: emerging beneficial role of reactive astrocytes' migration. **Int. J. Biochem. Cell. Biol.**, v. 40, n. 9, p. 1649-1653, 2008.

RICKERT, U. et al. Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor Family Members Reduce Microglial Activation via Inhibiting p38MAPKs-Mediated Inflammatory Responses. **J. Neurodegener Dis.**, v. 2014, p. 369-468, 2014.

ROBEL, S. et al. Genetic deletion of *cdc42* reveals a crucial role for astrocyte recruitment to the injury site in vitro and in vivo. **J. Neurosci.**, v. 31, n. 35, p. 12471-12482, Aug. 2011.

ROSE, C. F.; VERKHRATSKY, A.; PARPURA, V. Astrocyte glutamine synthetase: pivotal in health and disease. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 41, n. 6, p. 1518-1524, Dec. 2013.

ROSS, P. K. et al. Time-course comparison of xenobiotic activators of CAR and PPARalpha in mouse liver. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 235, n. 2, p. 199-207, Mar. 2009.

RUBIN, L. L. The blood-brain barrier in and out of cell culture. **Curr. Opin. Neurobiol.**, v. 1, n. 3, p. 360-363, Oct. 1991.

RUIJTERS, E. J. et al. Food-Derived Bioactives Can Protect the Anti-Inflammatory Activity of Cortisol with Antioxidant-Dependent and -Independent Mechanisms. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 17, n. 2, p. 239, Feb. 2016.

SAKAI, K. et al. Mitochondrial reactive oxygen species reduce insulin secretion by pancreatic beta-cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 300, n. 1, p. 216-222, Jan. 2003.

SAKAKIBARA, Y. et al. Effects of beta-Naphthoflavone on Ugt1a6 and Ugt1a7 Expression in Rat Brain. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 39, n. 1, p. 78-83, 2016.

SANCHEZ-HERNANDEZ, Y. et al. Store-operated Ca(2+) entry is expressed in human endothelial progenitor cells. **Stem Cells Dev.**, v. 19, n. 12, p. 1967-1981, Dec. 2010.

SANO, Y. et al. Establishment of a new conditionally immortalized human brain microvascular endothelial cell line retaining an in vivo blood-brain barrier function. **J. Cell. Physiol.**, v. 225, n. 2, p. 519-528, Nov. 2010.

SAU, A. et al. Glutathione transferases and development of new principles to overcome drug resistance. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 500, n. 2, p. 116-122, Aug. 2010.

SAUNDERS, N. R. et al. The rights and wrongs of blood-brain barrier permeability studies: a walk through 100 years of history. **Front. Neurosci.**, v. 8, p. 404, 1-24, 2014.

SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. **Nat. Protoc.**, v. 3, n. 6, p. 1101-1108, 2008.

SETSHEDI, M.; WANDS, J. R.; MONTE, S. M. Acetaldehyde adducts in alcoholic liver disease. **Oxid. Med. Cell. Longev.**, v. 3, n. 3, p. 178-185, May-Jun. 2010.

SHAWAHNA, R.; DECLEVES, X.; SCHERRMANN, J. M. Hurdles with using in vitro models to predict human blood-brain barrier drug permeability: a special focus on transporters and metabolizing enzymes. **Curr. Drug. Metab.**, v. 14, n. 1, p. 120-136, Jan. 2013.

SHILOH, Y. ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. **Nat. Rev. Cancer**, v. 3, n. 3, p. 155-168, Mar. 2003.

SIDDHARTHAN, V. et al. Human astrocytes/astrocyte-conditioned medium and shear stress enhance the barrier properties of human brain microvascular endothelial cells. **Brain Res.**, v. 1147, p. 39-50, May. 2007.

SINGH, N. P. et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp. Cell. Res.**, v. 175, n. 1, p. 184-191, Mar. 1988.

SMEYNE, M.; SMEYNE, R. J. Glutathione metabolism and Parkinson's disease. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 62, p. 13-25, Sep. 2013.

SORDI, V. et al. Establishment, characterization and long-term culture of human endocrine pancreas-derived microvascular endothelial cells. **Cytotherapy**, v. 19, n. 1, p. 141-152, Jan. 2017.

STRANGE, R. C. et al. Glutathione-S-transferase family of enzymes. **Mutat. Res.**, v. 482, n. 1-2, p. 21-26, Oct. 2001.

STUPP, R. et al. Frequently asked questions in the medical management of high-grade glioma: a short guide with practical answers. **Ann. Oncol.**, v. 19 Suppl 7, p. 209-216, Sep. 2008.

