

KAREN RENATA MATOS OLIVEIRA

**ALTERAÇÕES NEUROQUÍMICAS NO TECIDO RETINIANO MURINO EM
MODELO DE MALÁRIA CEREBRAL INDUZIDA PELA INFECÇÃO POR
Plasmodium berghei (ANKA)**

Belém

2011

KAREN RENATA MATOS OLIVEIRA

**ALTERAÇÕES NEUROQUÍMICAS NO TECIDO RETINIANO MURINO EM
MODELO DE MALÁRIA CEREBRAL INDUZIDA PELA INFECÇÃO POR
Plasmodium berghei (ANKA)**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará, área de concentração Neurociências, como requisito final para obtenção do Grau de Doutor em Neurociências e Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. José Luiz Martins do Nascimento.

Belém
Julho/ 2011

Oliveira, Karen Renata Matos.

Alterações Neuroquímicas no Tecido Retiniano Murino em Modelo de Malária Cerebral Induzida pela Infecção por *Plasmodium berghei* (ANKA) / Karen Renata Matos Oliveira - Belém, 2011.

Orientador: Prof. Dr. José Luiz Martins do Nascimento

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Pará. Instituto de Ciências Biológicas. Área de Concentração: Neurociências. Linha de Pesquisa: Neuroquímica da Retina - Malária Cerebral

KAREN RENATA MATOS OLIVEIRA

**ALTERAÇÕES NEUROQUÍMICAS NO TECIDO RETINIANO MURINO EM
MODELO DE MALÁRIA CEREBRAL INDUZIDA PELA INFECÇÃO POR
Plasmodium berghei (ANKA)**

Banca Examinadora:

**Prof. Dra. Adelaide da Conceição Fonseca Passos
Centro Universitário do Estado do Pará - CESUPA**

**Prof. Dr. Juarez Antônio Simões Quaresma
Núcleo de Medicina Tropical - UFPA**

**Prof. Dr. Rommel Mario Rodríguez Burbano
Instituto de Ciências Biológicas - UFPA**

Belém, 21 de Julho de 2011

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Neuroquímica Molecular e Celular, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Pará, com auxílio financeiro da FAPESPA (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Pará), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

Dedico esta Tese,

Às minhas queridas “mães”, Dora, Fátima e Lene, que sempre estiveram ao meu lado, torcendo pelo meu sucesso e me mostrando que as grandes batalhas da vida são enfrentadas com serenidade e humildade. Pelo amor e apoio incondicional em todos os momentos, e principalmente, por terem me ensinado o conceito de responsabilidade, dignidade, coragem, objetividade e respeito. A vocês, a quem amo muito, ofereço a minha vitória.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e por me sustentar em cada passo desta longa e difícil caminhada.

Ao meu Orientador, por quem tenho uma grande admiração, Prof. Dr. José Luiz Martins do Nascimento, pela oportunidade de realizar este trabalho tão desafiador e pela confiança em mim depositada durante todos esses anos.

À Dr. Marinete Marins Pova, por ter cedido a cepa ANKA de *Plasmodium berghei* para a realização desta pesquisa.

A toda minha família, Walcyr, Esdras, Suzana, Marize, Marcela, Juliana, Deuza e Iracy, que de diferentes maneiras me acompanharam durante esta jornada. Muito obrigada pelas orações e pela certeza de não estar sozinha, o que me dá forças para seguir qualquer caminho. Amo vocês.

A minha eterna e confidente “irmã”, Isa. Você foi sem dúvida foi um dos principais alicerces desta caminhada.

À minha nova família, Luiza Herculano e Aline Herculano. Obrigada pelas orações e pelo apoio.

Ao meu grande amor, Herculano, pelas imensas e essenciais contribuições para a realização deste trabalho. Pelo amor e companheirismo de sempre, mesmo quando isso significava ir comigo ao laboratório nos finais de semana, feriados, final de ano, etc. O pouco que sei aprendi com o muito que você me ensinou. Você é o exemplo do grande cientista que um dia eu pretendo me tornar.

À minha grande amiga Adelaide, pela amizade verdadeira, incentivo e colaboração em todos os momentos deste trabalho.

Aos colegas do LNMC, principalmente a técnica Neidiane Ramos, pela paciência e apóio durante a realização de sucessivos e exaustivos experimentos.

Aos amigos do LNE que se tornaram muito mais que companheiros de trabalho. Obrigado pelos momentos agradáveis e descontraídos vividos nestes últimos anos. Um obrigado em especial a aluna Luana Ketlen que me auxiliou na realização de muitos experimentos e no cuidado dos animais.

Ao meu querido amigo Waldiney. Meu companheiro de doutorado, blotting, imuno, Elisa, etc. Foi muito divertido e gratificante compartilhar esta experiência com você.

Ao meu grande amigo Luis Antônio, pelas “intermináveis” discussões a cerca do trabalho.

Às minhas amigas, Eliane e Sheyla, que apesar de terem me abandonado no doutorado estarão sempre nas minhas lembranças.

À Prof. Dra. Edilene Oliveira da Silva e Prof. Dra. Maria Elena Crespo-López pelas relevantes sugestões apresentadas no exame de qualificação.

À Prof. Dr. Maristela Gomes da Cunha pelas valiosas considerações na parte inicial do trabalho.

A FAPESPA, CNPq e CAPES pelo auxílio financeiro.

A Pós-Graduação de Neurociências e Biologia Celular e a Universidade Federal do Pará.

Enfim, a todos que de alguma forma me incentivaram e contribuíram para a realização deste trabalho.

Meu muito obrigada a todos!!!

“... Se o mundo é mesmo parecido com o que vejo, prefiro acreditar no mundo
do meu jeito.”

(Renato Russo)

RESUMO

A Malária Cerebral (MC) apresenta-se como uma severa complicação resultante da infecção por *Plasmodium falciparum*. Esta condição encontra-se comumente associada a disfunções cognitivas, comportamentais e motoras, sendo a retinopatia uma das mais graves conseqüências da doença. Diversos modelos experimentais já foram descritos no intuito de elucidar os mecanismos fisiopatológicos relacionados a esta síndrome, no entanto, estes ainda permanecem pouco compreendidos. Dentro deste contexto, o presente trabalho procurou investigar as alterações neuroquímicas envolvidas na patologia da MC. Os camundongos C57Bl/6 (fêmeas e machos) inoculados com $\approx 10^6$ eritrócitos parasitados (PbA) apresentaram baixa parasitemia (15-20%) com sinais clínicos evidentes como: deficiência respiratória, ataxia, hemiplegia e coma seguido de morte, condizentes com o quadro de MC. A análise no tecido retiniano demonstrou uma diminuição nos níveis de GSH com 2 dias após a inoculação. Entretanto, essa diminuição não foi tão evidente com o decorrer da infecção (4º e 6º dias após infecção). Concomitante a este aumento durante o processo infeccioso, observamos um progressivo aumento na captação de ^3H -glutamato (4º e 6º dia após infecção) por um sistema independente de Na^+ , sugerindo que o quadro de MC é responsável por um aumento na atividade de uma proteína transportadora. Dados obtidos com a imunofluorescência demonstram que além de aumentar a atividade do sistema de transporte, o quadro de MC também estimula o aumento na expressão do sistema x_{CG}^- no tecido retiniano. O presente trabalho demonstra ainda que estes eventos neuroquímicos no tecido retiniano são independentes de ativação inflamatória, visto que os níveis de TNF- α e expressão de NOS-2, apresentam-se alterados somente no tecido retiniano.

ABSTRACT

Cerebral Malaria (CM) is a severe complication resulting from *Plasmodium falciparum* infection. This condition has usually been associated with cognitive, behavioral and motor dysfunctions, being the retinopathy the most serious consequence resulting from the disease. The pathophysiology mechanisms underlying the complications of CM remain incompletely understood. Several experimental models of CM have already been developed in order to clarify those mechanisms related to this syndrome. In this context, the present work has been performed to investigate which possible neurochemistry alteration could be involved in the CM pathology. Male and female susceptible C57Bl/6 mice (6-8 week old) infected with $\approx 10^6$ parasitized red blood cells (PbA), showed a low parasitaemia (15-20%), with evident clinical signs as: respiratory failure, ataxia, hemiplegia, and coma followed by animal death. In parallel to the clinical characterization of CM, retinal analysis demonstrated that the disease led to a decrease in the glutathione levels with 2 days post inoculation. However, this decrease was not so evident with the course of the infection (4^o and 6^o days post- infection). We further demonstrated that the increase in the glutathione levels during the infection is followed by the increase in the ³H-glutamate uptake rate (4^o and 6^o days post-infection), suggesting that CM condition causes an up-regulation of the transporters systems. Immunofluorescence data demonstrated that besides the activity increases, CM condition also stimulated the increase of the x_{CG}^- system expression in the retinal tissue. Furthermore, our findings also highlighted that in the retina the neurochemistries alterations occurs in a manner independent on the establishment of an inflammatory response, once TNF- α levels and NOS-2 expression were altered only in the cerebral tissue.

LISTA DE ABREVIATURAS

- BHE** - Barreira hematoencefálica
- BSA** - albumina bovina sérica
- CaCl₂** - cloreto de cálcio
- CCG** - camada de células ganglionares
- CD** - grupos de diferenciação tipo 36
- CLAE** - Cromatografia Líquida de Alta Eficácia
- CNE** - camada nuclear externa
- CNI** - camada nuclear interna
- CPE** - camada plexiforme externa
- CPI** - camada plexiforme interna
- DMEM** - Dulbecco's modified Eagles's medium
- DTNB** - ácido-5,5-ditiobis-2,2-nitrobenzóico
- EAATs** - transportadores de aminoácidos excitatórios
- EDTA** - ácido diaminotetracético
- ELISA** - ensaio imunoenzimático (Enzyme-Linked Immuno Sorbert Assay)
- GR** - glutatona redutase
- GSH** - glutatona
- HRP** - peroxidase
- H₂O₂** - peróxido de hidrogênio
- IL-10** - interleucina 10
- IL-1** - interleucina 1
- INF-γ** - interferon γ
- KCl** - cloreto de potássio
- LiCl** - cloreto de lítio
- LT-α** - linfotoxina-α
- MC** - malária cerebral
- MgCl₂** - cloreto de magnésio
- NaCl** - cloreto de sódio
- NADPH** - Nicotinamida adenina dinucleotídeo
- NaOH** - hidróxido de sódio
- NO** - óxido nítrico
- NOS2** - óxido nítrico sintase induzida

O₂⁻ - ânions superóxido
OH⁻ - radicais hidroxilas
OPA - orto-oftaldeído
P.A. - metanol absoluto
Pb - *Plasmodium berghei*
PbA - cepa ANKA de *Plasmodium berghei*
PBS - solução salina com tampão fosfato
PFA - paraformaldéido
PfEMP1 - proteínas *Plasmodium berghei*
ROS - espécies reativas de oxigênio
SDS - Dodecil sulfato de sódio
SNC - Sistema Nervoso Central
TCA - ácido tricloroacético
TGF-β - fator de crescimento transformante β
TNB - ácido nitrobenzóico
TNF-α - fator de necrose tumoral α
TMB - tetrametilbenzidina
ICAM - moléculas de adesão intercelular
VCAM - moléculas de adesão vascular

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mapa da prevalência e distribuição geográfica mundial dos casos clínicos de malária. Fonte: WHO, 2009; WHO, 2010. ----- 3

Figura 2: Ciclo evolutivo do *Plasmodium falciparum* em humanos. Fonte: Adaptado de Miller et al., 2002. ----- 7

Figura 3: Mecanismo de citoaderência de eritrócitos parasitados na microvasculatura cerebral, levando a obstrução do fluxo sanguíneo no quadro de malária cerebral. Fonte: Adaptado de Chen et al., 2000. ----- 10

Figura 4: Mecanismos envolvidos na degeneração do endotélio vascular e dos astrócitos próximos aos vasos sanguíneos no quadro de malária cerebral murina. ----- 20

Figura 5: Sinapse glutamatérgica. Sistemas de transporte de glutamato (sistemas X_{AG}^- e X_{CG}^-) e síntese de glutatona no tecido retiniano. Adaptado de Liu et al., 2008. ----- 26

Figura 6: Representação da estrutura laminar da retina, destacando a presença das células de Müller, astrócitos e microglia. Fonte: Adaptado de Bramall et al., 2010. ----- 33

Figura 7a: Curva de sobrevivência dos camundongos C57Bl/6 infectados com a cepa PbA. Os animais foram inoculados com $\approx 10^6$ de eritrócitos parasitados. MC- representa os camundongos que não desenvolveram malária cerebral e MC+ representa os que desenvolveram malária cerebral. (n = 15 animais por grupo). ----- 51

Figura 7b: Incidência do quadro de malária cerebral nos grupos de camundongos C57Bl/6 infectados com a cepa PbA. Os animais foram inoculados com $\approx 10^6$ de eritrócitos parasitados. MC- representa os

camundongos que não desenvolveram malária cerebral e MC+ representa os que desenvolveram malária cerebral (n = 15 animais por grupo). ----- 52

Figura 8: Fotomicrografias de extensões sanguíneas coradas com Giemsa. 1000x. **A** - controle; **B** - 2 dias após a infecção; **C** - 6 dias após a infecção. As setas indicam as diferentes formas evolutivas do *Plasmodium*. ----- 54

Figura 9: Evolução da parasitemia em relação aos dias após a inoculação (d.p.i.) dos camundongos C57Bl/6 infectados com a cepa PbA. C57Bl/6 MC- são os camundongos que não desenvolveram malária cerebral e C57Bl/6 MC+ são os que desenvolveram malária cerebral. Dados expressos pela médias dos grupos. * p< 0,001 vs C57Bl/6 CM- (Teste t-student). ----- 55

Figura 10a: Concentração de TNF- α no cérebro de camundongos C57Bl/6 no 4^o e 6^o dia após a inoculação (d.p.i.) com a cepa PbA. Dados expressos pelas médias dos grupos. * p< 0,001 vs controle 4^o d.p.i.; ** p< 0,0001 vs controle 6^o d.p.i.; # p < 0,001 vs Infectado (PbA) 4^o d.p.i. (ANOVA, pós-teste Tukey Kramer). ----- 57

Figura 10b: Concentração de TNF- α no tecido retiniano de camundongos C57Bl/6 no 2^o, 4^o e 6^o dia após a inoculação (d.p.i.) com a cepa PbA. Dados expressos pelas médias dos grupos. “ns (não significativo)” vs controle 6^o d.p.i. (ANOVA, pós-teste Tukey Kramer). ----- 58

Figura 11: Expressão da enzima NOS-2 no cérebro e no tecido retiniano de camundongos C57Bl/6 no 6^o dia após a inoculação com a cepa PbA. CI: cérebro de animais infectados (PbA); RC: retina de animais controle; RI: retina de animais infectados (PbA). ----- 59

Figura 12: Concentração Intracelular de GSH no tecido retiniano de camundongos C57Bl/6 no 2^o, 4^o e 6^o dia após a inoculação (d.p.i.) com a cepa PbA. Dados expressos pelas médias dos grupos. *** p< 0,0001 vs controle 2^o d.p.i.; * p< 0,001 vs controle 4^o d.p.i.; # p < 0,001 vs controle 6^o d.p.i.; ** p<

0,001 vs Infectado (PbA) 2º d.p.i. (ANOVA, pós-teste Tukey Kramer). -----
----- 61

Figura 13: Captação de ^3H -glutamato dependente de Na^+ no tecido retiniano de camundongos C57Bl/6 no 2º, 4º e 6º dia após a inoculação (d.p.i.) com a cepa PbA. Dados expressos pelas médias dos grupos. * $p < 0,001$ vs controle 4º d.p.i.; ** $p < 0,0001$ vs controle 6º d.p.i. ; vs Infectado (PbA) 4º d.p.i. (ANOVA, pós-teste Tukey Kramer). ----- 63

Figura 14: Captação de ^3H -glutamato dependente (NaCl) e independente de Na^+ (LiCl) no tecido retiniano de camundongos C57Bl/6 no 6º dia após a inoculação (d.p.i.) com a cepa PbA. Dados expressos pelas médias dos grupos. * $p < 0,0001$ vs controle NaCl; # $p < 0,0001$ vs controle LiCl; ns vs Infectado (PbA) NaCl (ANOVA, pós-teste Tukey Kramer). ----- 64

Figura 15: Liberação de glutamato no tecido retiniano de camundongos C57Bl/6 no 6º dia após a inoculação (d.p.i.) com a cepa PbA. Dados expressos pelas médias dos grupos. ** $p < 0,0001$ vs controle (Teste t-student.). -----
----- 66

Figura 16: Expressão da proteína transportadora x_{CG}^- no tecido retiniano de camundongos C57Bl/6 com malária cerebral. **A:** retina de camundongos controle, x40; **B:** retina de camundongos no 6º dia após a inoculação com a cepa PbA, x40. ----- 68

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1. Introdução | 1 |
| 1.1. Considerações Gerais | 1 |
| 1.2. Aspectos Clínicos da Malária: Relação Parasita-Hospedeiro | 4 |
| 1.3. Imunopatogênese da Malária Cerebral | 8 |
| 1.4. Modelos Experimentais em Malária Cerebral | 13 |
| 1.5. Retinopatia associada à Malária Cerebral | 18 |
| 1.6. Sistema glutamatérgico e Malária Cerebral | 22 |
| 1.7. Transporte de Glutamato no SNC | 24 |
| 1.8. Estresse Oxidativo e Malária Cerebral | 28 |
| 1.9. Estrutura Morfo-Funcional do Tecido Retiniano | 30 |
| 2. Objetivos | 36 |
| 2.1 Objetivo Geral | 36 |
| 2.2. Objetivos Específicos | 36 |
| 3. Material e Métodos | |
| 3.1. Animais | 37 |
| 3.2. Cepa ANKA de Plasmodium berghei | 37 |
| 3.3. Inoculação dos camundongos C57Bl/6 com a cepa PbA | 38 |
| 3.4. Parasitemia | 39 |
| 3.5. Dosagem de TNF- α pelo método de ELISA | 40 |
| 3.6. Imunoblotting para NO-SINTASE Induzida (NOS2) | 41 |
| 3.7. Medida de Glutamina no Tecido Retiniano de Camundongos Inoculados com a cepa PbA | 43 |
| 3.8. Captação de ^3H -L-glutamato no Tecido Retiniano de Camundongos Inoculados com a cepa PbA | 44 |
| 3.9. Medida da Liberação de Glutamato por HPLC | 45 |
| 3.10. Imunofluorescência | 45 |
| 3.11. Dosagem de Proteína | 47 |
| 3.12. Análise Estatística | 47 |
| 4. Resultados | 49 |
| 4.1. Caracterização do Quadro de Malária Cerebral | 49 |
| 4.2. Parasitemia | 53 |

| | |
|--|------------|
| 4.3. Níveis de TNF- α no Cérebro e na Retina de camundongos infectados com a cepa PbA ----- | 56 |
| 4.4. Expressão da Enzima NOS induzida (NOS-2) no Cérebro e na Retina de Camundongos Infectados coma cepa PbA ----- | 59 |
| 4.5. Níveis de Glutaciona (GSH) Total na Retina de Camundongos com Malária Cerebral Experimental ----- | 60 |
| 4.6. Transporte de Glutamato na Retina de Camundongos com Malária Cerebral Experimental. ----- | 62 |
| 4.7. Liberação de Glutamato pelo Tecido Retiniano de Animais com Malária Cerebral Experimental ----- | 65 |
| 4.8. Expressão da Proteína Transportadora x_{CG}^- nos Camundongos com Malária Cerebral. ----- | 67 |
| 5. Discussão----- | 69 |
| 6. Conclusão ----- | 81 |
| 7. Referências Bibliográficas ----- | 83 |
| 8. Anexo I ----- | 100 |

1. INTRODUÇÃO

1.1. Considerações Gerais

A malária é uma doença infecciosa aguda ou crônica causada por parasitas protozoários do gênero *Plasmodium*, transmitidos ao homem pela picada do mosquito *Anopheles* (Miller et al., 2002). Esta enfermidade provavelmente surgiu no continente africano e embora pareça ser uma doença tão antiga quanto a humanidade, só foi descrita por Hipócrates no século V a.c. Também conhecida como maleita, impaludismo ou febre palustre, o termo malária deriva de “mal’aire” (mau ar, em italiano) e surgiu no século XVIII quando as manifestações da doença eram atribuídas à presença do ar “contaminado” de locais pantanosos (Tuteja, 2007; Haldar et al., 2007).

Considerada como uma das maiores endemias mundiais e um grande obstáculo ao desenvolvimento econômico de comunidades e nações, a malária apresenta taxas de morbidade e mortalidade semelhantes à de outras doenças infecciosas como tuberculose e HIV/AIDS (Hunt et al., 2006; Martins et al., 2009). Dados epidemiológicos recentes demonstram que 40% da população mundial habitam áreas de risco da doença, a qual é responsável por cerca de 300 a 500 milhões de casos clínicos por ano com mais de um milhão de mortes, principalmente de crianças abaixo dos cinco anos de idade (Snow et al., 2005; Idro et al., 2005; Sullivan, 2010).

Embora o continente africano detenha 90% dos casos, a disseminação da doença é uma realidade que preocupa autoridades de países desenvolvidos. Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2009; WHO, 2010), a malária apresenta-se amplamente distribuída em áreas de

transmissão localizadas na América do Norte (México), América Central, América do Sul (principalmente na Região Amazônica), Caribe (República Dominicana e Haiti), Ásia (Subcontinente Indiano, Sudeste Asiático e Oriente Médio), Europa Oriental e Oceania (Figura 1).

A cada ano mais de 600 mil novos casos de malária aguda são registrados no Brasil, sendo que 99% são transmitidos dentro da região Amazônica, incluindo estados como Amazonas, Roraima, Acre, Tocantins, Rondônia, Amapá e Pará (Krettli et al., 2001; Kirchgatter & Del Portillo, 2005; da Silva-Nunes et al., 2008). Apesar das campanhas de erradicação como o Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária (PIACM) na região Amazônica, a doença ainda permanece afligindo populações mais carentes.

Fatores como a migração de indivíduos para áreas endêmicas, o tratamento inadequado da infecção, a dificuldade para o acesso ao tratamento, a inexistência de uma vacina eficaz, a resistência do parasito aos antimaláricos e do vetor aos inseticidas fazem da malária uma doença de difícil controle e erradicação (Sachs & Malaney, 2002; Miller et al., 2002; Walther & Walther, 2007).

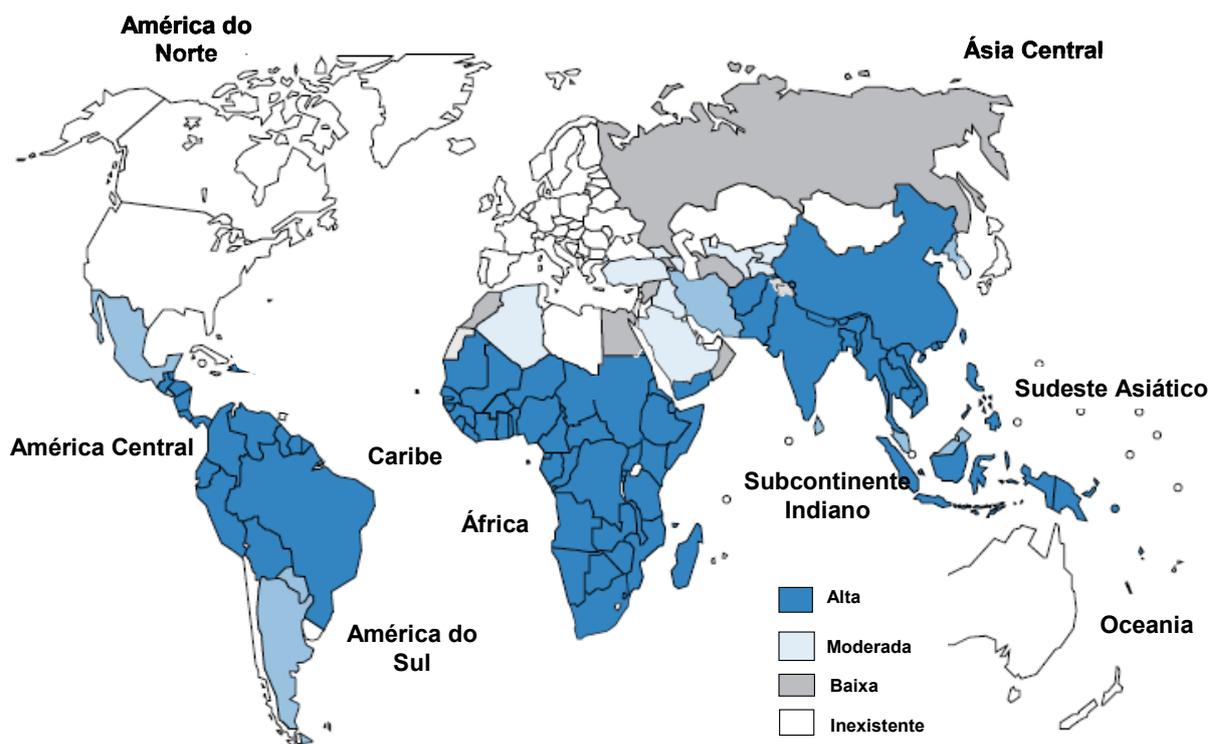


Figura 1: Mapa da prevalência e distribuição geográfica mundial dos casos clínicos de malária. Fonte: WHO, 2009; WHO, 2010.

1.2. Aspectos Clínicos da Malária: Relação Parasita-Hospedeiro

Os protozoários do gênero *Plasmodium*, da família Plasmodiidae e filo Apicomplexa representam os agentes etiológicos da malária, sendo transmitidos ao homem pela picada da fêmea de mosquitos do gênero *Anopheles* (Clark et al., 1997; de Souza & Riley, 2002). Dados na literatura relatam que mais de 200 espécies de *Plasmodium* já foram identificadas e caracterizadas, sendo capazes de infectar vários grupos de vertebrados incluindo aves, répteis, primatas e roedores (Tuteja, 2007). A descrição destas espécies tem um papel importante do ponto de vista científico, pois possibilita a utilização de modelos experimentais para a elucidação dos fenômenos biológicos associados à malária.

Somente quatro destas espécies de *Plasmodium* são infectantes ao homem: *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae* e *Plasmodium ovale* (apud. De Souza & Riley, 2002; McKenzie et al., 2008). Nas infecções causadas por *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale* predomina a forma mais branda da doença caracterizada por febre intermitente, sudorese, mal estar, vômitos e intensa debilidade física. Entretanto, as infecções por *P. falciparum* podem levar a forma mais complicada da doença, denominada de malária severa, considerada como uma patologia multisistêmica capaz de causar anemia grave, insuficiência renal aguda, edema pulmonar, hipoglicemia, colapso circulatório, acidose metabólica e malária cerebral (Miller et al., 2002).

O ciclo de vida do *Plasmodium* apresenta-se conservado em diferentes espécies que infectam mamíferos. Este ciclo compreende duas fases: a assexuada, no hospedeiro vertebrado e a sexuada, no hospedeiro invertebrado (mosquito). A infecção do hospedeiro vertebrado inicia-se com a entrada de

esporozoítas na corrente sanguínea pela picada da fêmea do mosquito *Anopheles* infectada (Tuteja, 2007). O principal vetor no Brasil, o *Anopheles darlingi*, possui hábitos antropofílicos com atividade cíclica contínua durante a noite, com picos no crepúsculo matutino e noturno (Tadei & Thatcher, 2000).

Uma vez presente na corrente sangüínea do hospedeiro vertebrado, os esporozoítos iniciam a fase assexuada do ciclo que consiste de duas diferentes fases: uma fase pré-eritrocítica e outra fase eritrocítica (Haldar et al., 2007; Tuteja, 2007).

Nos hepatócitos (fase pré-eritrocítica), os esporozoítos proliferam por 2 a 10 dias dependendo da espécie, dando origem a vários merozoítas. Durante esse período a infecção é assintomática e cada esporozoíta pode produzir cerca de 30.000 merozoítos por hepatócito infectado (Mota et al., 2001). Em seguida, os hepatócitos se rompem e os merozoítos liberados retornam a corrente sangüínea e invadem os eritrócitos (glóbulos vermelhos ou hemácias) iniciando a fase eritrocítica do ciclo. Dentro dos eritrócitos, os merozoítos passam por três diferentes estágios; anel, trofozoíta e esquizonte, sendo que cada esquizonte maduro pode conter até 20 novos merozoítos que serão liberados após a ruptura dessas células para invadir novos eritrócitos (Figura 2); (Haldar et al., 2007).

Após uma série de ciclos eritrocíticos, por um processo ainda desconhecido, parte dos merozoítos que não invadem os eritrócitos se diferencia em gametócitos, a forma infectante para o mosquito. Os gametócitos masculinos (microgametócitos) e femininos (macrogametócitos) são ingeridos pelo mosquito *Anopheles* durante a picada e se fundem no trato digestivo do inseto para formar o zigoto (fase sexuada). Estes se desenvolvem em oocistos

dando início a esporogonia. O oocisto cresce e se rompe liberando esporozoítos que migram até a glândula salivar para então serem transmitidos ao hospedeiro vertebrado, onde o ciclo se reinicia (Figura 2); (Eksi et al., 2006; Baker et al., 2010).

Os sintomas clínicos da malária são, primariamente, decorrentes da ruptura de eritrócitos parasitados, uma vez que nesta etapa ocorre a liberação na corrente sangüínea de antígenos constituintes do parasito e os formados em consequência do seu metabolismo, que causam uma intensa ativação do sistema imunológico (De Souza & Riley, 2002).

Dentre as principais manifestações clínicas da malária destacam-se os acessos febris, calafrios e cefaléia, além de sintomas como mialgia, fraqueza, náuseas e vômitos. Nos indivíduos não tratados, esses sintomas podem evoluir para um quadro de anemia, falência de órgão, malária cerebral e morte (Good et al., 2005). O desenvolvimento do quadro de malária severa está diretamente relacionado às variáveis como o nível de parasitemia e a resposta imune do hospedeiro, além da espécie de *Plasmodium* infectante (Good et al., 2005). Importante destacar que a incidência de casos de malária severa tem aumentado, muito provavelmente, devido à resistência do parasito a drogas antimaláricas disponíveis no mercado (De Souza & Riley, 2002).

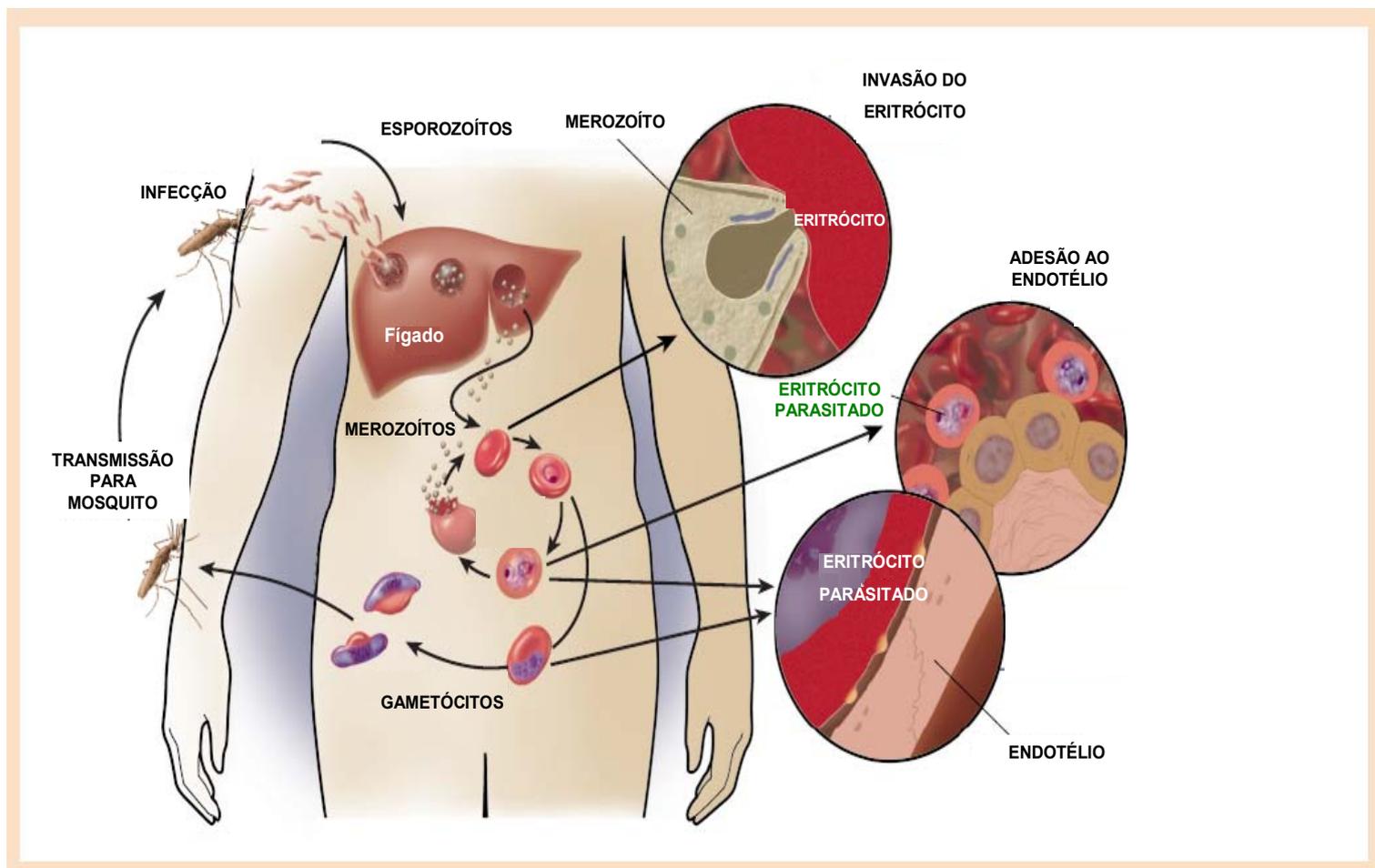


Figura 2: Ciclo evolutivo do *Plasmodium falciparum* em humanos. Fonte:

Adaptado de Miller et al., 2002.

1.3. Imunopatogênese da Malária Cerebral

A malária cerebral (MC) é a mais grave complicação resultante da infecção por *Plasmodium falciparum* e a principal causa de morte em crianças abaixo dos cinco anos de idade (Lou et al., 2001; Idro et al., 2005). O quadro de MC apresenta uma patogênese complexa, sendo definida como um estado de coma associado à complicações neurológicas provenientes de eventos hemorrágicos. As microhemorragias, por sua vez, são resultantes do seqüestro de eritrócitos parasitados na microcirculação cerebral e do conseqüente dano endotelial (Chen et al., 2000; Desruisseaux et al., 2010).

A evolução ao estado de coma é geralmente acompanhada por febre, cefaléia, convulsões, acidose metabólica e hipoglicemia, com um índice de mortalidade entre 30-50%. Os pacientes que sobrevivem à síndrome apresentam complicações neurológicas permanentes como desordens de cognição e fala, anormalidades motoras e cegueira cortical (Bondi, 1992; Marsh et al., 1996; Schofield et al., 2005).

Duas grandes teorias foram propostas para explicar a patogênese da MC. A primeira delas, a teoria da obstrução mecânica proposta por Marchiafava e Bignami em 1894 (*apud* van der Heyde et al., 2006), sugere que a MC é uma conseqüência direta da aderência de eritrócitos parasitados no endotélio cerebral que culmina com a obstrução do fluxo sangüíneo gerando um quadro de hipóxia cerebral.

Por outro lado, a teoria da inflamação proposta inicialmente por Maegraith (1948) sugere que a MC é resultado de uma exacerbada resposta imunológica, na qual citocinas apresentam um papel central, especialmente o fator de necrose tumoral α (TNF- α) e interferon γ (INF- γ); (*apud* Clark &

Rockett, 1994; van der Heyde et al., 2006). Ao longo dos anos as duas teorias vêm sendo extensivamente estudadas e discutidas, com um consenso em considerar ambas as hipóteses, uma vez que estas isoladas não são suficientes para explicar a patogênese da MC (Figura 3).

A patologia associada à MC apresenta aspectos complexos e multifatoriais. Dentre esses aspectos destaca-se o mecanismo de citoaderência de eritrócitos parasitados na microvasculatura cerebral que depende da interação de antígenos presentes na superfície dos eritrócitos parasitados (PfEMP1) com receptores do hospedeiro (CD36, trombospondina e ICAM-1); (Figura 3); (Favre et al., 1999). No cérebro, a obstrução vascular causada pela aderência dos eritrócitos no endotélio pode levar a processos isquêmicos com surgimento de hemorragias petequiais, que são os principais responsáveis pelo estado de coma na MC (Berendt et al., 1994).

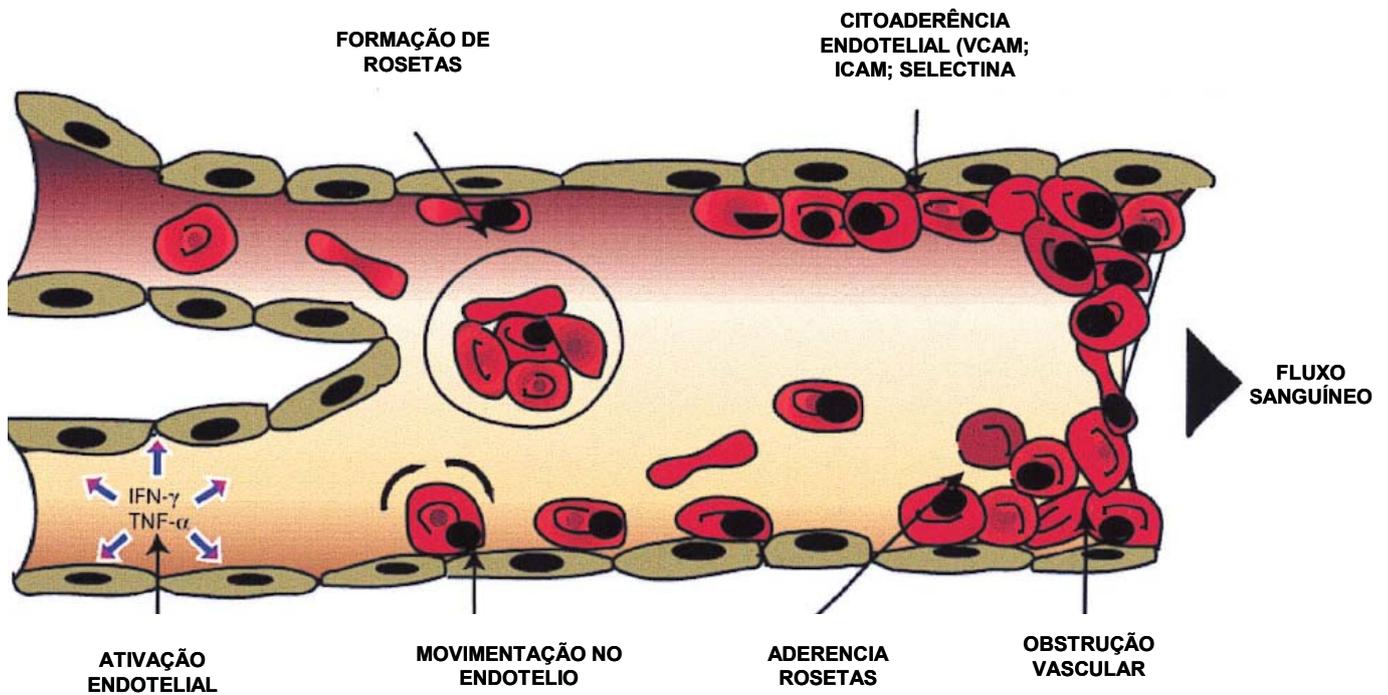


Figura 3: Mecanismo de citoaderência de eritrócitos parasitados na microvasculatura cerebral, levando a obstrução do fluxo sanguíneo no quadro de malária cerebral. Fonte: Adaptado de Chen et al., 2000.

No sistema nervoso central (SNC), o quadro de MC causa modificações nas propriedades da barreira hematoencefálica (BHE) o que permite que citocinas, antígenos da malária e células do sistema imune penetrem no compartimento cerebral, do qual normalmente estes são excluídos, provocando alterações estruturais e funcionais no parênquima cerebral como a ativação de microglia, redistribuição de células astrocitárias e danos neuronais (Ma et al., 1997; Medana et al., 2001; Adams et al., 2002; Hunt & Grau, 2003).

As alterações estruturais resultantes da quebra da BHE podem comprometer o funcionamento normal de diversas regiões do sistema nervoso central, incluindo o tecido retiniano, onde destaca-se o aparecimento de uma retinopatia acompanhada da perda de acuidade visual (Lochhead et al., 2010).

Estudos vêm ratificando que o aumento nos níveis de citocinas pró-inflamatórias também constitui um evento fundamental para o desenvolvimento e estabelecimento da MC (Brown et al., 1999; Hunt & Grau, 2003). Dentre essas citocinas, destaca-se o TNF- α secretado por macrófagos e células T CD4⁺. A produção de TNF- α na fase inicial da MC parece estar relacionada à redução na carga parasitária, no entanto a excessiva produção desta citocina na fase mais tardia está associada à severidade da doença (Omer et al, 2000). Esse papel divergente do TNF- α sugere que a regulação e o tempo de produção de citocinas pró-inflamatórias são de fundamental importância para o controle da infecção.

No quadro de MC, a excessiva produção de TNF- α e de outras citocinas pró-inflamatórias induz o aumento na expressão das moléculas de adesão intercelular como a ICAM-1 no endotélio vascular, o que potencializa o seqüestro de eritrócitos parasitado, leucócitos e plaquetas levando ao aumento

da obstrução microvascular e do quadro de hipóxia (Ma et al., 1996; Hunt & Grau, 2003).

Na MC humana, o TNF- α e seu RNAm exibiram um intenso padrão de expressão no parênquima cerebral, demonstrando que a produção local desta citocina é muito mais importante para o estabelecimento dos sintomas do que a encontrada na circulação sistêmica (Brown et al., 1999).

A liberação de citocinas anti-inflamatórias, principalmente interleucina 10 (IL-10) possui um papel protetor regulando a síntese de citocinas pró-inflamatórias em resposta ao parasito. Kossodo et al. (1997) demonstraram que a neutralização *in vivo* da IL-10 induz o aparecimento da síndrome neurológica em animais que antes eram resistentes a MC, sugerindo que esse mecanismo de proteção via liberação de citocinas anti-inflamatórias pode ser deficiente em indivíduos susceptíveis ao quadro de MC. Neste contexto, o desajuste entre o processo de liberação de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias parece ser crucial para o desenvolvimento da MC (Miranda et al., 2011).

Maneerat et al. (2000) demonstraram que a produção de citocinas pró-inflamatórias no quadro de MC pode ainda levar a expressão da enzima óxido nítrico sintase induzida (NOS-2) para a produção do mediador químico óxido nítrico pelas células do sistema imunológico. O NO uma vez sintetizado pode atravessar a BHE e causar danos nos processos relacionados à neurotransmissão. Desta forma, a ativação nitrérgica, juntamente com um quadro de parasitemia e níveis de citocinas pode representar um importante marcador dos eventos associados à MC.

A participação de outros mediadores na patogênese da MC tem sido bem descrito na literatura. Dentre esses mediadores destacam-se a linfotoxina-

α (LT- α) cuja origem celular não foi esclarecida, o fator de crescimento transformante β (TGF- β) e moléculas como as espécies reativas de oxigênio que incluem os ânions superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e os radicais hidroxilas (OH^-); (Hunt & Grau, 2003; Lapansri et al., 2003; Hunt et al., 2006).

Os eventos envolvidos na quebra da BHE, na obstrução vascular cerebral e nas falhas da homeostasia dos principais circuitos de neurotransmissão no SNC, incluindo a retina ainda permanecem pouco compreendidos dentro da patogênese da MC. Dessa forma, o cenário que emerge dos estudos clínicos realizados em humanos portadores de MC ainda necessita da realização de estudos adicionais.

1.4. Modelos Experimentais em Malária Cerebral

Apesar de inúmeras hipóteses já terem sido propostas, usando-se tanto modelos *in vivo* como modelos *in vitro*, os mecanismos relacionados à patogênese da MC ainda permanecem pouco elucidados (Combes et al., 2005; Lamb et al., 2006). Dentro deste contexto, modelos experimentais em animais vêm sendo desenvolvidos devido às dificuldades de se acompanhar e avaliar as características patológicas nos portadores de MC humana.

Dentre os modelos *in vivo* mais utilizados para estudar as complicações resultantes da MC destacam-se os modelos com primatas e roedores. Apesar desses modelos animais não reproduzirem exatamente a patologia em humanos, estes apresentam algumas similaridades como os sinais clínicos relacionados às disfunções no sistema nervoso e a patologia cerebral (Lou et al, 2001).

O modelo experimental de MC em camundongos (modelo murino) vem sendo extensivamente utilizado devido às similaridades encontradas entre as espécies infectantes para os camundongos com as espécies infectantes para o homem, além da semelhança entre as repostas imunológicas desencadeadas nos dois organismos (Combes et al., 2005). O modelo murino foi inicialmente descrito na década de 80, quando duas importantes propriedades relacionadas à MC foram identificadas neste modelo. A primeira delas foi a associação de sinais clínicos como ataxia, convulsões e coma com o seqüestro de leucócitos na microvasculatura cerebral. E a segunda, o envolvimento de células T na patologia da MC, mostrando que camundongos deficientes de células T apresentavam resistência ao quadro de MC (Rest, 1982 e Finley et al., 1982).

A grande diversidade de linhagens de camundongos associada à infecção com diferentes espécies de *Plasmodium* tem contribuído para elucidar alguns aspectos envolvidos na imunopatogênese da MC (De Souza & Riley, 2002). Os plasmódios que parasitam roedores são oriundos da África e pertencem ao subgênero *Vinckeia*. Dentro deste subgênero, existem cinco diferentes espécies parasitas de roedores: *Plasmodium atheruri*, *Plasmodium berghei*, *Plasmodium yoelii*, *Plasmodium chabaudi* e *Plasmodium vinckei*. (Wheeler et al., 2000).

Dentre essas espécies apenas o *Plasmodium berghei* e o *Plasmodium yoelii* são capazes de induzir o quadro de MC experimental. A maioria dos estudos relacionados à MC provém do modelo de infecção por *Plasmodium berghei*, por melhor reproduzir as características observadas na MC humana (Lou et al., 2001). O *Plasmodium berghei* (*P.berghei*) foi isolado em 1948, por Vincke e Lips, em glândulas salivares da espécie silvestre de *Anopheles*

dureni. Posteriormente, em 1950, o mesmo grupo descreveu a presença deste parasito no sangue de roedores silvestres *Grammomys surdaster*, *Praomys jacksoni*, e *Leggada bella* (apud Bagot et al., 2002).

Uma cepa deste parasito pode ser considerada como uma amostra retirada em uma única ocasião do seu hospedeiro natural, sendo também referida como isolado. A cepa NK 65 de *P. berghei* foi isolada em 1964, em um exemplar de *Anopholes dureni*, enquanto a cepa ANKA (ANTwerpen-KAsapa) foi isolada posteriormente, em 1966 na mesma espécie. A cepa de *P.berghei* ANKA (PbA) é mais utilizada nos modelos experimentais de MC por ativar o seqüestro de células na microcirculação, desencadeando em baixa parasitemia uma infecção letal que evolui rapidamente para um quadro de malária cerebral (Lou et al., 2001). Importante destacar que nem todas as cepas de uma mesma espécie são capazes de induzir o quadro de MC.