SUAREZ, I.; BODEGA, G.; FERNANDEZ, B. Glutamine synthetase in brain: effect of ammonia. **Neurochem. Int.**, v. 41, n. 2-3, p. 123-142, Aug-Sep. 2002.

SUI, Y.-T. et al. Alpha synuclein is transported into and out of the brain by the blood-brain barrier. **Peptides**, v. 62, p. 197-202, 2014.

TICE, R. R. et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environ. Mol. Mutagen.**, v. 35, n. 3, p. 206-221, 2000.

TOGNA, A. R. et al. In vitro morphine metabolism by rat microglia. **Neuropharmacology**, v. 75, p. 391-398, Dec. 2013.

TSAI, K. K. et al. Cellular mechanisms for low-dose ionizing radiation-induced perturbation of the breast tissue microenvironment. **Cancer Res.**, v. 65, n. 15, p. 6734-6744, Aug. 2005.

TSUCHIYA, Y. et al. Human CYP1B1 is regulated by estradiol via estrogen receptor. **Cancer Res.**, v. 64, n. 9, p. 3119-3125, May. 1 2004.

TSUKITA, S.; FURUSE, M.; ITOH, M. Multifunctional strands in tight junctions. **Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.**, v. 2, n. 4, p. 285-293, Apr. 2001.

UniProtKB - P43245 (MDR1_RAT). Disponível em: <http://ncbi.nlm.nih.gov>. Acesso: dez. 2017.

VAN MEER, G.; SIMONS, K. The function of tight junctions in maintaining differences in lipid composition between the apical and the basolateral cell surface domains of MDCK cells. **Embo. j.**, v. 5, n. 7, p. 1455-1464, Jul. 1986.

VELLUCCI, S. V.; PARROTT, R. F.; MIMMACK, M. L. Down-regulation of BDNF mRNA, with no effect on trkB or glucocorticoid receptor m RNAs, in the porcine hippocampus after acute dexamethasone treatment. **Res. Vet. Sci.**, v. 70, n. 2, p. 157-162, Apr. 2001.

VERKHRATSKY, A.; NEDERGAARD, M.; HERTZ, L. Why are astrocytes important? **Neurochem. Res.**, v. 40, n. 2, p. 389-401, Feb. 2015.

VILANOVA, B. et al. Formation mechanism of glyoxal-DNA adduct, a DNA cross-link precursor. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 98, p. 664-675, May. 2017.

VILLELA, I. V. et al. DNA damage and repair in haemolymph cells of golden mussel (*Limnoperna fortunei*) exposed to environmental contaminants. **Mutat. Res.**, v. 605, n. 1-2, p. 78-86, Jun. 2006.

VON WEDEL-PARLOW, M.; WOLTE, P.; GALLA, H. J. Regulation of major efflux transporters under inflammatory conditions at the blood-brain barrier in vitro. **J. Neurochem.**, v. 111, n. 1, p. 111-118, Oct. 2009.

VON WEYMARN, L. B. et al. Effects of 8-methoxypsoralen on cytochrome P450 2A13. **Carcinogenesis**, v. 26, n. 3, p. 621-629, Mar. 2005.

WAKAMATSU, K. et al. Reduction of the nitro group to amine by hydroiodic acid to synthesize o-aminophenol derivatives as putative degradative markers of neuromelanin. **Molecules**, v. 19, n. 6, p. 8039-8050, Jun. 2014.

WALKER, D. G. et al. Expression of the proto-oncogene Ret, a component of the GDNF receptor complex, persists in human substantia nigra neurons in Parkinson's disease. **Brain Res.**, v. 792, n. 2, p. 207-217, May. 1998.

WANG, J. et al. The Effects of Copper on Brain Microvascular Endothelial Cells and Claudin Via Apoptosis and Oxidative Stress. **Biol. Trace Elem. Res.**, v. 174, n. 1, p. 132-141, Nov. 2016.

WANG, S. W. et al. Rutin inhibits beta-amyloid aggregation and cytotoxicity, attenuates oxidative stress, and decreases the production of nitric oxide and proinflammatory cytokines. **Neurotoxicology**, v. 33, n. 3, p. 482-290, Jun. 2012.

WASSMER, S. C. et al. Platelets potentiate brain endothelial alterations induced by Plasmodium falciparum. **Infect. Immun.**, v. 74, n. 1, p. 645-653, Jan. 2006.

WATSON, M. D., et al., Modelling the endothelial blood-CNS barriers: a method for the production of robust in vitro models of the rat blood-brain barrier and blood-spinal cord barrier. **BMC Neuroscience**, v. 14, p. 59, 2013.