As diferentes linhagens de camundongos também exibem uma resposta diferencial as espécies de *Plasmodium*. Em níveis idênticos de parasitemia durante a fase aguda da infecção, algumas linhagens de camundongos são potencialmente susceptíveis ao desenvolvimento do quadro de MC, enquanto que outras são resistentes. Dentre as linhagens susceptíveis destacam-se os camundongos CBA/J, C57Bl/6 e DBA/1 e dentre as linhagens resistentes os camundongos BALB/C e A/J (Lou et al., 2001); (Tabela 1).

| ESPÉCIES PLASMODIUM | LINHAGEM CAMUNDONGO | NEUROPATOLOGIA MC+ ou MC- | SEQUESTRO MICROVASCULAR | CITOCINAS ENVOLVIDAS |
|---|--|---|---|--|
| <i>Plasmodium berghei</i> K173 | C57BL/6 | MC + | Leucócitos | INF- γ |
| <i>Plasmodium berghei</i> ANKA | CBA/J BALB-C C57BL/6 DBA/2 | MC + MC - MC + MC + (recuperação) | Eritrócitos parasitados - Leucócitos Leucócitos | TNF- α ; INF- γ - TNF-α; INF-γ - |
| <i>Plasmodium berghei</i> NK65 | C57BL/6 | MC + | Leucócitos | TNF- α ; INF- γ |
| <i>Plasmodium yoelli</i> 17XL | BALB-C DBA/2 SWISS | MC + MC - MC + | Eritrócitos parasitados - Eritrócitos parasitados | - - |
| <i>Plasmodium chabaudi</i> | CBA/J BALB-C C57BL/6 | MC - MC - MC - | - - - | - - - |

Tabela 1: Susceptibilidade de linhagens de camundongos as diferentes espécies de *Plasmodium* e características da patologia apresentada (De Souza & Riley, 2002; Combes et al., 2005). Em destaque o modelo utilizado no presente trabalho. MC+ refere-se ao grupo que desenvolve malária cerebral e MC- ao grupo que não desenvolve malária cerebral.

Nas linhagens susceptíveis a MC, os camundongos infectados com PbA desenvolvem sintomas clínicos (deficiência respiratória) e sinais neurológicos (paralisia, convulsão e coma) semelhantes aos encontrados na MC humana, morrendo entre o 6º-10º dia após a infecção, com baixas taxas de parasitemia (15-20%); (Bagot et al., 2002). Análises histopatológicas da região cerebral dos camundongos susceptíveis revelam danos vasculares, hemorragias petequiais, seqüestros de leucócitos e em menor escala o seqüestro de eritrócitos parasitados. Nas linhagens não-susceptíveis, a infecção com PbA não gera um quadro clínico de MC e os animais morrem no 19º -21º dia de anemia severa e hiperparasitemia (70-80%); (Bagot et al., 2002; De Souza & Riley, 2002).

Apesar das alterações comportamentais e das manifestações histopatológicas e imunológicas serem semelhantes em murinos e humanos com MC, existe uma importante diferença entre os dois quadros da doença: enquanto que na MC humana os eritrócitos parasitados são as principais células seqüestradas nos microvasos, no modelo murino estas células são os leucócitos (Hunt & Grau, 2003). No entanto, estudos já demonstraram o seqüestro de leucócitos na patologia da MC humana (Lou et al., 2001; Medana & Turner, 2006).

Estudos prévios vêm demonstrando que o perfil genético dos camundongos é extremamente relevante para o estabelecimento do quadro de MC (Bagot et al., 2002; Randall et al., 2008). Os fenótipos susceptíveis e resistentes a MC apresentam principalmente diferenças na intensidade da resposta imunológica, uma vez que as linhagens susceptíveis desencadeiam uma exacerbada produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α .

A marginalização de monócitos na microcirculação também parece constituir outro fator crucial para o desenvolvimento dos sintomas relacionados a MC. A ativação de macrófagos nesta região potencializa a resposta inflamatória da fase aguda secretando interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6) e TNF- α . Em resposta a esse estímulo, ocorre a intensificação do seqüestro de leucócitos uma vez que a expressão das moléculas de adesão responsáveis por esse processo são reguladas pela produção de TNF- α (Lamb et al., 2006). Nos camundongos susceptíveis a MC, demonstrou-se um aumento na sensibilidade das moléculas de adesão (ICAM-1 e VCAM-1) ao TNF- α quando comparado aos camundongos resistentes. Este efeito se deve possivelmente ao aumento da expressão dos receptores de TNF- α (TNFR1 e P75) nos camundongos susceptíveis a MC (Lou et al., 1998).

Apesar de bem caracterizado que esta patologia compromete ativamente o tecido cerebral, pouco se sabe a respeito das alterações funcionais nas demais regiões do SNC, como o tecido retiniano.

1.5. Retinopatia associada à Malária Cerebral

Dentro dos estudos relacionados à imunopatogênese da MC, uma vertente procura elucidar e caracterizar o envolvimento das células do SNC nas complicações cerebrais associadas ao quadro clínico de MC. A retina, como um importante constituinte do SNC, vem sendo extensivamente estudada uma vez que trabalhos demonstram um quadro de retinopatia associada à patologia da MC (Lewallen et al., 2008).

Em crianças com MC, o aparecimento da retinopatia também está relacionado com a obstrução dos microvasos retinianos e, conseqüentemente

com o quadro de hipóxia aguda (Beare et al., 2006; Maude et al., 2009). Dentro deste quadro patológico destacamos manifestações clínicas como o embranquecimento retiniano (macular ou periférico), descoloração dos vasos sanguíneos, hemorragias retinianas e papiloedema (Sayeed et al., 2011).

Um estudo recente realizado em crianças africanas com retinopatia resultante de MC mostra que o quadro de hipóxia aguda pode levar a alterações nos registros eletrofisiológicos no tecido retiniano (Lochhead et al., 2010), sugerindo que além de alterar o microambiente retiniano o quadro de MC também pode levar ao mau funcionamento deste tecido.

A utilização do tecido retiniano como modelo experimental se estende ainda para a elucidação do papel de células como os astrócitos e microglia na imunopatogênese da MC (Medana et al., 1996; Medana et al. 1997a).

No modelo de MC murina, uma perda na distribuição dos astrócitos é observada a partir do 3º dia após a inoculação com PbA, que progride para um quadro de astrogliose no 5º dia após a infecção. No estágio terminal da doença (7º dia após a infecção), esse quadro progride para uma intensa perda dos astrócitos em contato com o vaso sanguíneo (Medana et al., 1996). As alterações na morfologia e distribuição dos astrócitos próximos aos vasos sanguíneos estão claramente associadas à aderência de monócitos no endotélio vascular, sugerindo que metabólitos tóxicos produzidos por essas células podem exercer um papel fundamental na degeneração dos astrócitos (Medana et al., 2001); (Figura 4).

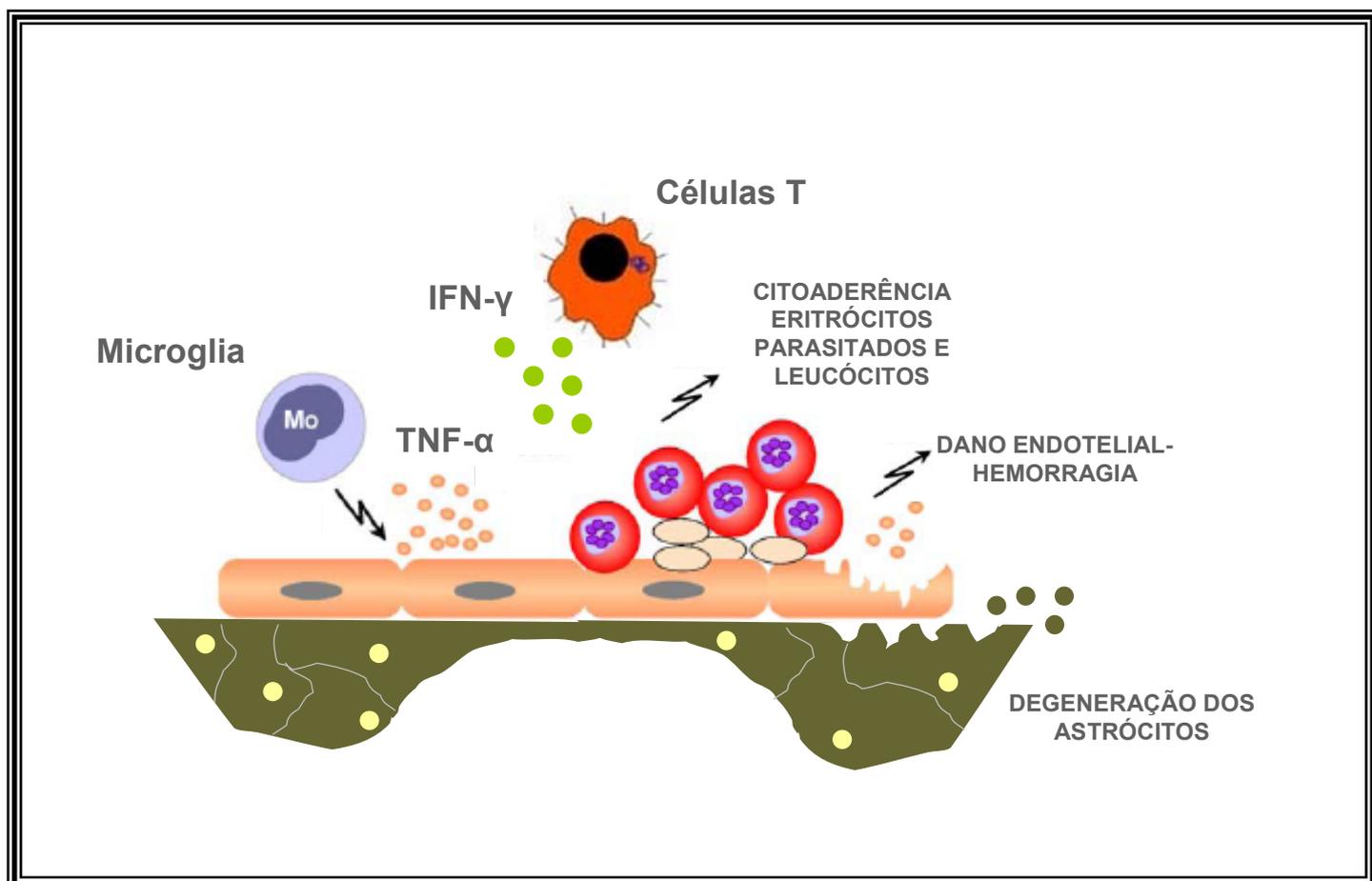


Figura 4: Mecanismos envolvidos na degeneração do endotélio vascular e dos astrócitos próximos aos vasos sanguíneos no quadro de malária cerebral murina.

Com intuito de ratificar se o processo de astrogliose e degeneração dos astrócitos na retina estão associados com as complicações cerebrais resultantes da MC, estudos adicionais foram realizados em camundongos resistentes a MC, mostrando que uma discreta perda de células astrocíticas só é detectada apenas nos estágios terminais da infecção (15^o-22^o dia após a infecção), sugerindo que este evento está diretamente associado à patologia da MC (Medana et al., 1996).

Diversos trabalhos demonstram que a perda na funcionalidade dos astrócitos pode resultar em déficits na atividade neuronal, sendo que a produção de mediadores inflamatórios pelas células da microglia pode exacerbar esse efeito (Medana et al., 1997b; Medana et al., 1997; Hunt et al., 2006).

Mudanças na distribuição e morfologia da microglia também podem ser observadas no quadro de MC. No entanto, essas mudanças no tecido retiniano já são descritas antes do aparecimento dos sintomas relacionados às complicações neurológicas e se agravam no estágio terminal de doença. As modificações presentes durante a infecção incluem retração das ramificações, expansão da região somática, aumento do aspecto amebóide e processo de vacuolização (Medana et al., 1997a).

As alterações funcionais da microglia ocorrem apenas nos estágios mais tardios da MC (Medana et al., 1997a). No entanto, pouco se sabe a respeito da funcionalidade desta célula antes do estabelecimento do processo inflamatório, assim como dos eventos neuroquímicos que antecedem esta ativação.

Enquanto a maioria dos estudos ressalta a participação dos astrócitos e da microglia no quadro de MC no tecido retiniano, poucos trabalhos

demonstram o envolvimento da glia de Müller neste processo. Este tipo celular, juntamente com os astrócitos e a microglia, constituem as principais estruturas de origem não-neuronal responsáveis pela homeostase do microambiente retiniano (Bramall et al., 2010).

Dentro deste contexto, possíveis alterações na funcionalidade destas células podem ocasionar o mau funcionamento da retina. Sabe-se que a fisiologia do tecido retiniano depende de diferentes sistemas de neurotransmissão, principalmente do sistema glutamatérgico, o qual representa a principal via excitatória do SNC. Dessa forma, torna-se justificável a realização de trabalhos que buscam estudar possíveis alterações nesses sistemas associado a patologias que acometem o tecido retiniano como a MC.

1.6. Sistema Glutamatérgico e Malária Cerebral

O aminoácido glutamato, considerado no SNC de mamíferos como principal neurotransmissor excitatório, desempenha importante papel em diversos processos fisiológicos como a transmissão sináptica e a plasticidade neuronal, envolvidos em processos cognitivos relacionados à memória e aprendizado (Shigeri et al., 2004; Benarroch, 2010). No desenvolvimento normal do SNC, o glutamato tem provável participação na indução sináptica (Quinlan et al., 1999), migração (Rossi & Slater, 1993), diferenciação e morte celular (Rabachi et al., 1992).

Na retina, a concentração de glutamato no meio extracelular (1-3 μ mol/l) é menor quando comparada ao meio intracelular, principalmente nos terminais nervosos. A manutenção da baixa concentração de glutamato na fenda sináptica consiste em um processo fisiológico necessário para o adequado

funcionamento do SNC, uma vez que a excessiva liberação desse neurotransmissor pode ativar os mecanismos relacionados à excitotoxicidade (Danbolt, 2001).

O fenômeno da excitotoxicidade é o principal responsável pela morte de células neuronais e pelo processo de neurodegeneração. Dessa forma, diversas condições que acometem o SNC (epilepsia, isquemia cerebral, retinopatia diabética e desordens degenerativas como os casos de glaucoma) estão associadas a distúrbios na homeostase do glutamato, sendo por isso relevante os estudos relacionados ao metabolismo deste aminoácido (Pacheco et al., 2007; Benarroch, 2010).

A associação do quadro de isquemia cerebral com a patogênese da MC murina fundamenta os estudos relacionados ao papel do glutamato e de outros metabólitos como lactato, alanina e glicina na patogênese desta síndrome. Recentemente, com o propósito de caracterizar um marcador neuroquímico para a MC, Miranda et al. (2010) investigaram o envolvimento do glutamato no desenvolvimento dos sintomas comportamentais associados a MC. No cérebro dos camundongos infectados com PbA, os níveis extracelulares de glutamato aumentavam significativamente apenas no 6º dia após a infecção, quando os sintomas clínicos da MC se manifestavam. Enquanto que no 3º dia após a infecção (ausência de sintomas) os níveis extracelulares desse neurotransmissor permaneciam os mesmos em relação aos animais não infectados.

Apesar destes dados sugerirem a participação do glutamato nas disfunções do SNC associada ao quadro de MC, pouco se sabe a respeito do

envolvimento do sistema de neurotransmissão glutamatérgico nesta patologia, principalmente no que diz respeito ao tecido retiniano.

1.7. Transporte de Glutamato no SNC

Estudos já demonstraram que o envolvimento do glutamato em diversas neuropatologias está intimamente associado à excessiva liberação desse neurotransmissor na fenda sináptica (O'Shea, 2002). Para evitar intensa ativação dos receptores glutamatérgicos e conseqüentemente morte da célula por excitotoxicidade, é necessário manter as concentrações extracelulares de glutamato em níveis baixos ($\cong 1\mu\text{M}$). Este controle é realizado por proteínas transportadoras, uma vez que não são encontradas enzimas extracelulares responsáveis pela metabolização do glutamato (O'Shea, 2002).

No SNC, uma variedade de sistemas de transporte já foram identificados e caracterizados, mostrando relativa afinidade por diferentes tipos de aminoácidos. Esses sistemas diferenciam-se entre si, basicamente, pela dependência ou não a determinados íons (Danbolt, 2001; Bridges & Esslinger, 2005).

No tecido retiniano, os transportadores de aminoácidos excitatórios (EAATs) são os principais responsáveis pela remoção do glutamato do espaço extracelular, e estão localizados principalmente na membrana plasmática das células gliais (astrócitos) e nos neurônios pós-sinápticos (Nicholls & Attwell, 1990; Imasawa et al., 2005; Benarroch, 2010). Os EAATs são conhecidos como transportadores de alta afinidade dependente de Na^+ e realizam a captação de aminoácidos dicarboxilados, como glutamato e aspartato por um

sistema denominado de X_{AG}^- (Bridges & Esslinger, 2005; Koch et al., 2007); (Figura 5).

Os EAATs foram isolados de uma variedade de organismos, incluindo, salamandra, humanos, camundongos e ratos (Miralles et al., 2001). Apesar de serem codificados por diferentes genes, essas proteínas apresentam quase 60% de homologia entre suas seqüências de aminoácidos e 90% de similaridade entre os homólogos de cada espécie, demonstrando intensa conservação ao longo do processo evolutivo (Beart & O'Shea, 2007; Jiang & Amara, 2011).

Em mamíferos, cinco diferentes isoformas de transportadores de glutamato foram identificados e caracterizados: EAAT1, EAAT2, EAAT3, EAAT4 e EAAT5, sendo que em roedores, os homólogos destas proteínas são denominados, respectivamente de: GLAST, GLT-1, EAAC1, EAAT4 e EAAT5. No SNC, estes transportadores apresentam localização celular e regional distinta, assim como diferentes características farmacológicas e moleculares (Danbolt et al., 1998; Seal & Amara, 1999; Benarroch, 2010).

O transporte de aminoácidos pelos EAATs é caracterizado como eletrogênico, já que apresenta-se termodinamicamente ligado ao co-transporte de, no mínimo, um ou dois íons Na^+ , um próton (H^+) e pelo contra-transporte de um íon potássio (K^+). Esse transporte está acoplado a um canal de Cl^- cuja funcionalidade ainda não foi descrita (Seal & Amara, 1999; Bridges & Esslinger, 2005).

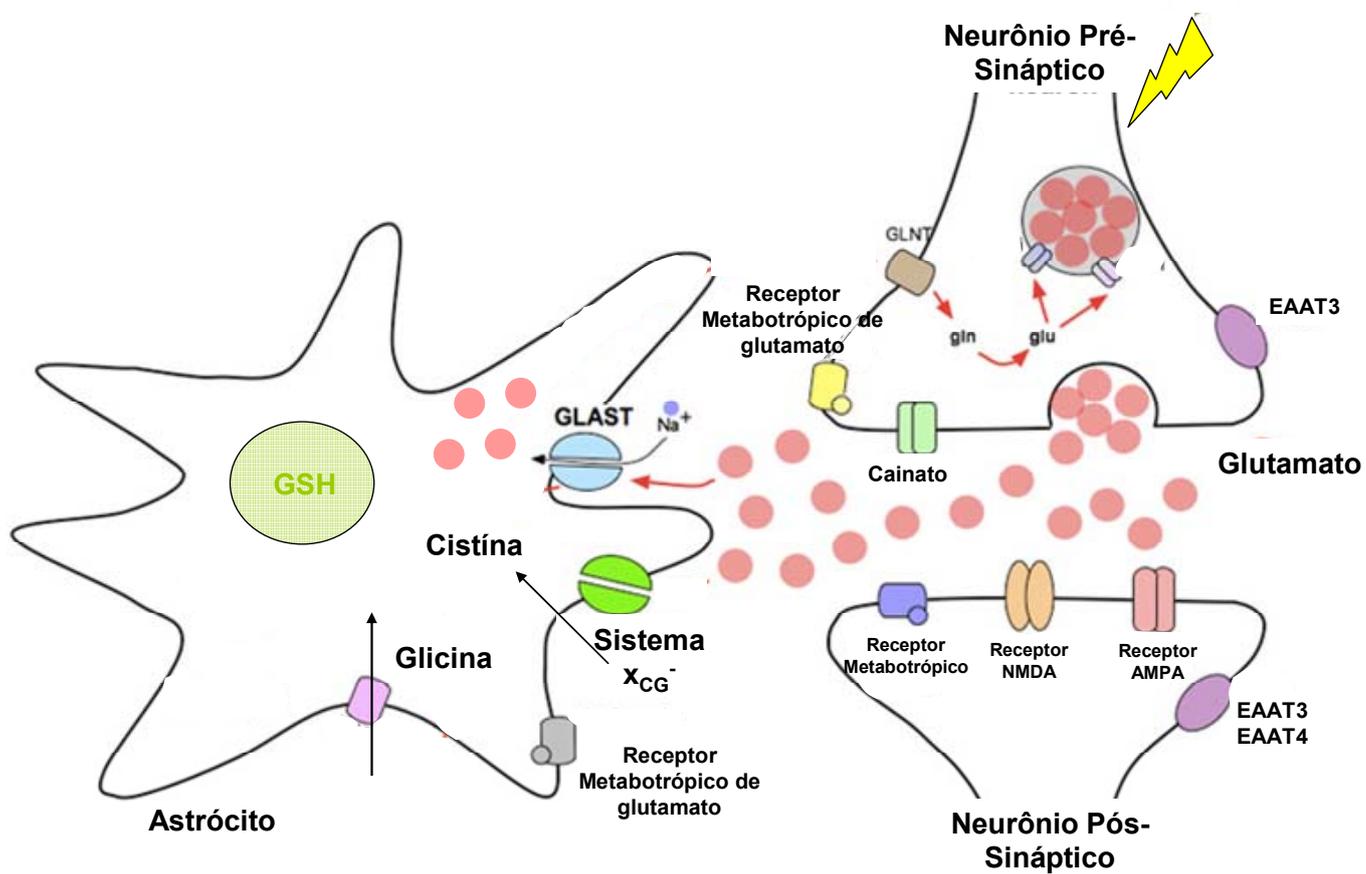


Figura 5: Sinapse glutamatérgica. Sistemas de transporte de glutamato (sistemas X_{AG}^- e X_{CG}^-) e síntese de glutathiona no tecido retiniano. Adaptado de Liu et al., 2008.

Outro mecanismo de transporte, denominado de sistema x_{CG}^- , realiza o transporte do dipeptídeo cistina, independentemente de íons, apenas com a atividade de um canal de Cl^- . Em condições fisiológicas, o transporte de cistina é acoplado a saída de uma molécula de glutamato, e devido a esta característica, alguns autores o denominam de “trocador glutamato-cistina (Figura 5). Esse modelo de transporte já foi descrito em culturas primárias de neurônios (Sagara et al., 1993), astrócitos (Allen et al., 2001) e em células da microglia (Piani & Fontana, 1994).

A desregulação dos sistemas de transporte de glutamato em condições neuropatológicas e o envolvimento da neuroinflamação em diversas desordens neuronais incentivaram diversos grupos a caracterizar a regulação dos transportadores de glutamato em resposta a estímulos inflamatórios. Muitos trabalhos foram desenvolvidos no sentido de elucidar se as alterações na captação de glutamato eram a causa ou uma consequência do processo inflamatório (Tilleux & Hermans, 2007).

Em condições patológicas, incluindo trauma cerebral, infecções virais e neuroinflamações, os astrócitos e a microglia são as principais células capazes de expressar na sua superfície o sistema de transporte independente de Na^+ (sistema x_{CG}^-) e o sistema de transporte dependente de Na^+ (sistema X_{AG}^-); (Pacheco et al., 2007). Estudos conduzidos por Hun et al. (2000) sugerem que a produção de mediadores inflamatórios podem aumentar a liberação de glutamato e diminuir sua captação por esses sistemas de transporte.

Modelos experimentais *in vitro* já associaram a inibição na captação de glutamato pelos astrócitos com a produção de citocinas pro-inflamatórias como $TNF-\alpha$ (Zou & Crews, 2005). Além da atividade, o $TNF-\alpha$ também promove uma

diminuição da expressão da proteína GLAST que constitui o principal transportador de glutamato nos astrócitos (Korn et al., 2005).

Trabalhos recentes, no entanto, demonstram que a produção de outras citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , aumentam a expressão e atividade do sistema de transporte x_{CG}^- em culturas mistas de células corticais, o que resulta em injúria neuronal devido ao aumento na liberação de glutamato (Jackman et al., 2010).

Estudos vêm demonstrando o envolvimento dos sistemas de transporte de glutamato em patologias que acometem o tecido retiniano, como os casos de retinopatia diabética (Zeng et al., 2010) e glaucoma (Park et al., 2009), no entanto nada se sabe a respeito da participação desses sistemas na retinopatia associada a MC.

Além do envolvimento em condições neuroinflamatórias, esses sistemas de transporte também participam da manutenção do estado redox da célula. Recentemente, nosso grupo demonstrou uma intensa participação do sistema de transporte independente Na^+ na captação de glutamato pelas células gliais do tecido retiniano, sugerindo que a intensa atividade do sistema x_{CG}^- neste tecido está associada ao metabolismo da molécula antioxidante glutatona (Oliveira et al., 2010).

1.8. Estresse Oxidativo e Malária Cerebral

No SNC, a síntese da molécula glutatona (GSH) representa um importante mecanismo de defesa celular frente ao processo de estresse oxidativo desencadeado em muitas neuropatologias. Esta molécula é um tripeptídeo (γ -glutamilcisteinilglicina) sintetizado pela ação consecutiva de duas

enzimas, a γ -glutamilcisteína sintetase que utiliza o glutamato e a cisteína como substrato para formar o dipeptídeo γ -glutamilcisteína (γ -GluCys), e a glutathione sintetase que adiciona ao dipeptídeo resíduos de glicina (Gln) para a formação final da molécula de glutathione. Essas reações utilizam ATP como co-substrato e apresentam um mecanismo de auto-regulação negativo (feedback negativo), em que a quantidade de glutathione formada modula a atividade da enzima γ -glutamilcisteína sintetase (Dringen et al., 2000).

No meio intracelular, a glutathione pode ser encontrada na forma oxidada (GSSG) e na forma reduzida (GSH), sendo a conversão de GSSG em GSH catalisada pela enzima glutathione redutase (GR), que utiliza NADPH como co-fator. Estudos *in vivo* e *in vitro* demonstram que os níveis de GSH são maiores nos astrócitos que nos neurônios, variando ainda, em função da região do sistema nervoso a ser estudada (Cooper & Kristal, 1997). Trabalhos anteriores demonstram que tanto o sistema x_{CG}^- como o sistema X_{AG}^- encontram-se envolvidos na regulação do metabolismo da molécula antioxidante glutathione (Figura 5); (Reichelt et al., 1997).

Na retina, a síntese de glutathione representa um importante mecanismo de defesa celular frente ao processo de estresse oxidativo. A princípio, o quadro de estresse oxidativo pode provocar perda de função celular, por causar danos a moléculas de DNA, peroxidação lipídica, modificação de proteínas e conseqüentemente morte neuronal. Dessa forma, essa condição parece estar relacionada com o desenvolvimento de inúmeras injúrias (Bains & Shaw, 1997).

Até o presente momento ainda não foi descrito o envolvimento da molécula de glutathione na patologia da MC, entretanto, trabalhos recentes

demonstraram a participação de eventos relacionados ao estresse oxidativo nesta condição. Reis et al. (2010) relataram um aumento nos níveis de peroxidação lipídica apenas no cérebro de camundongos C57Bl/6 com MC, uma vez que essas alterações não foram descritas em camundongos resistentes a MC (linhagem Balb-C) e nem em camundongos C57Bl/6 inoculados com a cepa de *Plasmodium chabaudi*, conhecida por não desencadear o quadro de MC.

Os severos danos resultantes do intenso processo de estresse oxidativo acometem as diversas regiões do SNC, entre elas, o tecido retiniano. A retina apresenta uma série de características que a torna, especialmente, vulnerável a essa condição, como: elevada taxa de consumo de oxigênio, alta concentração de ácidos graxos poliinsaturados na camada de células fotorreceptoras e constante exposição à luminosidade responsável pela peroxidação lipídica. Importante ressaltar que processos isquêmicos são muito comuns no tecido retiniano e podem contribuir ainda mais para condições de estresse oxidativo (Huster et al., 2000).

1.9. Estrutura Morfo-Funcional do Tecido Retiniano

A fim de melhor compreender o papel dos sistemas de transporte de glutamato na patologia da MC na retina, é necessário o conhecimento sobre a estrutura e função deste tecido. Embriologicamente, a retina se origina da vesícula prosencefálica, sendo, portanto, parte do SNC. Este tecido está localizado na região posterior do globo ocular, sendo o responsável pela captação e conversão da energia luminosa em atividade neural, processo esse conhecido como fototransdução. O fenômeno da fototransdução é facilitado no

tecido retiniano, devido a sua organização laminar, em que as células encontram-se dispostas em camadas (Pow, 2001a; Kolb et al., 2001).

Essa organização primária da retina apresenta-se bastante conservada entre as diferentes espécies de vertebrados, o que facilita a extensão de seus estudos e a identificação das suas células de acordo com sua localização, função, morfologia e propriedades neuroquímicas. As camadas celulares da retina são designadas com relação ao centro do globo ocular. Assim, a camada mais interna é a camada de célula ganglionares (CCG), contendo os corpos celulares das células ganglionares; em seguida a camada nuclear interna (CNI), contendo os corpos celulares das células bipolares, horizontais e amácrinas; a camada nuclear externa (CNE), contendo os corpos celulares dos fotorreceptores (cones e bastonetes) e a camada de segmentos externos dos fotorreceptores, que constituem os elementos da retina sensíveis a luz, encarregados da transdução (Ramón Y Cajal, 1892); (Figura 6).

Entre a camada de células ganglionares e a camada nuclear interna encontra-se a camada plexiforme interna (CPI), na qual se estabelecem contatos sinápticos entre células bipolares, amácrinas e ganglionares. Entre as camadas nucleares interna e externa encontra-se a camada plexiforme externa (CPE), onde os fotorreceptores estabelecem contatos sinápticos com células bipolares e horizontais (Ramón Y Cajal, 1892); (Figura 6).

Os segmentos externos dos fotorreceptores estão em contato direto com o epitélio pigmentar, especializado na absorção de qualquer raio de luz que atravesse a retina. Dessa forma, a via direta para o fluxo de informação na retina é a partir dos fotorreceptores, destes para células bipolares e, posteriormente, para células ganglionares, sendo que em cada estação

sináptica as respostas são modificadas por conexões laterais de células horizontais e amácrinas. Os impulsos gerados em resposta a luz propagam-se, via nervo óptico para o resto do encéfalo (Kolb et al., 2001).

Em diferentes espécies de vertebrados, a retina pode ser vascularizada (ex. humanos e roedores) recebendo nutrientes a partir de um sistema de vasos sanguíneos ou avascularizada (ex. coelhos e aves) recebendo suprimento pela circulação coroidal (Pow, 2001a).

Diferentes populações de células gliais são encontradas no tecido retiniano, onde destaca-se a presença da glia de Müller, de astrócitos e da microglia. Classicamente consideradas como células de suporte neuronal, o seu envolvimento com a modulação neuroquímica e fisiológica do sistema retiniano tem sido estudado com mais atenção nos últimos anos. Essas células apresentam uma distribuição diferenciada no tecido retiniano: a glia de Müller, o tipo celular mais predominante, apresenta uma orientação transversal que percorre toda a estrutura do tecido; os astrócitos são encontrados apenas na retina vascularizada, recobrando a superfície dos vasos sanguíneos e a microglia apresenta uma distribuição uniforme nas camadas plexiformes interna e externa (Figura 6); (Pow, 2001a; Carrasco et al., 2011).

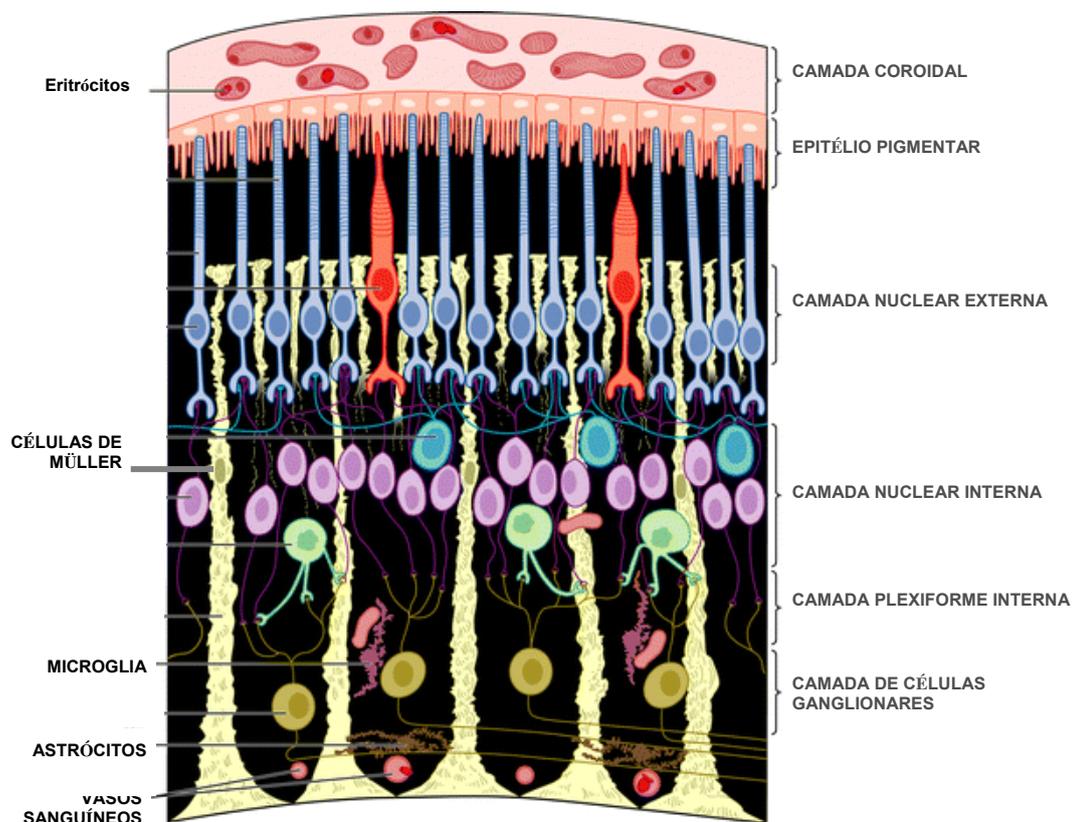


Figura 6: Representação da estrutura laminar da retina, destacando a presença das células de Müller, astrócitos e microglia. Fonte: Adaptado de Bramall et al., 2010.

Na retina, os principais aminoácidos neurotransmissores são glutamato, GABA e glicina. A ação do glutamato no SNC de vertebrados já foi bem caracterizada e o tecido retiniano, sendo um componente integral desse sistema apresenta algumas características de processamento da informação semelhante às demais regiões do SNC (Pow, 2001a).

Na retina, o glutamato é armazenado e liberado pelas células fotorreceptoras, bipolares, amácrinas e ganglionares, apresentando-se como o principal neurotransmissor excitatório responsável pelo processo de fototransdução (Rauen, 2000; Pow, 2001a). Como o glutamato representa o principal neurotransmissor no tecido retiniano, o controle dos seus níveis extracelulares é de suma importância para o processamento da informação visual proveniente do meio.

Os sistemas de transporte de glutamato já foram bem caracterizados no tecido retiniano, uma vez que estudos, utilizando a técnica de imunohistoquímica, demonstraram a presença desses transportadores nas diferentes camadas e células da retina (Rauen et al., 1996; Pow et al., 2000). O sistema X_{AG}^- apresenta uma distribuição uniforme nas diferentes camadas da retina, sendo expressos tanto em células neuronais (ex. GLT-1; EAAT5) quanto nas células gliais (ex. GLAST). O sistema x_{CG}^- , por sua vez apresenta uma distribuição mais restrita, sendo encontrado predominantemente nos astrócitos e células de Müller (Rauen, 2000; Pow, 2001b).

Por ser uma estrutura de fácil acesso, a retina é amplamente utilizada como ferramenta para o estudo de inúmeras neuropatologias associadas ao SNC. Sua estrutura laminar, fina e relativamente transparente permite a

visualização de suas células com o tecido ainda íntegro ou em cortes histológicos.

Modelos experimentais *in vitro* foram desenvolvidos a partir de células dissociadas e de explantes da retina. O último modelo, que será utilizado no presente trabalho, apresenta inúmeras vantagens metodológicas por mostrar a organização laminar (em camadas) do tecido íntegro com as interações célula-célula, constituindo uma excelente ferramenta para a caracterização de mecanismos dependentes da organização histotípica do tecido nervoso (Pow, 2001a).

A carência de estudos demonstrando o envolvimento dos diferentes sistemas de transporte de glutamato na patologia da MC no tecido retiniano impulsionou o desenvolvimento do presente trabalho, visto que estudos anteriores já caracterizaram que processos neuroinflamatórios parecem modular a expressão destes transportadores em outras áreas do SNC.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O presente trabalho tem como objetivo geral caracterizar as possíveis alterações neuroquímicas associadas aos sistemas de transporte do neurotransmissor glutamato no tecido retiniano de camundongos C57Bl/6 com malária cerebral, quando inoculados com a cepa ANKA de *Plasmodium berghei* (PbA).

2.2. Objetivos Específicos

- Determinar a sobrevivência e o nível de parasitemia dos camundongos C57Bl/6 inoculados com a cepa PbA.
- Determinar os níveis de TNF- α no cérebro e na retina de camundongos com 2, 4 e 6 dias após a inoculação com PbA.
- Avaliar a expressão da enzima NO-sintase induzida (NOS-2) no cérebro e na retina de camundongos infectados com a cepa PbA.
- Determinar os níveis de glutathiona em explantes de retina obtidos de camundongos com 2, 4 e 6 dias após a inoculação com PbA.
- Avaliar o transporte de glutamato dependente e independente de Na⁺ em explantes de retina obtidos de camundongos com 2, 4, 6 dias após a inoculação com PbA.
- Avaliar a liberação de glutamato na retina de camundongos inoculados com PbA.
- Avaliar a expressão do sistema x_{CG}⁻ em cortes histológicos obtidos da retina de camundongos infectados com a cepa PbA.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Neste estudo foram utilizados camundongos isogênicos (*Mus musculus*) da linhagem C57BL/6 (fêmeas e machos) adquiridos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP - SP). Para os grupos controle e experimental foram usados animais com idade entre 6-8 semanas (42-56 dias), pesando aproximadamente 20-25g. Os camundongos foram mantidos em gaiolas coletivas em grupos de no máximo cinco animais, em condições assépticas, com água e ração (NUVITAL) *ad libitum* e sob condições de luz (ciclo claro/escuro de 12/12 horas) e temperatura ambiente controlada. Durante a realização deste trabalho, as normas éticas para pesquisa científica com animais de laboratório foram rigorosamente aplicadas.

3.2. Cepa ANKA de *Plasmodium berghei*

Para induzir o quadro de malária cerebral foi utilizada a cepa ANKA de *Plasmodium berghei* (PbA). Uma amostra desta cepa foi, gentilmente, cedida pela Dra. Marinete Marins Póvoa, do Laboratório de Pesquisas Básicas em Malária, do Instituto de Pesquisa Evandro Chagas (Ananindeua-Pará). Alíquotas obtidas de passagens da cepa em camundongos foram criopreservadas em solução de Glicerol a 10%, sendo mantidas em nitrogênio líquido por tempo indeterminado.

3.3. Inoculação dos camundongos C57Bl/6 com a cepa PbA

Previamente a inoculação do grupo experimental, uma amostra da cepa foi descongelada e inoculada em um camundongo para uma primeira passagem com o intuito de garantir a virulência da cepa. Durante a fase de ascensão da parasitemia, em aproximadamente 10%, o conteúdo sangüíneo do camundongo é coletado por punção cardíaca e disponibilizado para a infecção dos grupos experimentais.

A coleta por punção cardíaca foi realizada com auxílio de agulha e seringa de insulina contendo heparina (5000U/ml) como agente anticoagulante e solução salina com tampão fosfato (PBS; pH 7,4). Para garantir um grau de inoculação uniforme nos diferentes grupos, os animais foram infectados intraperitonealmente (i.p) com inóculo padronizado de $\approx 10^6$ eritrócitos parasitados em 100 μ l de PBS. A quantificação de $\approx 10^6$ eritrócitos parasitados foi determinada pela contagem em câmara de Neubauer do número total de eritrócitos em suspensão pela porcentagem de parasitemia. Os camundongos controle receberam apenas 100 μ l de PBS via intraperitoneal.

O quadro de MC nos camundongos C57Bl/6 infectados com a cepa PbA foi caracterizado pelo surgimento, entre o 6^o-10^o dia após a inoculação (d.p.i.), dos sinais clínicos neurológicos que incluem: ataxia, paralisia (monoplegia, hemiplegia, paraplegia ou tetraplegia), desvio de cabeça, desorientação, convulsão e coma. Em cada grupo experimental, um ou dois camundongos infectados foram mantidos até o curso final da doença, observando-se o tempo de morte, a extensão da parasitemia e a severidade dos sintomas apresentados para garantir o grau de virulência da cepa.

Para cada grupo experimental foram utilizados no mínimo 15 animais, uma vez que 20% dos camundongos infectados poderiam, eventualmente, não apresentar o quadro clínico de malária cerebral, sendo portanto, excluídos do estudo.

3.4. Parasitemia

Para a determinação da parasitemia, distensões sangüíneas delgadas foram obtidas da cauda dos camundongos, fixadas em metanol absoluto (P.A) durante 2 minutos, e posteriormente coradas com solução de Giemsa (10%) por mais 10 minutos.

A porcentagem de parasitemia de cada animal foi determinada pela razão entre a quantidade de eritrócitos parasitados e a quantidade total de células (1000 células por distensão). As lâminas foram analisadas por microscopia de luz e fotografadas em aumento de 1000x (imersão). A contagem das células foi realizada com auxílio do programa ImageJ, o que garante com uma maior precisão a porcentagem de parasitemia de cada animal.

$$\% \text{ parasitemia} = \frac{\text{número de eritrócitos parasitados}}{1000}$$

Inicialmente, a evolução da parasitemia foi acompanhada diariamente em um grupo de 15 animais infectados até o óbito como controle positivo. Para os grupos experimentais, a parasitemia foi determinada nos 2°, 4° e 6° d.p.i. dos camundongos C57Bl/6 com a cepa PbA.

3.5. Dosagem de TNF- α pelo método de ELISA

Os níveis de TNF- α foram quantificados por ELISA (do inglês, Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) com a utilização de um Kit adquirido da empresa BioLegend (San Diego, Ca, EUA). A medida desta citocina foi determinada no tecido cerebral no 4º e 6º d.p.i. e, posteriormente no tecido retiniano no 2º, 4º e 6º d.p.i.

Para o processamento do tecido cerebral e retiniano, os camundongos controles e infectados com a cepa PbA receberam uma injeção de heparina (5000U/ml), seguida de uma injeção intraperitoneal dos anestésicos Cloridrato de Quetamina (1mg/Kg) e Cloridrato de Xilazina (1mg/Kg). Após um período de 10 minutos, uma incisão foi realizada na região torácica para retirada do conteúdo sanguíneo por punção cardíaca, permitindo uma limpeza parcial dos vasos, o que facilita a posterior dissecação dos tecidos.

Após serem devidamente dissecados em meio livre de cálcio e magnésio (CMF - calcium medium free), os tecidos foram transferidos para um tubo de ensaio contendo uma solução inibidora de protease adequada para a extração de citocinas (SIGMA). Em seguida, as amostras foram sonicadas em um homogeneizador de tecidos e centrifugadas à 5000rpm (rotações por minuto) a 4°C durante 10 minutos. O sobrenadante foi recolhido, aliquotado e estocado a -20°C até a realização da dosagem. Uma alíquota destas amostras foi separada para posterior dosagem de proteína.

Para o ensaio de dosagem do TNF- α , as placas foram inicialmente sensibilizadas com o anticorpo de captura (1:200) durante 18 horas a 4°C. Após esse período, a placa foi lavada com uma solução de PBS (0,05% Tween-20) e incubada com a solução de bloqueio por mais uma hora, em

agitação. Em seguida, após uma nova série de lavagens, as amostras foram adicionadas a reação por um período de duas horas em temperatura ambiente. Paralelamente, para o estabelecimento da curva-padrão, foram utilizadas diferentes diluições do padrão TNF- α a uma concentração inicial de 500pg/ml.

Após a incubação das amostras e da curva-padrão, uma solução do anticorpo de detecção foi adicionada por mais uma hora, seguida da solução de avidina ligada a peroxidase (HRP). Após a adição do substrato TMB, a reação foi interrompida com uma solução de ácido sulfúrico (2N). A quantidade de TNF- α em cada poço foi determinada com auxílio do leitor de microplaca em um comprimento de onda de 450nm, sendo que a concentração referente a cada amostra foi calculada a partir da curva-padrão correspondente em pg/mg de proteína e expressa em porcentagem em relação ao controle.

3.6. Immunoblotting para NO-SINTASE Induzida (NOS-2)

Para caracterizar o efeito do quadro de MC na expressão da enzima NO-SINTASE induzida (NOS-2) foi utilizada a técnica de imunodeteção ou imunoblotting (Western Blotting). Neste método, o tecido cerebral e retiniano dissecados como descrito anteriormente foram homogeneizados em solução de SDS (Dodecil sulfato de sódio) 1% e sonicados para posterior separação de 100 μ l e ressuspensos em tampão de lise (Tris-HCl 250mM pH 6.8; SDS 10%; glicerol 40%; β -mercaptoetanol 20% e azul de bromofenol 0,001%) para extração da proteína. A seguir, as amostras foram colocadas em banho-maria em ebulição (100°C) por 2 minutos.

Posteriormente, o homogenado foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) para separação das proteínas presentes na

amostra. A corrida eletroforética foi realizada com o sistema SE-600 (Amersham GE Biosciences) em uma solução de Tris-HCl 25mM; Glicina 250mM, SDS 0,1% e metanol absoluto. Na primeira etapa, as amostras foram aplicadas (20µg por poço) diretamente no gel de poliacrilamida 3,5% (proporção de acrilamida/bisacrilamida) e a voltagem mantida em 60V durante 30 minutos para que as proteínas atingissem ao mesmo tempo no gel de poliacrilamida de separação 7,5%. Na segunda etapa, uma amperagem fixa de 30mA foi aplicada até a linha de frente da corrida alcançar o final do gel de fracionamento. Padrões de pesos moleculares também foram utilizados para determinar a mobilidade relativa das proteínas.

Após a eletroforese, as proteínas fracionadas no gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Amersham Bioscience) por 12-16 horas, e em seguida, a membrana foi corada com uma solução de Ponceau 1% para marcação das proteínas com intuito de assegurar a eficácia do procedimento de transferência.