WEN, P. Y.; KESARI, S. Malignant gliomas in adults. **N. Engl. J. Med.**, v. 359, n. 5, p. 492-507, Jul. 2008.

WICK, W. et al. Pathway inhibition: emerging molecular targets for treating glioblastoma. **Neuro Oncol.**, v. 13, n. 6, p. 566-579, Jun. 2011.

WILLCOX, J. K.; ASH, S. L.; CATIGNANI, G. L. Antioxidants and prevention of chronic disease. **Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.**, v. 44, n. 4, p. 275-295, 2004.

WILLIS, C. L. Glia-induced reversible disruption of blood-brain barrier integrity and neuropathological response of the neurovascular unit. **Toxicol. Pathol.**, v. 39, n. 1, p. 172-185, Jan. 2011.

WITT, K. A. et al. Peptide drug modifications to enhance bioavailability and blood-brain barrier permeability. **Peptides**, v. 22, n. 12, p. 2329-2343, Dec. 2001.

WOLBURG, H.; LIPPOLDT, A. Tight junctions of the blood-brain barrier: development, composition and regulation. **Vascul. Pharmacol.**, v. 38, n. 6, p. 323-337, Jun. 2002.

WONG, D.; DOROVINI-ZIS, K.; VINCENT, S. R. Cytokines, nitric oxide, and cGMP modulate the permeability of an in vitro model of the human blood-brain barrier. **Exp. Neurol.**, v. 190, n. 2, p. 446-455, Dec. 2004.

WU, S. et al. Transport of glial cell line-derived neurotrophic factor into liposomes across the blood-brain barrier: in vitro and in vivo studies. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 15, n. 3, p. 3612-3623, Feb. 2014.

YAGER, J. D.; LIEHR, J. G. Molecular mechanisms of estrogen carcinogenesis. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 36, p. 203-232, 1996.

YAO, L. et al. An updated pooled analysis of glutathione S-transferase genotype polymorphisms and risk of adult gliomas. **Asian. Pac. J. Cancer Prev.**, v. 13, n. 1, p. 157-163, 2012.

YOUNG, R. K.; VILLALOBOS, A. R. A. Stress-induced stimulation of choline transport in cultured choroid plexus epithelium exposed to low concentrations of cadmium. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 306, n. 5, p. R291-R303, Mar. 2014.

ZAFAR, K. S.; SIEGEL, D.; ROSS, D. A potential role for cyclized quinones derived from dopamine, DOPA, and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid in proteasomal inhibition. **Mol. Pharmacol.**, v. 70, n. 3, p. 1079-1086, Sep. 2006.

ZANETTA, L., et al., Expression of von willebrand factor, an endothelial cell marker, is up-regulated by angiogenesis factors: a potential method for objective assessment of tumor angiogenesis. **Int. J. Cancer**, v. 85, p.281–288, 2000.

ZANGAR, R. C.; DAVYDOV, D. R.; VERMA, S. Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 199, n. 3, p. 316-331, Sep. 15 2004.

ZHANG, L. et al. Interception of benzo[a]pyrene-7,8-dione by UDP glucuronosyltransferases (UGTs) in human lung cells. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 26, n. 10, p. 1570-1578, Oct. 2013.

ZHANG, X. et al. Glioblastoma multiforme: Molecular characterization and current treatment strategy (Review). **Exp. Ther Med.**, v. 3, n. 1, p. 9-14, Jan. 2012.

ZINCHUK, V.; GROSSENBACHER-ZINCHUK, O. Recent advances in quantitative colocalization analysis: focus on neuroscience. **Prog. Histochem. Cytochem.**, v. 44, n. 3, p. 125-172, 2009.



Universidade Federal da Bahia
 Instituto de Ciências da Saúde (ICS)
 Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-ICS)



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa de protocolo número **067/2014**, intitulado **“Estudo da interação parácrina entre células endoteliais cerebrovasculares e gliais em modelos, *in vitro*, de barreira hematoencefálica”**, sob a responsabilidade do Professor Doutor Ramon El-Bachá, lotada no setor de Biorregulação do Instituto de Ciências da Saúde (ICS), Universidade Federal da Bahia (UFBA), está de acordo com as exigências legais atuais para experimentação animal e com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL), tendo sido **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências da Saúde (CEUA-ICS) em **12 de setembro de 2014**.

Salvador, 12 de setembro de 2014.

Profª Dra. Tania Tavares Rodriguez

Coordenadora da CEUA-ICS

Profª. Tânia Tavares Rodrigues
 Coordenadora da CEUA-ICS
 Instituto de Ciências da Saúde - UFBA

16-09-14