Após a transferência, a membrana foi lavada 1 vez com solução tampão TBS (100mM de Tris-HCl e 1,5M de NaCl) durante 10 minutos. Em seguida, a mesma foi incubada durante 1 hora com solução de TBS-T (100mM de Tris-HCl, 1,5M de NaCl e Tween20 0,5%) contendo 5% de albumina bovina sérica (BSA) para bloqueio dos sítios inespecíficos. Após esse período, a membrana foi novamente lavada com TBS-T 1 vez durante 10 minutos. Em seguida, a mesma foi incubada com o anticorpo primário (anti-NOSi; 1:5000) durante 12-16 horas à 4°C em agitação. Após a lavagem do anticorpo primário e incubação com o anticorpo secundário (anti-rabbit; 1:2000) acoplado a peroxidase durante 2 horas, a membrana foi lavada 4 vezes com TBS-T e as

bandas foram reveladas utilizando o kit de detecção ECI Plus (Amersham Pharmacia Biotech).

3.7. Medida de Glutathiona no Tecido Retiniano de Camundongos Inoculados com a cepa PbA.

Os níveis intracelulares de glutathiona total (GSH) foram quantificados pelo método descrito por Anderson (1969), com algumas modificações. Esta técnica permite determinar, por análise espectrofotométrica, a quantidade de glutathiona a partir da redução do ácido-5,5-ditiobis-2,2-nitrobenzóico (DTNB) em ácido nitrobenzóico (TNB) de coloração amarela.

Para o processamento do tecido retiniano obtido de animais controles e infectados (2º, 4º, e 6º d.p.i.) foi utilizado o mesmo protocolo de dissecação descrito anteriormente na medida de TNF- α . Entretanto, após a separação do tecido retiniano das demais estruturas, esta foi cuidadosamente transferida para uma placa de cultura (24 poços-TPP) contendo 500 μ l do meio de cultura DMEM (Dulbecco's modified Eagles's medium) e mantida por no máximo 30 minutos em estufa a 37°C, com atmosfera constituída de 95% de ar e 5% de CO₂, até o término das demais dissecações do grupo experimental.

Após o período de incubação no meio de cultura, a retina foi transferida para um tubo de ensaio, ressuspensa em 1ml PBS/EDTA (1mM) e, então submetida ao processo de sonicação para lise do tecido. Deste volume, 100 μ l foram separados para posterior determinação da proteína (100 μ l da amostra, 100 μ l NaOH 1N e 300 μ l de água destilada).

Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 3000rpm durante 10 minutos, sendo 100 μ L do sobrenadante retirado e adicionado em um tubo de ensaio contendo: PBS/EDTA (1mM); a enzima GSH redutase (100 μ l/ml) e o co-fator NADPH (4mM). Após 20 minutos, 100 μ l de DTNB (5mM) foi adicionado a reação e a leitura da quantidade de TNB formada foi realizada 5 minutos depois, por espectrofotometria, em comprimento de onda igual a 412nm. Os resultados foram determinados em μ mol/mg de proteína e expressos em percentagem em relação ao controle.

3.8. Captação de $^3\text{H-L-Glutamato}$ no Tecido Retiniano de Camundongos Inoculados com a cepa *PbA*.

O ensaio de captação de $^3\text{H-Glutamato}$ no tecido retiniano foi realizado de acordo com o método descrito por Oliveira et al. (2010), nos 2 $^{\circ}$, 4 $^{\circ}$, e 6 $^{\circ}$ d.p.i. Para avaliar o transporte de $^3\text{H-glutamato}$ dependente Na^+ , o tecido retiniano foi lavado com solução de Hank (128mM NaCl, 4mM KCl, 1mM MgCl_2 , 2mM CaCl_2 , 12mM de glicose e 20mM de HEPES; pH 7,4). Após sucessivas lavagens (3 vezes), o tecido foi incubado com $^3\text{H-glutamato}$ (1 μ Ci/ml) em solução de Hank, durante 20 minutos a 37 $^{\circ}\text{C}$, em agitação.

A avaliação da captação de $^3\text{H-glutamato}$ independente de Na^+ foi feita com a substituição equimolar (128mM) de NaCl por cloreto de lítio (LiCl) na solução de Hank.

Após os 20 minutos de incubação, o tecido retiniano foi novamente submetido a lavagens (4 vezes) com solução de Hank gelada (20 $^{\circ}\text{C}$) para retirada do excesso de $^3\text{H-glutamato}$ presente no meio extracelular. Em

seguida, a retina foi rompida com água destilada e diferentes ciclos de sonicação. A quantidade de ^3H -glutamato presente no interior do tecido retiniano foi determinada por cintilação líquida e corrigida pela quantidade de proteína presente em cada amostra, sendo os valores expressos em porcentagem da média da captação total.

3.9. Medida da Liberação de Glutamato por HPLC

O ensaio de liberação do neurotransmissor glutamato foi realizado na retina obtida de camundongos controles e inoculados com a cepa PbA. Inicialmente, o tecido retiniano foi submetido a uma incubação com solução tampão de Hank durante 20 minutos a uma temperatura de 37°C , em agitação. Em seguida, o meio de incubação do tecido foi retirado e usado para dosagem da quantidade de glutamato endógeno que foi liberada pelas células do tecido controle e do tecido infectado. Após a retirada do meio, a retina foi ressuspensa em água destilada para posterior determinação da proteína.

A solução de incubação (tampão Hank) foi tratada com ácido tricloroacético (TCA) 1%, centrifugada a 7000rpm durante 5 minutos para retirada do conteúdo proteico para, em seguida, ser passada por uma coluna de Cromatografia Líquida de Alta Eficácia (CLAE). Neste método, 300 μl do meio de incubação foi adicionado a 6mg/ml de homoserina (padrão interno), 5mg/ml de orto-oftaldeído (OPA) e solução tampão borato (pH 9,9). A quantidade de glutamato liberada no meio de incubação foi determinada pela amplitude do pico em volts (V) no cromatograma gerado pelo detector de fluorescência.

3.10. Imunofluorescência para o Transportador x_{CG}^-

Para caracterizar o padrão de expressão do sistema de transporte glutamato x_{CG}^- no tecido retiniano frente ao quadro de MC utilizamos a técnica de imunohistoquímica como descrito por Gallagher et al. (2010). Os animais controles e infectados foram anestesiados e, em seguida submetidos ao procedimento de punção cardíaca para retirada do conteúdo sangüíneo. Em seguida, os globos oculares foram enucleados e imediatamente submersos em uma solução de fixação contendo paraformaldeído (PFA) 4% e tampão fosfato (0,1M; pH 7,2) durante 1 hora. Importante ressaltar que em cada globo ocular, uma pequena incisão na *ora serrata* foi realizada para melhor penetração do agente fixador.

Após a fixação, os olhos foram lavados em tampão fosfato 0,1M para posterior criopreservação em soluções crescentes de sacarose (10%, 20% e 30%). Os globos oculares permaneceram em solução de sacarose 30% por, no mínimo, 12 horas antes da realização dos cortes em criostato.

Após a criopreservação, os olhos foram embebidos em meio de congelamento TissueTek O.C.T. e secções seriadas com 16 μ m de espessura foram obtidas em criostato (LEICA, modelo CM3050) à temperatura de -25°C. As secções foram fixadas em lâminas previamente gelatinizadas e mantidas à temperatura de -20°C até a realização das imunomarcações.

Para a realização da imunohistoquímica, as secções foram primeiramente lavadas 3 vezes com tampão fosfato 0,1M durante 10 minutos. Em seguida, os cortes foram incubados com uma solução de bloqueio constituída de 0,5% de Triton X-100; 1% de BSA; 10% de soro de coelho e tampão fosfato 0,1M durante 1 hora à temperatura ambiente. Após esse

período, as secções foram novamente lavadas e incubadas com anticorpo primário (anti-x_{CG}⁻ - 1:500 em solução de bloqueio) à temperatura de 4°C por 12-18 horas. Em seguida, após sucessivas lavagens, foi realizada a incubação com o anticorpo secundário específico conjugado ao fluorocromo Alexa Flúor 488 (anti-goat -1:300 em solução de bloqueio) durante 1 hora à temperatura ambiente. A montagem da lâmina para observação microscópica (Olympus BX61) foi realizada em meio constituído de N-propil galato e glicerol para a conservação da imunofluorescência.

3.11. Dosagem de Proteína

A dosagem de proteína foi realizada 24 horas após a obtenção da amostra pelo método descrito por Bradford (1976). Este método baseia-se na interação entre o corante azul de coomassie e moléculas de proteínas, que no pH da reação provoca o deslocamento do equilíbrio do corante da forma catiônica (coloração vermelha) para a forma aniônica (coloração azulada), de acordo com a quantidade de proteínas presente na reação.

Neste ensaio, alíquotas de 100µl da amostra foram adicionadas a 2ml do reagente de Bradford (100mg Azul Brilhante de Coomassie, 50ml de etanol 95%, 100ml de ácido fosfórico 85%) e incubadas por 2 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, a leitura espectrofotométrica foi determinada em um comprimento de onda de 595nm. As concentrações das proteínas foram determinadas pela comparação com uma curva-padrão com BSA.

3.12. Análise Estatística

Os resultados foram analisados pelo teste t-student (para análise de dois grupos) e ANOVA (análise de variância) seguido do pós-teste Tukey-Kramer (para análise de três ou mais grupos). Todos os testes foram realizados no programa estatístico BioEstat versão 5.0, sendo que cada grupo experimental apresentou no mínimo “n” igual a 4 com valor de $p < 0,001$. Os experimentos foram repetidos pelo menos duas vezes e os gráficos construídos com a média de cada grupo.

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização do Quadro de Malária Cerebral

Antes de avaliarmos as possíveis alterações neuroquímicas no tecido retiniano frente o quadro de MC, uma série de parâmetros foram analisados no presente trabalho com o intuito de assegurar e caracterizar o desenvolvimento desta patologia nos grupos de animais infectados.

O curso temporal da doença foi monitorado diariamente pela determinação da taxa de sobrevivência desses animais após o início da infecção. Durante o período de observação, nossos resultados demonstraram que a inoculação dos camundongos C57Bl/6 com a cepa PbA resultou em uma infecção aguda e letal que iniciou-se no 6º d.p.i., mantendo-se até o 9º d.p.i., com uma significativa diminuição na taxa de sobrevivência no 7º d.p.i., como demonstrado na Figura 7a.

Os camundongos inoculados com a cepa PbA que não apresentaram o quadro clínico da doença e que, conseqüentemente não desenvolveram o quadro de MC, morreram entre o 18º e 20º d.p.i. (Figura 7a). Entretanto, nossos resultados demonstraram que apenas 19% dos animais morreram neste período, enquanto que a incidência de camundongos que desenvolveram o quadro de MC foi de 81% entre o 6º e 9º d.p.i. (Figura 7b).

Durante a evolução da doença também foram observados e registrados os sintomas clínicos e comportamentais apresentados pelos animais infectados. Os sinais clínicos e neurológicos associados a esse quadro como: ataxia, hemiplegia, desvio de cabeça, desorientação, disfunção respiratória, com a ocorrência de vários picos convulsivos, seguido do estado de coma

iniciaram-se no 6º d.p.i., intensificando-se no 7º d.p.i., momento em que a taxa de mortalidade desses animais aumenta significativamente.

Importante ressaltar que em todos os grupos experimentais, parte dos camundongos com MC que não foram sacrificados, morreram entre o 7º e 10º d.p.i., ratificando que no decorrer da realização do presente trabalho a padrão de evolução da doença manteve-se o mesmo, sem perda na virulência da cepa PbA.

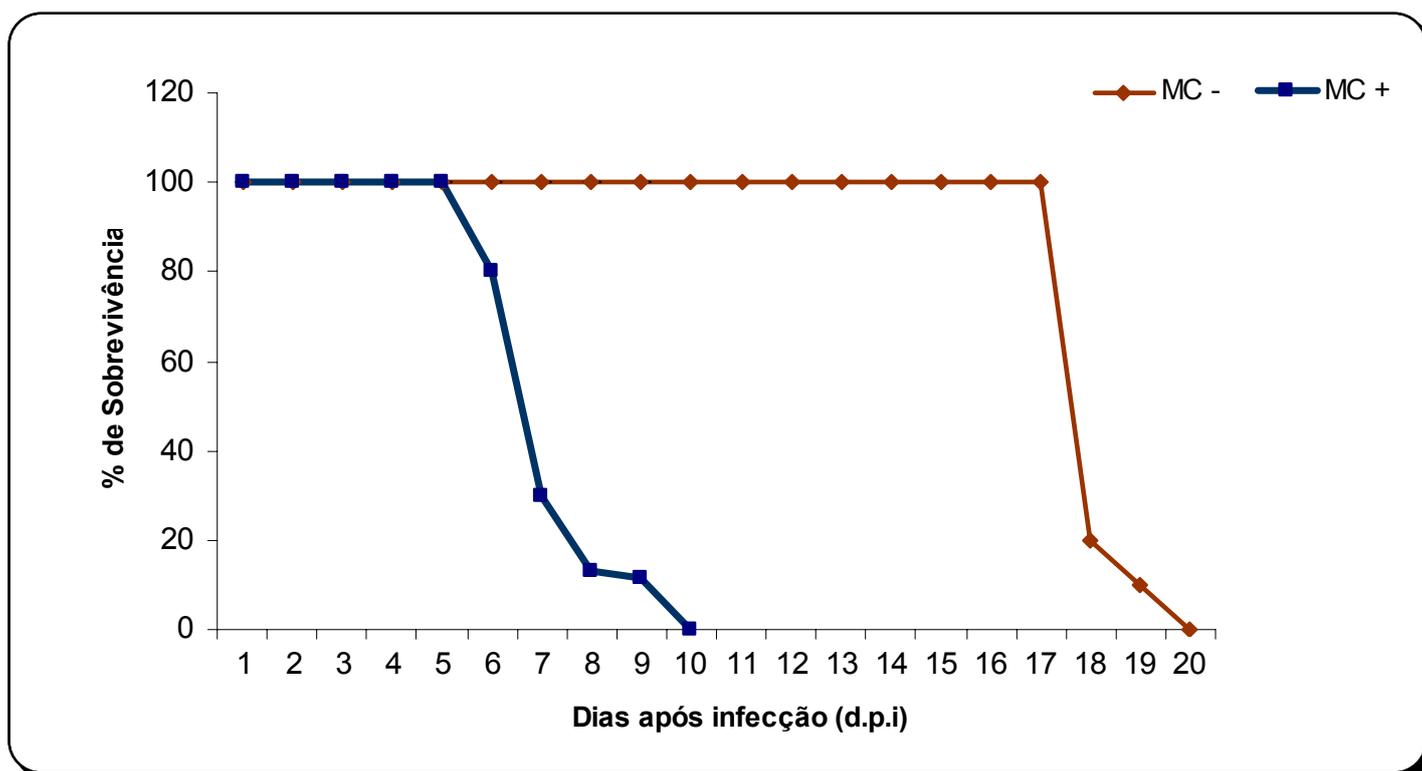


Figura 7a: Curva de sobrevivência dos camundongos C57Bl/6 infectados com a cepa PbA. Os animais foram inoculados com $\approx 10^6$ de eritrócitos parasitados. MC- representa os camundongos que não desenvolveram malária cerebral e MC+ representa os que desenvolveram malária cerebral. (n = 15 animais por grupo).

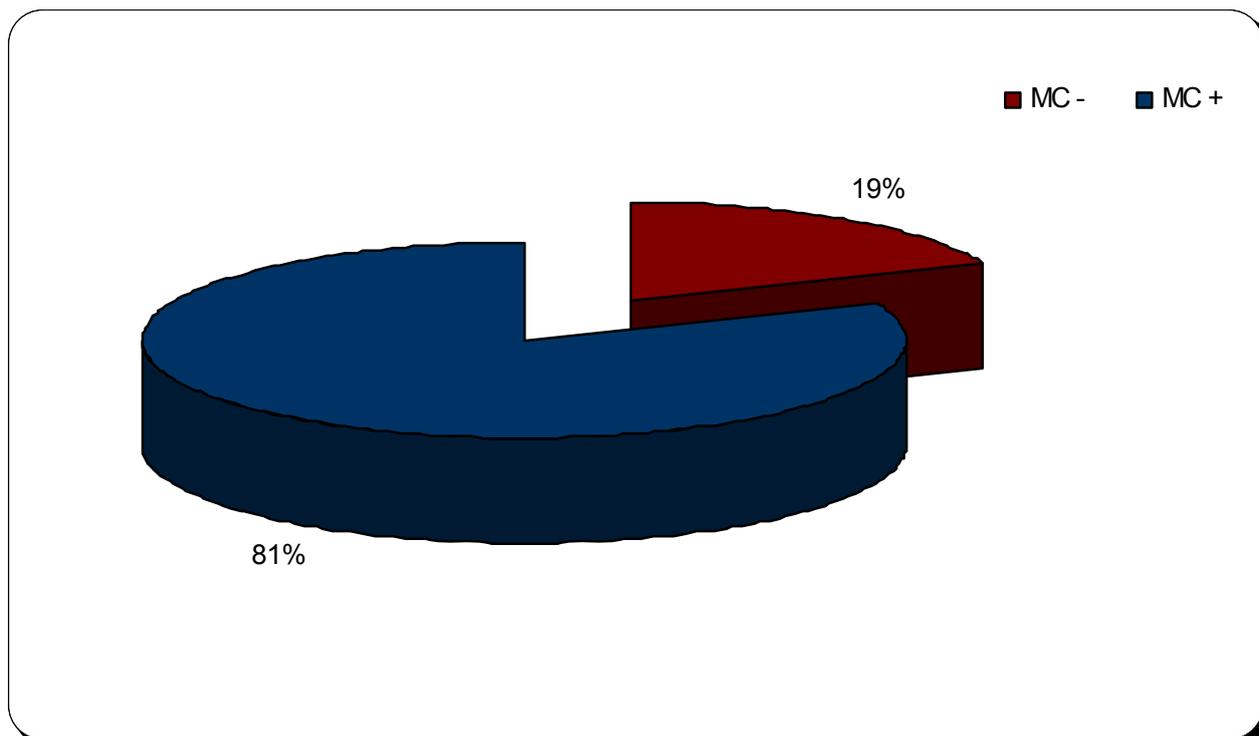


Figura 7b: Incidência do quadro de malária cerebral nos grupos de camundongos C57Bl/6 infectados com a cepa PbA. Os animais foram inoculados com $\approx 10^6$ de eritrócitos parasitados. MC- representa os camundongos que não desenvolveram malária cerebral e MC+ representa os que desenvolveram malária cerebral (n = 15 animais por grupo).

4.2. Parasitemia

A evolução da parasitemia desses animais também foi acompanhada diariamente pela confecção e observação de extensões sanguíneas delgadas. A observação microscópica das extensões mostrava o aparecimento das diferentes formas evolutivas de *Plasmodium berghei* como trofozoítos jovens e imaturos e esquizontes (Figura 8). Também foram verificadas, nas extensões sanguíneas, anormalidades morfológicas na membrana celular dos eritrócitos parasitados (Figura 8c).

Em nossos resultados demonstramos que as primeiras células parasitadas são evidenciadas a partir do 2º d.p.i., aumentando gradualmente a partir do 4º dia (Figura 9). Entre o 6º e 9º d.p.i., o nível de parasitemia dos animais que apresentaram o quadro clínico de MC eram maiores ($\approx 18\%$) do que os níveis de parasitemia dos camundongos que não desenvolveram MC ($\approx 9\%$); (Figura 9). O acompanhamento da parasitemia demonstrou que os camundongos C57Bl/6 que desenvolveram o quadro de MC apresentaram uma baixa parasitemia no momento do óbito, em torno de 15-20%, como demonstrado na Figura 9.

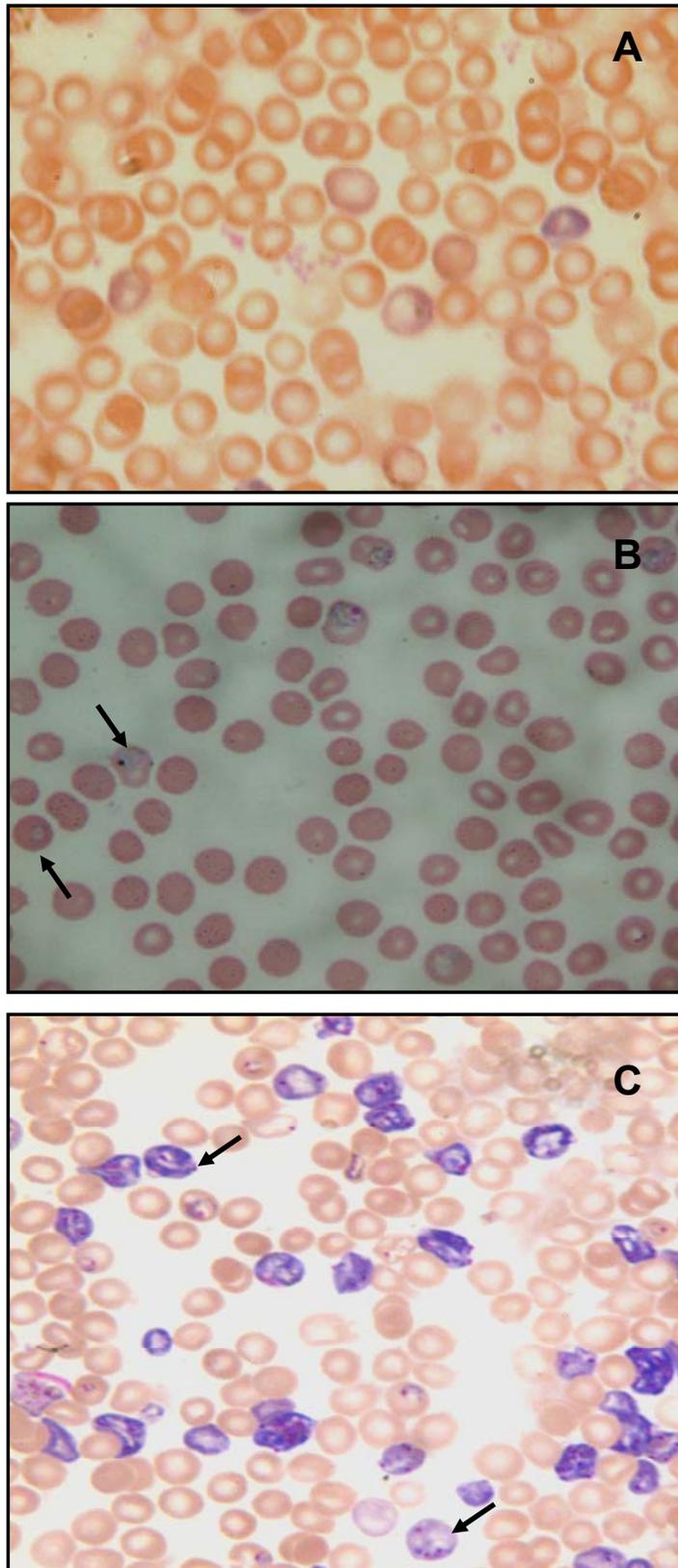


Figura 8: Fotomicrografias de extensões sanguíneas coradas com Giemsa. 1000x. **A** - controle; **B** - 2 dias após a infecção; **C** - 6 dias após a infecção. As setas indicam as diferentes formas evolutivas do *Plasmodium*.

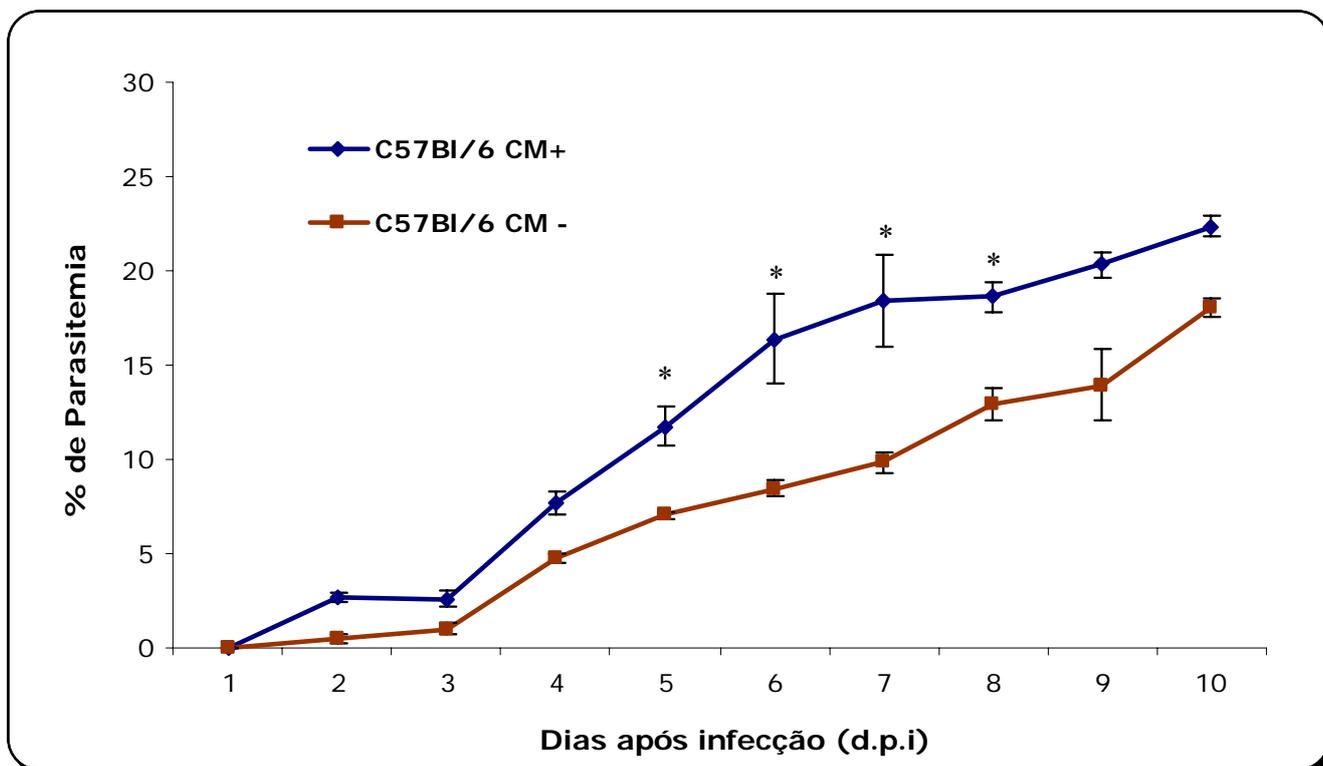


Figura 9: Evolução da parasitemia em relação aos dias após a inoculação (d.p.i.) dos camundongos C57BI/6 infectados com a cepa PbA. C57BI/6 MC- são os camundongos que não desenvolveram malária cerebral e C57BI/6 MC+ são os que desenvolveram malária cerebral. Dados expressos pela médias dos grupos. * $p < 0,001$ vs C57BL/6 CM- (Teste t-student).

4.3. Níveis de TNF- α no Cérebro e na Retina de Camundongos Infectados com a cepa PbA

Para caracterizar o aparecimento e a intensidade da resposta inflamatória local associada ao desenvolvimento da MC experimental realizou-se a dosagem da citocina pró-inflamatória TNF- α tanto no tecido cerebral como no tecido retiniano de animais controles e inoculados com a cepa PbA.

No presente trabalho, a dosagem de TNF- α foi realizada no 4º e 6º d.p.i. no tecido cerebral e no 2º, 4º e 6º d.p.i. no tecido retiniano dos camundongos C57Bl/6 inoculados com a cepa PbA. Os diferentes dias de análise foram escolhidos para caracterizar o padrão da resposta inflamatória local no início da infecção (2º d.p.i.), em um período intermediário (4º d.p.i.) e na fase final da infecção (6º d.p.i.), em que os sintomas relacionados à MC encontravam-se exacerbados levando a morte do animal.

No tecido cerebral, os resultados obtidos demonstraram que no 4º d.p.i. a concentração de TNF- α aumentou significativamente (91%) nos animais infectados ($14,4 \pm 3$ pg/mg de proteína) quando comparado aos animais controle ($7,5 \pm 3$ pg/mg de proteína). Esse aumento foi ainda mais evidente no 6º d.p.i., em que os animais infectados ($23,9 \pm 10$ pg/mg de proteína) apresentaram um aumento de 152% na concentração de TNF- α em relação ao grupo controle ($9,5 \pm 10$ pg/mg de proteína), o que caracteriza um intenso processo inflamatório no cérebro durante o desenvolvimento do quadro de MC experimental (Figura 10a).

Entretanto, um perfil distinto foi encontrado na quantificação desta citocina no tecido retiniano. Nos 2º, 4º e 6º d.p.i., a concentração de TNF- α não apresentou variação nos animais infectados ($5,5 \pm 1$ pg/mg de proteína) com a

cepa PbA em relação aos animais controle ($4,3 \pm 1$ pg/mg de proteína), demonstrando que o intenso processo inflamatório desencadeado pelo quadro de MC não acometeu o tecido retiniano nos diferentes estágios da doença (Figura 10b).

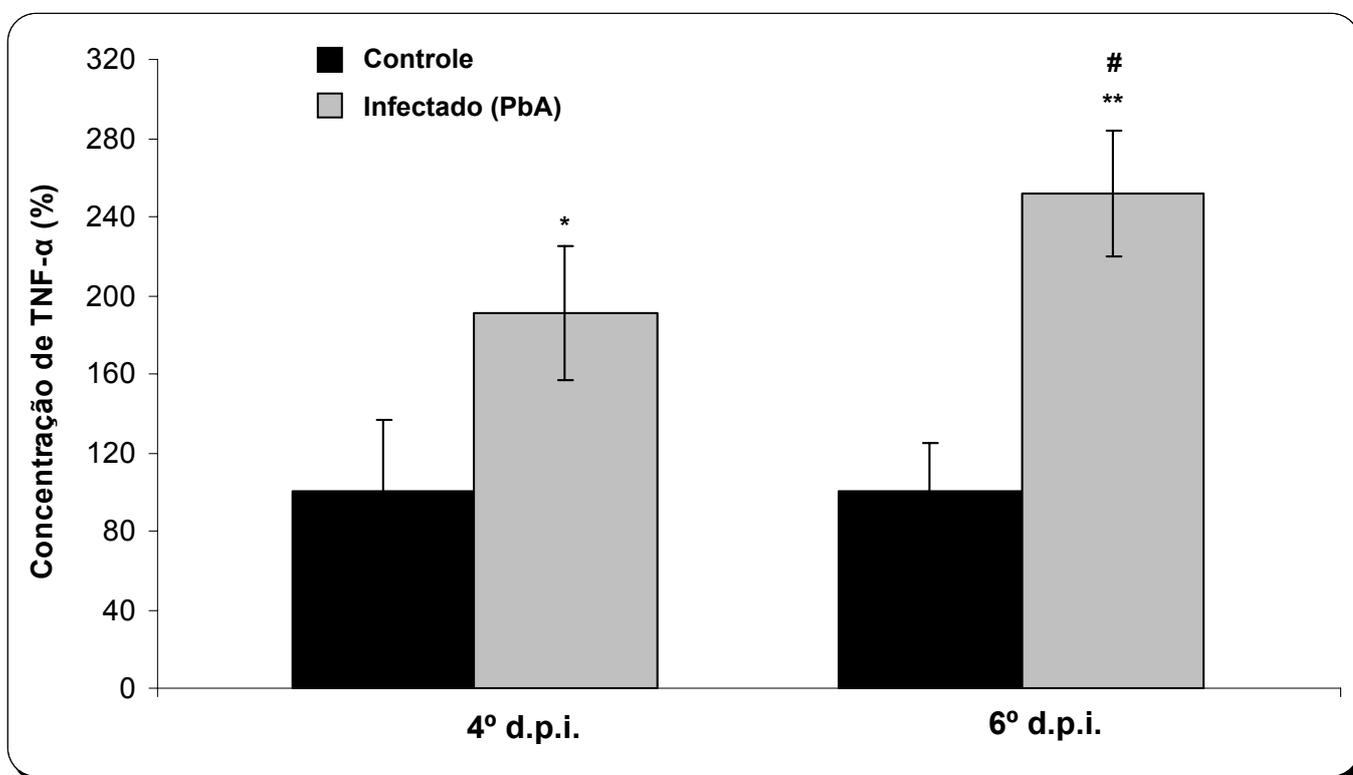


Figura 10a: Concentração de TNF- α no cérebro de camundongos C57Bl/6 no 4º e 6º dia após a inoculação (d.p.i.) com a cepa PbA. Dados expressos pelas médias dos grupos. * $p < 0,001$ vs controle 4º d.p.i.; ** $p < 0,0001$ vs controle 6º d.p.i.; # $p < 0,001$ vs Infectado (PbA) 4º d.p.i. (ANOVA, pós-teste Tukey Kramer).

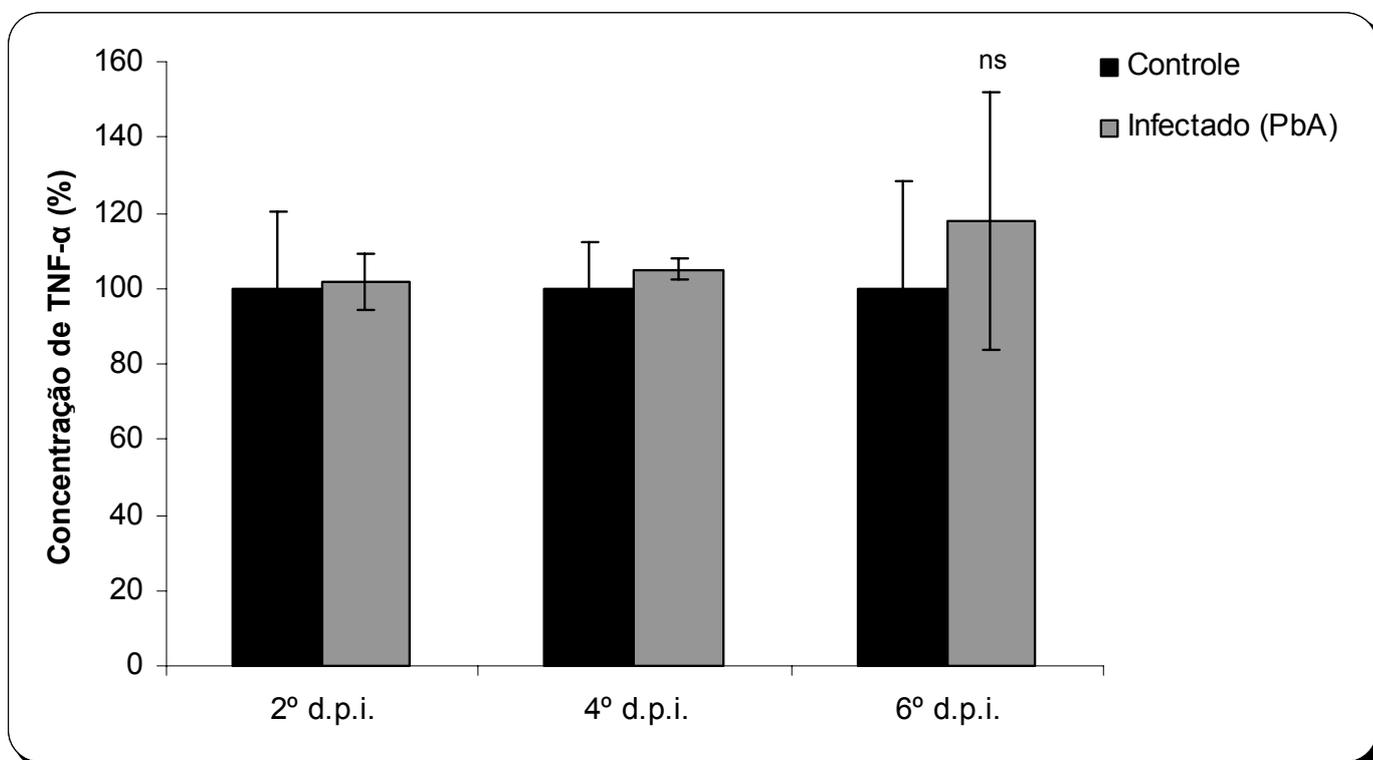


Figura 10b: Concentração de TNF- α no tecido retiniano de camundongos C57Bl/6 no 2°, 4° e 6° dia após a inoculação (d.p.i.) com a cepa PbA. Dados expressos pelas médias dos grupos. “ns (não significativo)” vs controle 6° d.p.i. (ANOVA, pós-teste Tukey Kramer).

4.4. Expressão da Enzima NOS induzida (NOS-2) no Cérebro e na Retina de Camundongos Infectados com a cepa PbA

Uma vez demonstrada a deficiência na produção de TNF- α no tecido retiniano frente o quadro de MC experimental e conseqüentemente, a ausência de processo inflamatório nesse tecido, estudos adicionais foram realizados a fim de ratificar o dado apresentado. Neste estudo, procuramos investigar, especificamente, o padrão de expressão da enzima NOS-2 no tecido cerebral e na retina dos animais controle e inoculados com a cepa PbA, no 6^o d.p.i.

Os resultados obtidos demonstraram que após a infecção ocorre uma intensa e significativa expressão da NOS-2 no extrato obtido do tecido cerebral enquanto que no tecido retiniano não foi detectada imunoreatividade nos animais controle assim como nos animais com MC, mostrando que a expressão desta enzima não é estimulada neste tecido (Figura 11).

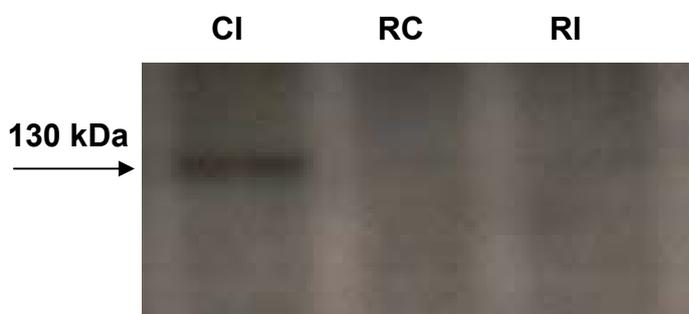


Figura 11: Expressão da enzima NOS-2 no cérebro e no tecido retiniano de camundongos C57Bl/6 no 6^o dia após a inoculação com a cepa PbA. CI: cérebro de animais infectados (PbA); RC: retina de animais controle; RI: retina de animais infectados (PbA).

4.5. Níveis de Glutathione (GSH) Total na Retina de Camundongos com Malária Cerebral Experimental

Visto que a resposta inflamatória desencadeada pelo quadro de MC não apresenta-se ativada no tecido retiniano, procuramos caracterizar se possíveis alterações neuroquímicas poderiam ser desencadeadas neste tecido de forma independente da cascata inflamatória.

Como o tecido retiniano mostra-se muito vulnerável a condições de estresse oxidativo o primeiro aspecto avaliado foi a concentração intracelular da molécula antioxidante GSH em animais controle e com 2, 4 e 6 dias de infecção. Os resultados apresentados na Figura 12 demonstraram que no 2º d.p.i. houve uma elevada e significativa redução de 48% no conteúdo de GSH nos animais infectados (6,2µmol/mg/min) quando comparados aos animais controle (13µmol/mg/min). No 4º d.p.i., a quantidade de GSH também apresentou uma redução significativa de 24%, que se manteve no 6º d.p.i. (27%); (Figura 12).

Os resultados obtidos também demonstraram que as reduções na quantidade de GSH nos 4º e 6º d.p.i. foram significativamente menores do que a redução apresentada no 2º d.p.i., demonstrando um aumento gradativo na quantidade de GSH durante o curso da infecção no tecido retiniano de camundongos inoculados com a cepa PbA (Figura 12).

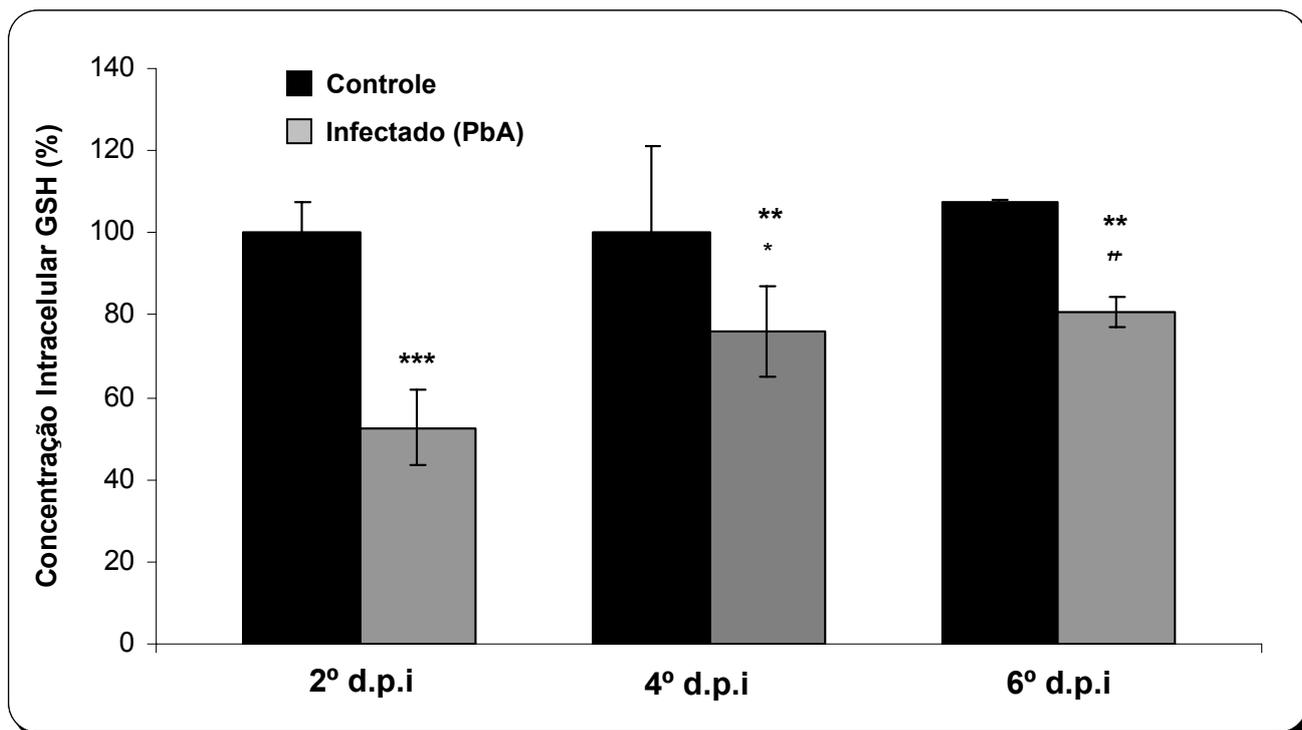


Figura 12: Concentração Intracelular de GSH no tecido retiniano de camundongos C57Bl/6 no 2º, 4º e 6º dia após a inoculação (d.p.i.) com a cepa PbA. Dados expressos pelas médias dos grupos. *** $p < 0,0001$ vs controle 2º d.p.i.; * $p < 0,001$ vs controle 4º d.p.i.; # $p < 0,001$ vs controle 6º d.p.i.; ** $p < 0,001$ vs Infectado (PbA) 2º d.p.i. (ANOVA, pós-teste Tukey Kramer).

4.6. Transporte de Glutamato na Retina de Camundongos com Malária Cerebral Experimental.

Diante do fato de que diversos mecanismos de transporte de aminoácidos, como o sistema X_{AG}^- e o sistema x_{CG}^- parecem estar envolvidos na formação da molécula de GSH, procuramos demonstrar o envolvimento e ativação desses sistemas de transporte na patogênese da MC pela captação do aminoácido glutamato no tecido retiniano de animais infectados com a cepa PbA.

Inicialmente, procuramos caracterizar a atividade do sistema de transporte X_{AG}^- dependente de Na^+ . Para isso, a retina de animais controle e infectados foram submetidos ao ensaio de captação com 3H -L-glutamato na presença de NaCl, no 2º, 4º e 6º d.p.i. Na Figura 13, observamos que os animais com MC experimental apresentaram um aumento significativo de 42% e 61% no padrão captação de 3H -L-glutamato no tecido retiniano no 4º e 6º d.p.i., respectivamente. No entanto, no 2º d.p.i. não houve alteração nos níveis de captação de 3H -L-glutamato no tecido retiniano dos animais infectados em relação ao controle.

Posteriormente, estudos adicionais foram realizados a fim de avaliar a possível participação do sistema x_{CG}^- , como outro mecanismo de transporte que atua de forma independente do íon Na^+ . Neste caso, o tecido retiniano foi submetido ao ensaio de captação com 3H -L-glutamato na ausência de NaCl quando substituído pelo LiCl. Como mostra a Figura 14, a retirada do íon Na^+ também aumentou, significativamente, o valor da captação (49%) de 3H -L-glutamato na retina dos camundongos infectados com a cepa PbA.

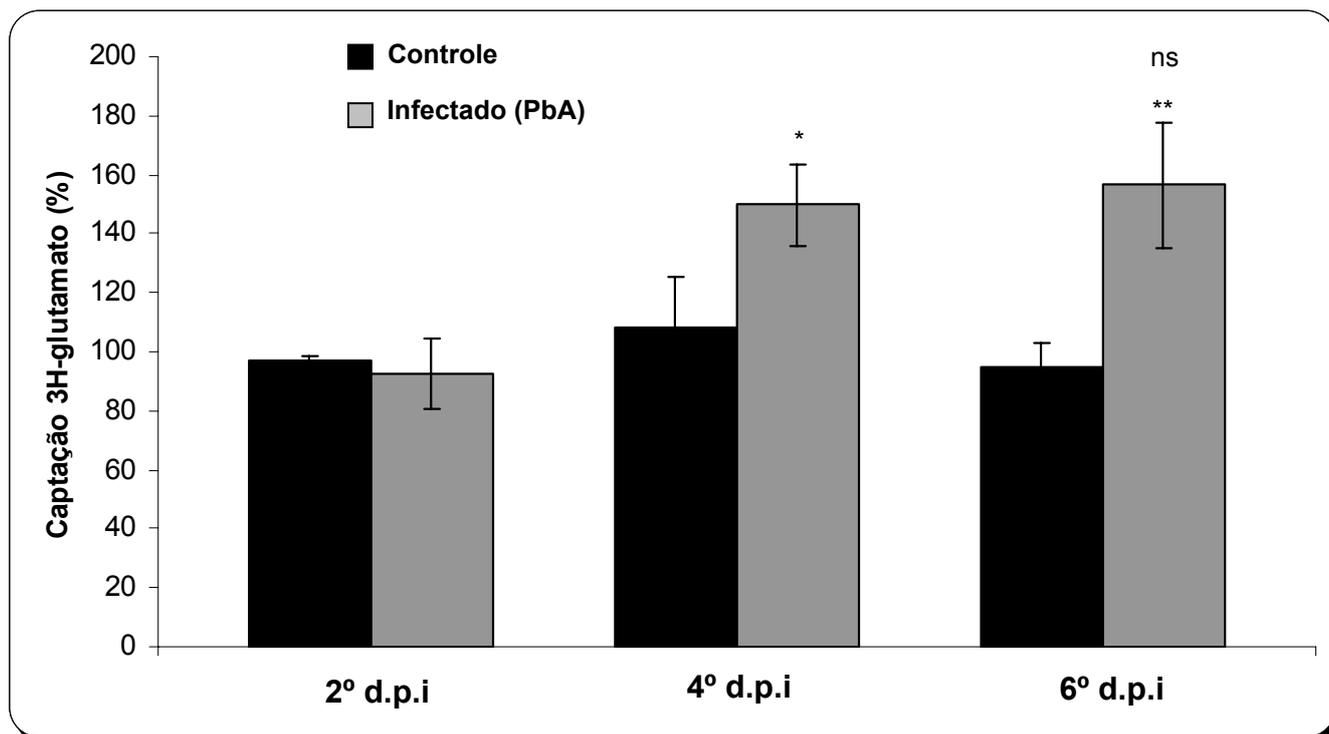


Figura 13: Captação de ^3H -glutamato dependente de Na^+ no tecido retiniano de camundongos C57Bl/6 no 2º, 4º e 6º dia após a inoculação (d.p.i.) com a cepa PbA. Dados expressos pelas médias dos grupos. * $p < 0,001$ vs controle 4º d.p.i.; ** $p < 0,0001$ vs controle 6º d.p.i.; ns vs Infectado (PbA) 4º d.p.i. (ANOVA, pós-teste Tukey Kramer).

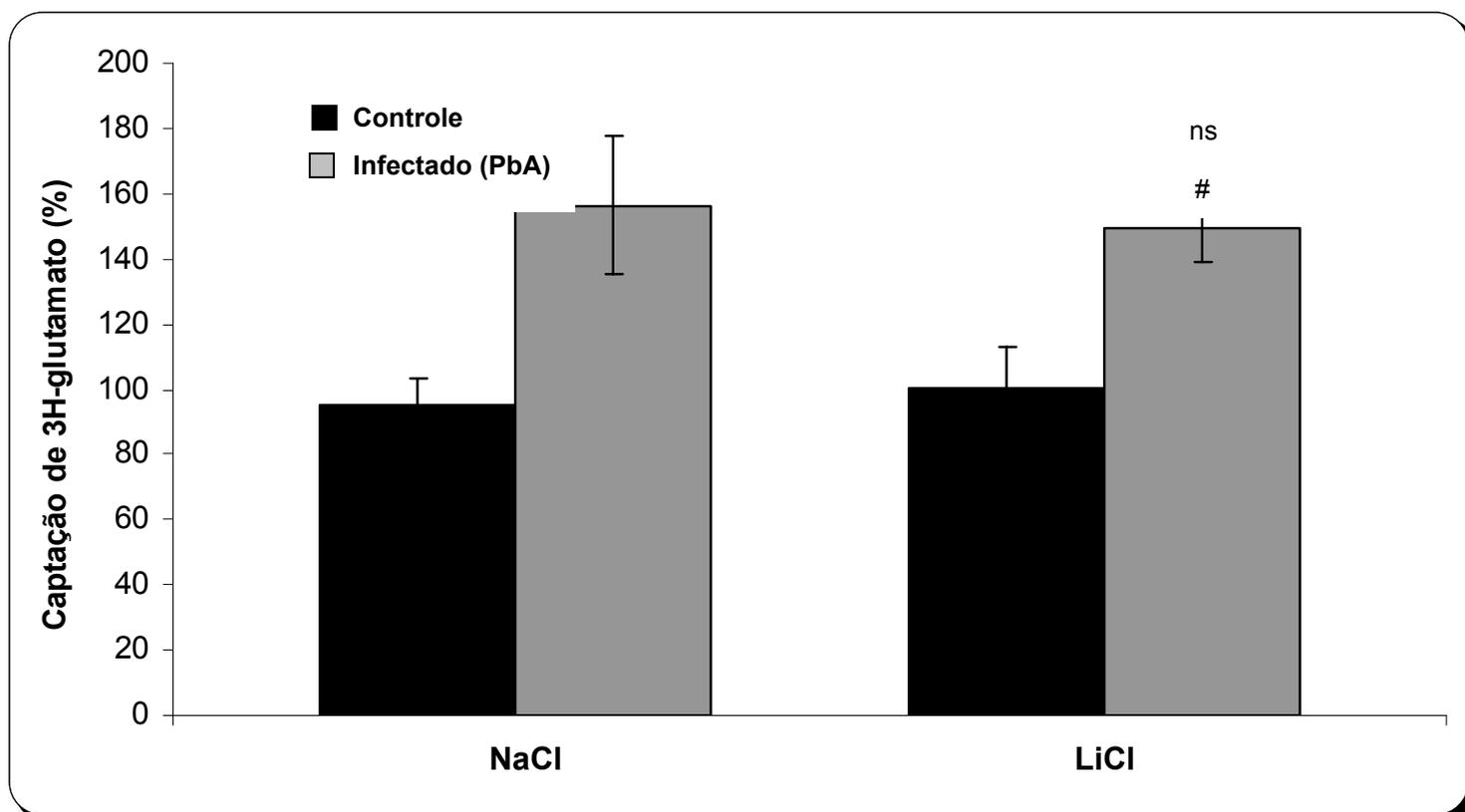


Figura 14: Captação de ^3H -glutamato dependente (NaCl) e independente de Na^+ (LiCl) no tecido retiniano de camundongos C57Bl/6 no 6º dia após a inoculação (d.p.i.) com a cepa PbA. Dados expressos pelas médias dos grupos. * $p < 0,0001$ vs controle NaCl; # $p < 0,0001$ vs controle LiCl; ns vs Infectado (PbA) NaCl (ANOVA, pós-teste Tukey Kramer).

4.7. Liberação de Glutamato pelo Tecido Retiniano de Animais com Malária Cerebral Experimental

Uma vez demonstrada as alterações nos sistemas transporte dentro do quadro de infecção com a cepa PbA, procuramos avaliar se essas alterações se estendiam ou tinham relação com os processos de liberação do neurotransmissor glutamato na retina.

A destacada participação do sistema de transporte independente de Na^+ no tecido retiniano de camundongos com MC (Figura 14), direcionou nosso trabalho para a caracterização da liberação desse neurotransmissor pelo sistema x_{CG}^- no tecido retiniano de camundongos C57Bl/6 com MC.

Nesse sentido, foram mensurados os níveis de liberação de glutamato em grupo de animais controle e com 6 dias após a infecção com a cepa PbA. Os resultados apresentados na Figura 15 mostram que neste estágio da doença o tecido retiniano apresenta uma diminuição de 50% na liberação de glutamato quando comparado ao controle.

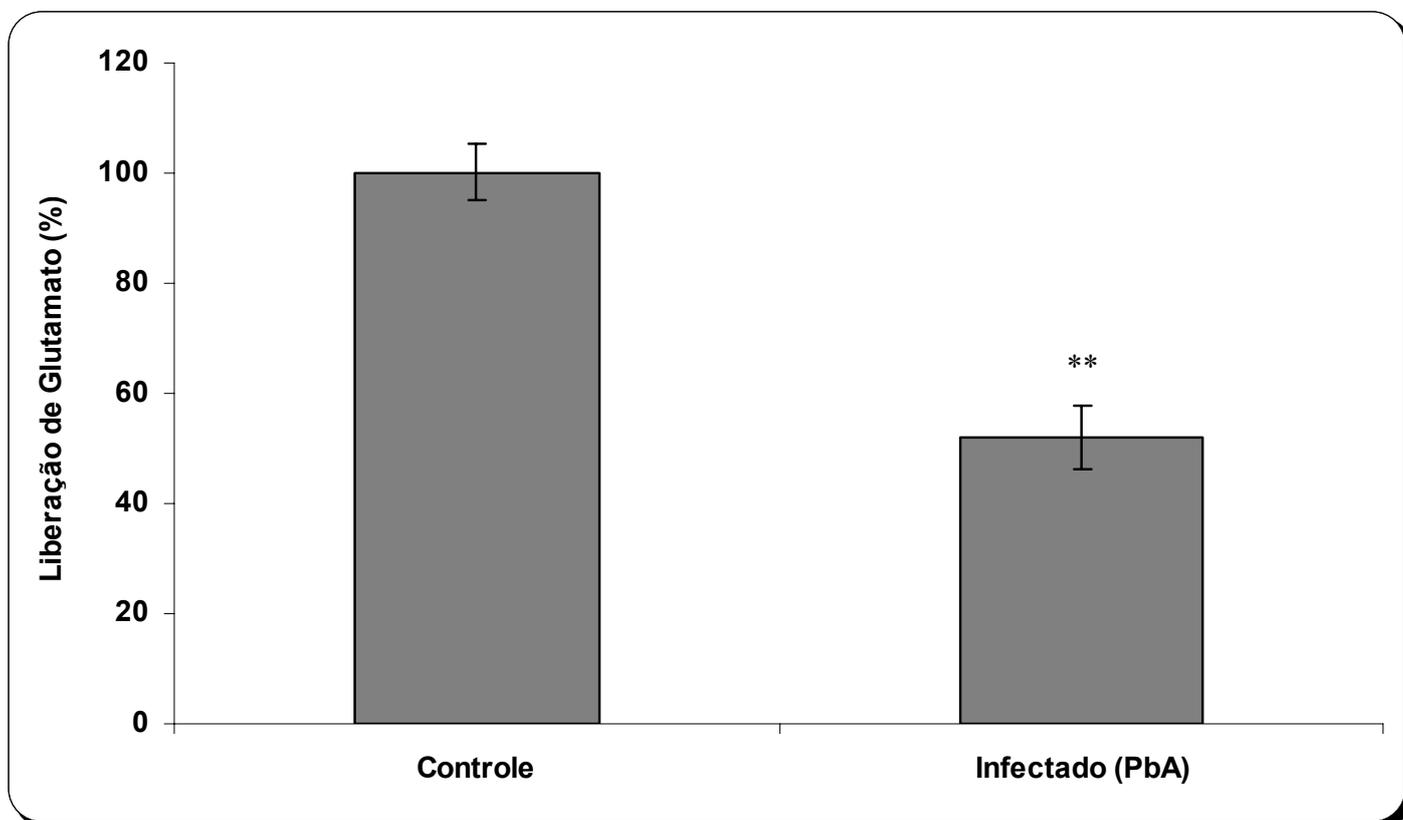


Figura 15: Liberação de glutamato no tecido retiniano de camundongos C57Bl/6 no 6º dia após a inoculação (d.p.i.) com a cepa PbA. Dados expressos pelas médias dos grupos. ** $p < 0,0001$ vs controle (Teste t-student.).

4.8. Expressão da Proteína Transportadora x_{CG}^- nos Camundongos com Malária Cerebral.

Uma vez demonstrado o aumento na captação de glutamato no tecido retiniano de animais com MC por um mecanismo independente de Na^+ , procuramos investigar se este quadro patológico poderia estar induzindo a expressão do transportador x_{CG}^- no tecido retiniano dos animais infectados com a cepa PbA.

Para isto, realizamos uma imunomarcacão para esse transportador na retina de animais controle e com 6 dias após a inoculacão. Como podemos observar na Figura 16a e Figura 16b, os animais controle apresentaram uma marcacão mais discreta quando comparada a marcacão na retina dos animais infectados, o que mostra um aumento na expressão deste transportador no quadro de MC experimental.

Na retina dos camundongos com MC experimental, o transportador x_{CG}^- apresentou uma imunomarcacão homogênea e bem distribuída nas camadas de nucleares internas e externas. Como demonstrado na Figura 16a, nestes mesmos segmentos da retina essa marcacão mostrou-se muito mais fraca nos camundongos sem a infecção com PbA.

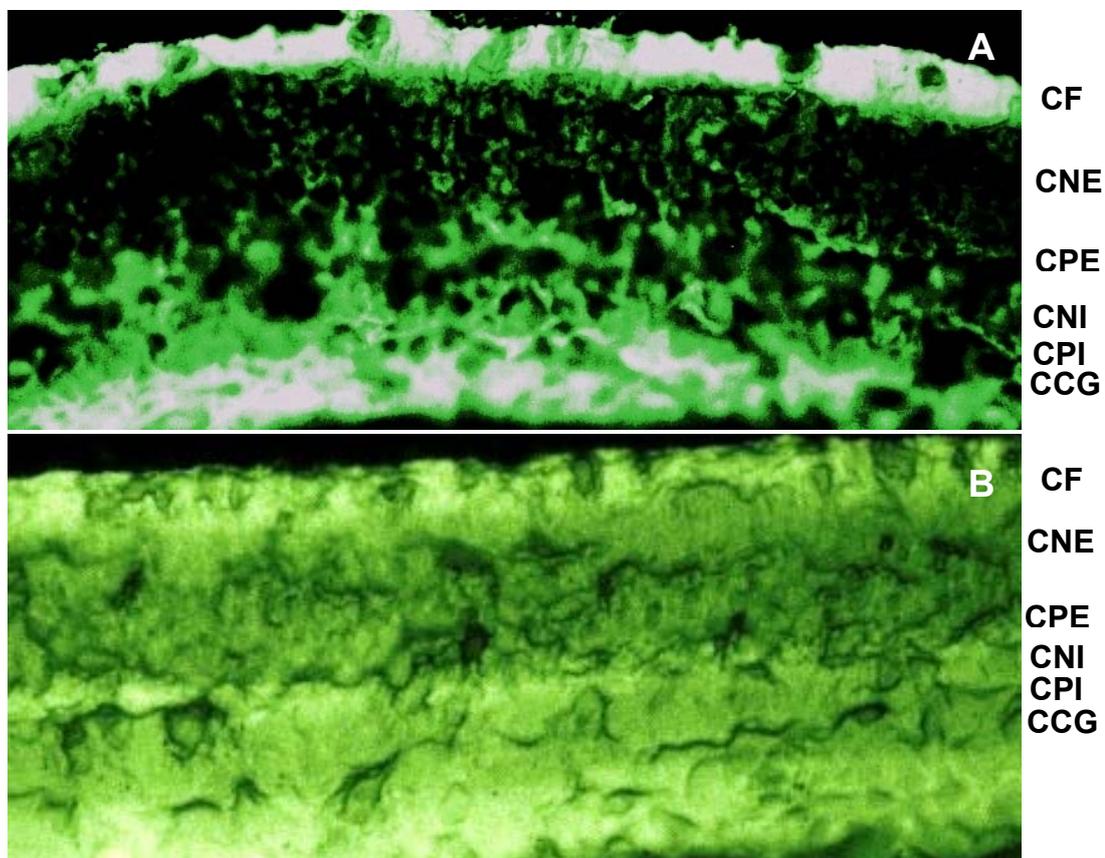


Figura 16: Expressão da proteína transportadora x_{CG}^- no tecido retiniano de camundongos C57Bl/6 com malária cerebral. **A:** retina de camundongos controle, x40; **B:** retina de camundongos no 6º dia após a inoculação com a cepa PbA, x40. CNE: camada nuclear externa; CNI: camada nuclear interna; CPE: camada plexiforme externa; CPI: camada plexiforme interna; CCG: camada de células ganglionares; CF: camada de células fotorreceptoras

5. DISCUSSÃO

A MC caracteriza-se por ser uma infecção multifatorial, cuja fisiopatologia apresenta mecanismos complexos e ainda pouco esclarecidos (de Souza et al., 2010). Como apresentado na parte introdutória do presente trabalho, embora a patologia da MC seja responsável pela manifestação de um quadro grave de retinopatia, poucos estudos fazem alusão às alterações neuroquímicas decorrentes desta condição, tão pouco é esclarecido se estas eventuais alterações ocorrem em momentos precoces ao estabelecimento da doença. Diante deste fato, o presente trabalho se propôs a caracterizar a associação entre o quadro de MC com alterações neuroquímicas no tecido retiniano, assim como avaliar em que período ou fase da doença essas alterações são desencadeadas.

Em nosso trabalho, a utilização de um modelo animal para MC, como a infecção de camundongos C57Bl/6 com a cepa PbA, apresenta-se como uma apropriada e valiosa ferramenta para a elucidação dos mecanismos associados as alterações no tecido retiniano, uma vez que muito dos conceitos acerca da patogênese desta doença foram elucidados a partir do uso deste modelo experimental (Lou et al., 2001; de Souza & Riley, 2002; Combes et al., 2005; White et al., 2010).

Nossos resultados demonstraram que os sintomas clínicos (ataxia, deficiência respiratória, desvio de cabeça, paralisia, convulsão e coma) observadas após a infecção dos camundongos C57Bl/6 com a cepa PbA se assemelham aquelas apresentadas em trabalhos anteriores utilizando o

mesmo modelo de infecção (Hanum et al., 2003; Patel et al., 2008; Randall et al., 2008).

Além dos sinais clínicos descritos, uma série de estudos demonstra que o desenvolvimento da neuropatologia associada à malária é comumente caracterizado por avaliações como taxa de sobrevivência e evolução da parasitemia (Bagot et al. 2002; Martins et al., 2009; Lacerda-Queiroz et al. 2010). A avaliação destes parâmetros em nosso trabalho demonstrou que, semelhante ao encontrado na literatura, os camundongos susceptíveis ao quadro de MC, como a linhagem C57Bl/6, geralmente evoluem a óbito entre o 6º e 10º dia após a inoculação com os eritrócitos parasitados (de Souza & Riley, 2002).

Como descrito em nossos resultados, 81% dos camundongos inoculados com a cepa PbA desenvolveram MC, sendo que estudos prévios relatam que a incidência desta neuropatologia entre os camundongos infectados com PbA pode variar entre 60-100%, dependendo de características como peso e idade, do perfil genético do hospedeiro e da quantidade de eritrócitos parasitados usados no momento da inoculação (Amani et al., 1998; Bagot et al., 2002).

No presente estudo constatamos que 19% dos camundongos inoculados com a mesma quantidade de eritrócitos parasitados (10^6), apresentaram resistência ao desenvolvimento do quadro de MC, sendo que os mesmos evoluíram a óbito entre o 18º e o 20º d.p.i., provavelmente pelo desenvolvimento de um quadro de anemia severa e hiperparasitemia ($\approx 70\%$) como descrito por Lacerda-Queiroz et al. (2010).

Corroborando com os dados apresentados no presente trabalho, que mostram uma baixa parasitemia ($\approx 15-20\%$) dos animais com MC no momento do óbido, Curfs et al., (1992) descrevem que o estabelecimento do quadro de MC está diretamente relacionado a uma baixa inoculação de eritrócitos parasitados, e conseqüentemente, ao desenvolvimento de uma baixa parasitemia destes animais.

Outra relevante característica também observada em nossos resultados foi de que os camundongos que desenvolveram MC apresentaram maior aumento da porcentagem de parasitemia entre o 6º e 8º d.p.i. ($\approx 18\%$) em comparação com os camundongos que não desenvolveram MC ($\approx 9\%$), sugerindo que a rápida evolução da parasitemia nesse período pode estar associada à intensa ativação da resposta imunológica desencadeada pela liberação dos antígenos indispensável para o estabelecimento do quadro de MC, juntamente com a aderência dos eritrócitos parasitados na microvasculatura cerebral, também modulada pela resposta imunológica (Miller et al., 2002).

Dentro deste contexto, nossos resultados clínicos e hematológicos nos permitem validar o modelo experimental apresentado no presente trabalho, ratificando assim a confiabilidade dos resultados e as interpretações referentes tanto as alterações no tecido cerebral como no tecido retiniano induzidas pelo quadro de MC.

Na tentativa de expandir e detalhar nossa análise, procuramos determinar e comparar a ativação de determinados componentes da resposta imunológica em ambos os tecidos cerebral e retiniano frente o quadro de MC experimental. Sabe-se que no tecido cerebral a produção de citocinas pró-

inflamatórias como TNF- α e a ativação de enzimas como NOS-2 reconhecidamente atuam como eventos relacionados à patologia da MC (Maneerat et al., 2000; Gimenez et al., 2003; van der Heyde et al., 2006), no entanto, pouco se sabe sobre a ativação destes componentes no tecido retiniano também acometido por esta patologia.

No presente trabalho, observamos que no tecido cerebral os níveis da citocina TNF- α encontram-se elevados, aumentando com o decorrer do processo infeccioso (4^o e 6^o d.p.i), o que caracteriza uma intensa resposta inflamatória no cérebro durante o quadro de MC experimental. Ratificando nossos resultados, Medana et al. (1997b) demonstraram o aumento da expressão do RNAm e da proteína TNF- α nas regiões do córtex, hipocampo e cerebelo de camundongos com o quadro de MC fatal. Semelhante aos nossos achados, o aumento desta expressão também se mostrou mais evidente no 6^o e 7^o d.p.i, quando esses animais apresentavam os sintomas clínicos da neuropatologia.

A participação do TNF- α circulante na patogênese na MC ainda gera discussão, uma vez que os níveis sistêmicos desta citocina não são suficientes para explicar o desenvolvimento das complicações neurológicas nesta patologia. Clark et al. (1999) demonstraram que os níveis de TNF- α produzidos pelos monócitos aderidos no endotélio da microvasculatura cerebral contribuem de forma mais significativa para as complicações cerebrais do que os níveis encontrados no plasma.

É importante salientar que pouco se sabe sobre a liberação desta citocina no tecido retiniano antes e durante o quadro de MC. Desta forma, avaliando os níveis de TNF- α na retina, observamos que a produção desta

citocina não é detectável durante o desenvolvimento do quadro de MC, diferente do que observamos no tecido cerebral. O resultado em questão caracteriza, pela primeira vez, a ausência da resposta inflamatória, via produção de TNF- α , no tecido retiniano durante as diferentes fases da patologia, sugerindo que as possíveis alterações na retina induzidas pelo processo infeccioso independem de uma ativação inflamatória.

Outro importante marcador da resposta inflamatória no SNC é a ativação do sistema nitrérgico, que de acordo com dados da literatura, encontra-se intimamente associado à produção de TNF- α (Minc-Golomb et al., 1994; Maneerat et al., 2000). Em nossos resultados verificamos que assim como para o TNF- α , o desenvolvimento do quadro de MC nos camundongos C57Bl/6 encontra-se associado a intensa expressão da enzima NOS-2 no tecido cerebral no 6º d.p.i.

Nathan et al. (1994) e Alderton et al. (2001) mostraram que a expressão da enzima NOS-2 pode ser induzida por antígenos de patógenos e citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IFN- γ e IL-1, sugerindo que em nossos resultados o aumento da expressão da NOS-2 no tecido cerebral pode estar associado ao aumento na produção de TNF- α e a liberação das proteínas do *Plasmodium berghei* (PfEMP1).

Corroborando com nossos resultados, Maneerat et al. (2000) demonstraram que no cérebro de pacientes *pos mortem* com MC, havia uma intensa indução na expressão da enzima NOS-2, sendo essa expressão detectada em diferentes tipos celulares e nas fases mais agudas da doença. Este estudo sugere que a expressão dessa enzima poderia contribuir para o

agravamento dos sintomas clínicos característico da MC como convulsão, coma e morte.

De fato, nossa análise voltada para expressão da NOS-2, mostrou que na situação experimental o quadro de MC não induziu expressão da referida isoforma da enzima no tecido retiniano. Este resultado está de acordo com a deficiência na produção de TNF- α observada em nossos resultados, uma vez que dados da literatura demonstram que alterações na expressão desta enzima estão relacionadas à intensa elevação dos níveis de TNF- α (Minc-Golomb et al., 1994). Em contrapartida, como discutido anteriormente, demonstramos que os animais com MC apresentam uma intensa expressão da NOS-2 no tecido cortical, assim como elevados níveis de TNF- α .

De posse destes resultados, podemos sugerir que o tecido retiniano é menos sensível à ativação inflamatória do que o tecido cerebral em modelo de MC murina induzida pela infecção com a cepa PbA. Muitos fatores podem estar envolvidos neste fenômeno, visto que uma série de trabalhos demonstra que embora o tecido retiniano e o cerebral sejam formados por tipos celulares semelhantes e tenham a mesma origem embrionária, ambos apresentam uma constituição celular e fisiologia bastante particulares (Pow, 2001a; Kolb et al., 2001).

Uma das grandes adaptações que a retina adquiriu durante o processo evolutivo foi de desenvolver um sistema de proteção antioxidante bastante eficiente (Huster et al., 2000; Bringmann et al., 2008). Esta adaptação tornou-se importante visto a grande quantidade de fosfolipídios de cadeia insaturada presentes nesta estrutura e a constante exposição da mesma a energia luminosa, o que torna o tecido retiniano um ambiente passivo de reações de

oxidação (Huster et al., 2000). Nesse sentido, qualquer alteração que ocasione flutuações no balanço das substâncias pró e anti-oxidantes pode promover severas mudanças na fisiologia da retina. Prova disso, são os trabalhos que descrevem que algumas neuropatologias que acometem a funcionalidade do tecido retiniano são capazes de gerar neste tecido um intenso processo de estresse oxidativo (Harada et al., 2007; Schimel et al., 2011).

Nenhum estudo até o momento procurou investigar as alterações neuroquímicas associadas a possível geração de estresse oxidativo no tecido retiniano no quadro de MC. Diante do fato, o presente trabalho é o primeiro a descrever o papel da molécula antioxidante GSH na patologia da MC no tecido retiniano. Nossos resultados demonstram que durante todo o processo infeccioso ocorre uma diminuição significativa na quantidade de GSH, o que sugere que este tecido acometido pelo quadro de MC apresenta-se susceptível a geração dos fenômenos associados ao estresse oxidativo.

Poucos trabalhos, no entanto, ressaltam o envolvimento dos mecanismos relacionados ao processo de estresse oxidativo com esta neuropatologia. Wiese et al., (2006) descrevem que a patologia da MC está diretamente relacionada aos elevados níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) produzidos nas células do endotélio vascular do tecido cerebral. Como demonstrado por este grupo, nos estágios terminais da MC, a imunoreatividade para o composto 8-oxoguanina (marcador de estresse oxidativo) apresenta-se aumentada nas células endoteliais.

Recentemente, Reis et al. (2010) demonstraram que terapias com a utilização de agentes antioxidantes como a N-acetilcisteína, reduziram o processo de estresse oxidativo gerado no tecido cerebral, prevenindo o

aparecimento dos distúrbios de origem cognitiva nos camundongos C57Bl/6 com MC.

Semelhante ao observado em nossos dados, Narsaria et al., (2011) verificaram uma diminuição nos níveis de GSH e da enzima superóxido dismutase no sangue de crianças com malária severa, propondo que a liberação de ROS pode exercer um papel fundamental na patogênese da malária severa humana.

Importante ressaltar que os dados apresentados no presente trabalho demonstram uma intensa diminuição na quantidade de GSH nos primeiros dias (48% no 2º d.p.i.) após a infecção dos camundongos com a cepa PbA. No entanto, essa diminuição tende a ser menos evidente com a evolução da doença (24% no 4º e 27% no 6º d.p.i.), sugerindo o envolvimento de um sistema que favoreça a síntese dessa molécula durante o período de infecção, como uma forma de reduzir fisiologicamente a geração do quadro de estresse oxidativo resultante da MC.

Estudos anteriores descritos por Reichelt et al. (1997) e Oliveira et al. (2010) caracterizaram que os níveis intracelulares da molécula GSH são essencialmente dependentes da atividade e expressão dos sistemas de transporte de glutamato localizados em diferentes regiões do SNC, como o tecido retiniano. Nesse sentido, observamos em nossos resultados, que na retina dos camundongos com MC havia um aumento no transporte de glutamato dependente e independente de Na^+ nos estágios correspondentes ao 4º e 6º d.p.i. Os dados descritos sugerem que neste período da doença ocorre um aumento na funcionalidade de ambos os sistemas de transporte

dependente e independente de Na^+ , que no tecido retiniano são representados pela proteína GLAST e pelo sistema x_{CG}^- , respectivamente.

Ward et al., (2005) demonstraram que em patologias que acometem o tecido retiniano como a retinopatia diabética destaca-se um significativo aumento na funcionalidade de transportadores como o GLAST e o EAAT4, evidenciado pela forte e intensa marcação de D-aspartato (análogo do glutamato) nas células de Müller deste tecido. Entretanto, importante destacar que a elevada atividade destes transportadores não é acompanhada pelo aumento da sua expressão nesta condição patológica.

Importante ressaltar que o aumento da atividade do transportador independente de Na^+ ocorre simultaneamente ao aumento na quantidade intracelular de GSH no decorrer da infecção (4º e 6º d.p.i.). Estes achados estão de acordo com resultados prévios de nosso grupo onde demonstramos que a ativação do sistema de transporte x_{CG}^- na retina está intimamente relacionada à síntese de GSH (Oliveira et al, 2010).

Expandindo a interpretação de nossos resultados, diversos trabalhos demonstram que o sistema de transporte x_{CG}^- pode ser expresso em células gliais, que na retina podem ser astrócitos, células de Müller e microglia (Bramall et al., 2010). Ratificando esta hipótese estão nossos dados de imunofluorescência para a proteína transportadora x_{CG}^- , em que observamos um aumento na marcação em todas as camadas retinianas nos animais com MC experimental. Desta forma, podemos sugerir as células da glia podem estar participando ativamente da resposta frente ao quadro de MC, contudo, estudos complementares são necessários para confirmar tal afirmativa.

Dentro desta problemática, Persson et al. (2009) demonstraram proteínas do sistema complemento (C5a) liberadas durante eventos patológicos causam um aumento na expressão do transportador GLT-1 e da captação de glutamato na microglia por um mecanismo independente da produção de TNF- α . Posteriormente, Persson et al., (2006) descreveram que o aumento no transporte de glutamato na microglia, está intimamente relacionado ao aumento na síntese de GSH, o que fortalece a hipótese acerca dos nossos resultados, uma vez que transporte de glutamato nas células microgliais constitui um dos fatores limitantes para síntese de glutatona (Persson et al., 2011).

Importante destacar que os dados apresentados em nosso trabalho evidenciam que o aumento na atividade do transportador e, conseqüentemente, do transporte de glutamato ocorre, provavelmente, em função da participação do sistema x_{CG}^- , uma vez que retirada do íon Na^+ não alterou significativamente o aumento da captação ($\approx 50\%$) observado no tecido retiniano dos animais com MC (6^o d.p.i.).

Além de alterar os níveis de captação do neurotransmissor glutamato, nosso estudo também demonstrou que o quadro de MC é responsável por uma intensa diminuição na liberação de glutamato (6^o d.p.i.) por um mecanismo independente do íon Na^+ , provavelmente representado pelo sistema x_{CG}^- . Esse dado corrobora com nossos resultados, propondo que essa diminuição na liberação de glutamato pode estar associada a uma maior retenção desse neurotransmissor dentro da célula com o intuito de potencializar a síntese da molécula de GSH.

Entretanto, Miranda et al., (2010) demonstraram que no tecido cortical de camundongos C57Bl/6 ocorre um aumento na liberação do glutamato no 6º d.p.i., sendo que esse efeito está intimamente associado aos sintomas comportamentais apresentados no quadro de MC. A intensa liberação de glutamato no córtex apóia-se no fato de que esta região, diferente do tecido retiniano, é a principal responsável pelos aspectos comportamentais que encontram-se alterados no quadro de MC.

Ao avaliarmos se o aumento na captação de glutamato e da síntese da molécula de glutathiona nos estágios terminais da MC estavam apenas relacionados a funcionalidade do sistema x_{CG}^- , demonstramos que nesta fase da infecção um intenso e evidente aumento na expressão deste transportador também pode ser evidenciado no tecido retiniano dos camundongos com o quadro clínico de MC.

Semelhante ao observado em nossos resultados, em doenças neuroinflamatórias como a esclerose múltipla e em modelos experimentais para encefalites autoimunes, também descreve-se um aumento na expressão do sistema de transporte x_{CG}^- em linhagem de monócitos. O aumento na expressão deste sistema também mostra-se relacionado ao aumento da síntese glutathiona neste tipo celular (Pampliega et al., 2011).

Assim, uma importante contribuição do presente trabalho foi a determinação de eventos neuroquímicos desencadeados na ausência de uma resposta inflamatória no tecido retiniano dentro do quadro de MC. Somado a isso, demonstramos também que este tecido responde a uma possível sensibilização ao estresse oxidativo (diminuição de GSH) aumentando a expressão de um sistema de transporte que reconhecidamente está associado

a síntese do tripeptídeo GSH (Oliveira et al, 2010). Embora os mecanismos celulares que regulam o aumento desta expressão ainda não estejam esclarecidos, nossos resultados podem ser de grande valia para estudos posteriores e quem sabe para o desenvolvimento de novas terapias voltadas para o tratamento e prevenção deste quadro de malária grave.

6. CONCLUSÃO

- A infecção por PbA apresenta um curso agudo e letal nas linhagens de camundongos C57BL/6, com manifestações clínicas mais evidentes entre o 6º e 9º dia após a infecção, momento em que a parasitemia permanecia em níveis baixos, em torno de 15-20%.

- Durante o desenvolvimento do quadro de MC, os níveis de TNF- α aumentaram no tecido cerebral, no entanto, na retina os níveis desta citocina mantiveram-se baixos, caracterizando a ausência de resposta inflamatória neste tecido.

- A ausência de expressão da enzima NOS2 no tecido retiniano de animais com MC ratifica a inexistência da resposta inflamatória caracterizada anteriormente.

- No tecido retiniano de animais com MC mostramos uma diminuição na quantidade de GSH, que com o decorrer da infecção mostrava-se menos evidente, demonstrando que o tecido apresenta-se mais susceptível a condição de estresse oxidativo.

- Durante o decorrer da infecção houve um aumento na captação de glutamato dependente de Na⁺ no tecido retiniano, demonstrando o envolvimento os sistemas de transporte de aminoácidos nesta patologia.

- A avaliação da captação de glutamato na ausência do íon Na⁺ mostrou o envolvimento de um sistema de transporte independente de Na⁺ na patologia da MC.

- No tecido retiniano de animais com MC mostramos uma diminuição na liberação do glutamato no estágio terminal da doença.

- Na retina de camundongos infectados com a cepa PbA demonstramos a participação do sistema de transporte x_{CG}^- na patologia da MC, na fase mais tardia da MC.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, S.; BROWN, H.; TURNER, G. Breaking down the blood-brain barrier: signaling a path to cerebral malaria? **Trends in Parasitology**, 18(8): 360-6, 2002.
- ALDERTON, W.K.; COOPER, C.E.; KNOWLES, R.G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **The Biochemical Journal**, 357: 593-615, 2001.
- ALLEN, J.W.; SHANKER, G.; ASCHNER, M. Methylmercury inhibits the in vitro uptake of the glutathione precursor, cystine, in astrocytes, but not in neurons. **Brain Research**, 894: 131-140, 2001.
- AMANI, V.; BOUBOU, M.I.; PIED, S.; MARUSSIG, M.; WALLIKER, D.; MAZIER, D.; RÉNIA, L. Cloned lines of Plasmodium berghei ANKA differ in their abilities to induce experimental cerebral malaria. **Infection and Immunity**, 66(9): 4093-9, 1998.
- ANDERSON, M. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological sample. **Methods Enzymology**, 113: 548-555, 1969.
- BAGOT, S.; IDRISSE-BOUBOU, M.; CAMPINO, S.; BEHRSCHEMIDT, C.; GORGETTE, O.; GUÉNET, J.L.; PENHA-GONÇALVES, C.; MAZIER, D.; PIED, S.; CAZENAVE, P.A. Susceptibility to experimental cerebral malaria induced by Plasmodium berghei ANKA in inbred mouse strains recently derived from wild stock. **Infection and Immunity**, 70(4): 2049-56, 2002.
- BAINS, J.S.; SHAW, C.A. Neurodegenerative disorders in humans: the role of glutathione in oxidative stress-mediated neuronal death. **Brain Research Reviews**, 25: 335-358, 1997.
- BAKER, D.A. Malaria gametocytogenesis. **Molecular and Biochemical Parasitology**, 172: 57-65, 2010.

- BEARE, N.A.V.; TAYLOR, T.E.; HARDING, S.P.; LEWALLEN, S.; MOLYNEUX, M.E. Malarial retinopathy; a newly established diagnostic sign in severe malaria. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 75(5): 790-797, 2006.
- BERT, P.M. & O'SHEA, R.D. Transporters of L-glutamate: an update on their molecular pharmacology and pathological involvement. **British Journal of Pharmacology**, 150: 5-17, 2007.
- BENARROCH, E.E. Glutamate transporters: diversity, function, and involvement in neurologic disease. **Neurology**, 74(3): 259-64, 2010.
- BERENDT, A.R.; TURNER, G.D.H.; NEWBOLD, C.I. Cerebral malaria: the sequestration hypothesis. **Parasitology Today**, 10: 412-414, 1994.
- BONDI, F.S. The incidence and outcome of neurological abnormalities in childhood cerebral malaria: a long-term follow-up of 62 survivors. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 86(1): 17-9, 1992.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, 72: 248-54, 1976.
- BRAMALL, A.N.; WRIGHT, A.F.; JACOBSON, S.G.; McINNES, R.E. The genomic, biochemical, and cellular responses of the retina in inherited photoreceptor degenerations and prospects for the treatment of these disorders. **Annuals Reviews in Neuroscience**, 33; 441-472, 2010.
- BRIDGES, R.J.; ESSLINGER, C.S. The excitatory amino acid transporters: Pharmacological insights on substrate and inhibitor specificity of the EAAT subtypes. **Pharmacology & Therapeutics**, 107: 271-285, 2005.

BRINGMANN, A.; PANNICKE, T.; BIEDERMANN, B.; FRANCKE, M.; IANDIEV, I.; GROSCHE, J.; WIEDEMANN, P.; ALBRECHT, J.; REICHENBACH, A. Role of retinal glial cells in neurotransmitter uptake and metabolism. **Neurochemistry International**, 54:143-60, 2008.

BROWN, H.; TURNER, G.; ROGERSON, S.; TEMBO, M.; MWENECHANYA, J.; MOLYNEUX, M.; TAYLOR, T. Cytokine expression in the brain in human cerebral malaria. **The Journal of Infectious Diseases**, 180(5): 1742-6, 1999.

CARRASCO, M.C.; NAVASCUÉS, J.; CUADROS, M.A.; CALVENTE, R.; MARTÍN-OLIVA, D.; SANTOS, A.M.; SIERRA, A.; FERRER-MARTÍN, R.S.; MARÍN-TEVA, J.L. Migration and ramification of microglia in quail embryo retina organotypic cultures. **Developmental Neurobiology**, 71(4): 296-315, 2011.

CHEN, Q.; SCHLICHTERLE, M.; WAHLGREN, M. Molecular aspects of severe malaria. **Clinical Microbiology Reviews**, 13(3): 439-50, 2000.

CLARK, I.A. & ROCKETT. The cytokine theory of human cerebral malaria. **Parasitology Today**, 10: 410-412, 1994.

CLARK, I.A.; AL YAMAN, F.M.; JACOBSON, L.S. The biological basis of malaria disease. **International Journal for Parasitology**, 27(10): 1237-1249, 1997.

CLARK, I.A.; COWDEN, W.B. Why is the pathology of falciparum worse than that of vivax malaria? **Parasitology Today**, 15(11): 458-61, 1999.

COMBES, V.; DE SOUZA, J.B.; RÉNIA, L.; HUNT, N.H.; GRAU, G.E. Cerebral malaria: which parasite? Which model?. **Inflammation and Infectious Diseases**, 2(2): 141-147, 2005.

- COOPER, A.J.L.; KRISTAL, B.S. Multiple roles of glutathione in the central nervous system. **Acta Neurophatological**, 79: 176-182, 1997.
- CURFS, J.H.; HERMSEN, C.C.; MEUWISSEN, J.H.; ELING, W.M. Immunization against cerebral pathology in Plasmodium berghei-infected mice. **Parasitology**, 105: 7-14, 1992.
- DANBOLT, N.C.; CHAUDHRY, F.A.; DEHNES, Y.; LEHRE, K.P.; LEVY, L.M.; ULLENSVANG, K.; STORM-MATHISEN, J. Properties and localization of glutamate transporters. **Progress in Brain Research**, 116: 23-43, 1998.
- DANBOLT, N.C. Glutamate uptake. **Progress in Neurobiology**, 65: 1-105, 2001
- DA SILVA-NUNES, M.; CODEÇO, C.T.; MALAFRONTTE, R.S.; DA SILVA, N.S.; JUNCANSEN, C.; MUNIZ, P.T.; FERREIRA, M.U. Malaria on the Amazonian frontier: transmission dynamics, risk factors, spatial distribution, and prospects for control. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 79(4): 624-35, 2008.
- DE SOUZA, J.B. & RILEY, E.M. Cerebral malaria: the contribution of studies in animal models to our understanding of immunopathogenesis. **Microbes and Infection**, 4: 291-300, 2002.
- DE SOUZA, J.B.; HAFALLA, J.C.; RILEY, E.M.; COUPER, K.N. Cerebral malaria: why experimental murine models are required to understand the pathogenesis of disease. **Parasitology**, 137(5): 755-72, 2010.
- DESRUISSEAU, M.S.; MACHADO, F.S.; WEISS, L.M.; TANOWITZ, H.B.; GOLIGHTLY, L.M. Cerebral malaria: a vasculopathy. **The American Journal of Pathology**, 176(3): 1075-8, 2010.
- DRINGEN, R.; GUTTERER, J.M.; HIRRLINGER, J. Glutathione metabolism in brain: metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense

against reactive oxygen species. **European Journal of Biochemistry**, 267: 4912-4916, 2000.

EKSI, S.; CZESNY, B.; VAN GEMERT, G.J.; SAUERWEIN, R.W.; ELING, W.; WILLIAMSON, K.C. Malaria transmission-blocking antigen, Psf 230, mediates human red blood cells binding to exflagellating male parasites and oocyst production. **Molecular Microbiology**, 61: 991-8, 2006.

FAVRE, N.; DA LAPEROUSAZ, C.; RYFFEL, B.; WEISS, N.A.; IMHOF, B.A.; RUDIN, W.; LUCAS, R.; PIGUET, P.F. Role of ICAM-1 (CD54) in the development of murine cerebral malaria. **Microbes and Infection**, 1(12): 961-8, 1999.

FINLEY, R.W.; MACKEY, L.J.; LAMBERT, P.H. Virulent *P. berghei* malaria: prolonged survival and decreased cerebral pathology in cell-dependent nude mice. **Journal of Immunology**, 129(5): 2213-8, 1982.

GALLAGHER, S.K.; WITKOVSKY, P.; ROUX, M.J.; LOW, M.J.; OTERO-CORCHON, V.; HENTGES, S.T.; VIGH J. β -Endorphin expression in the mouse retina. **The Journal of Comparative Neurology**, 518: 3130-48, 2010.

GIMENEZ, F.; BARRAUD DE LAGERIE, S.; FERNANDEZ, C.; PINO, P.; MAZIER, D. Tumor necrosis factor alpha in the pathogenesis of cerebral malaria. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 60(8): 1623-35, 2003.

GOOD, M.F.; XU, H.; WYKES, M.; ENGWERDA, C.R. Development and regulation of cell-mediated immune responses to the blood stages of malaria: implications for vaccine research. **Annual Review of Immunology**, 23: 69-99, 2005.

HALDAR, K.; MURPHY, F.C.; MILNER, D.A.; TAYLOR, T.E. Malaria: mechanisms of erythrocytic infection and pathological correlates of severe disease. **Annual Review of Pathology**, 2: 217-49, 2007.

- HANUM, P.S.; HAYANO, M.; KOJIMA, S. Cytokine and chemokine responses in a cerebral malaria-susceptible or -resistant strain of mice to *Plasmodium berghei* ANKA infection: early chemokine expression in the brain. **International Immunology**, 15(5): 633-40, 2003.
- HARADA, T.; HARADA, C.; NAKAMURA, K.; QUAH, H.M.; OKUMURA, A.; NAMEKATA, K.; SAEKI, T.; AIHARA, M.; YOSHIDA, H.; MITANI, A.; TANAKA, K. The potential role of glutamate transporters in the pathogenesis of normal tension glaucoma. **The Journal of Clinical Investigation**, 117(7): 1763-70, 2007.
- HU, S.; SHENG, W.S.; EHRLICH, L.C.; PETERSON, P.K.; CHAO, C.C. Cytokine effects on glutamate uptake by human astrocytes. **Neuroimmunomodulation**, 7(3): 153-9, 2000.
- HUNT, N.H.; GRAU, G.E. Cytokines: accelerators and brakes in the pathogenesis of cerebral malaria. **Trends in Immunology**, 24(9): 491-499, 2003.
- HUNT, N.H.; GOLENSER, J.; CHAN-LING, T.; PAREKH, S.; RAE, C.; POTTER, S.; MEDANA, I.M.; MIU, J.; BALL, H.J. Immunopathogenesis of cerebral malaria. **International Journal for Parasitology**, 36: 569-582, 2006.
- HUSTER, D.; REINCHENBACH, A.; REICHEL, W. The glutathione content of retinal Müller (glial) cells: effect of pathological conditions. **Neurochemistry International**, 36:461-469, 2000.
- IDRO, R.; JENKINS, N.E.; NEWTON, C.R. Pathogenesis, clinical features, and neurological outcome of cerebral malaria. **Lancet Neurology**, 4(12): 827-40, 2005.
- IMASAWA, M.; KASHIWAGI, K.; IIZUKA, Y.; TANAKA, M.; TSUKAHARA, S. Different expression role among glutamate transporters in rat retinal glial

cells under various culture conditions. **Molecular Brain Research**, 142(1): 1-8, 2005.

JACKMAN, N.A.; ULIASZ, T.F.; HEWETT, J.A.; HEWETT, S.J. Regulation of system xc- activity and expression in astrocytes by interleukin -1 β : implications for hypoxic neuronal injury. **Glia**, 58: 1806-1815, 2010.

JIANG, J.; AMARA, S.G. New views of glutamate transporter structure and function: advances and challenges. **Neuropharmacology**, 60:172-81, 2011.

KIRCHGATTER, K. & DEL PORTILLO, H.A. Clinical and molecular aspects of severe malaria. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 77(3): 455-475, 2005.

KOCH, H.P.; BROWN, R.L.; LARSSON, H.P. The glutamate-activated anion conductance in excitatory amino acid transporters is gated independently by the individual subunits. **Journal of Neuroscience**, 27(11): 2943-7, 2007.

KOLB, H.; NELSON, R.; AHNELT, P.; CUENCA, N. Cellular organization of the vertebrate retina. **Progress in Brain Research**, 131: 3-26, 2001.

KORN, T.; MAGNUS, T.; JUNG, S. Autoantigen specific T cells inhibit glutamate uptake in astrocytes by decreasing expression of astrocytic glutamate transporter GLAST: a mechanism mediated by tumor necrosis factor-alpha. **FASEB J.**, 19: 1878-1880, 2005.

KRETTLI, A. U.; ANDRADE-NETO, V. F.; BRANDÃO, M. G.; FERRARI, W. M. S. The Search for New Antimalarial Drugs from Plants Used to Treat Fever and Malaria or Plants Randomly Selected: a Review. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, 96: 1033-1042, 2001.

KOSSODO, S.; MONSO, C.; JUILLARD, P.; VELU, T.; GOLDMAN, M.; GRAU, GE. Interleukin-10 modulates susceptibility in experimental cerebral malaria. **Immunology**, 91(4): 536-40, 1997.

- LACERDA-QUEIROZ, N.; RODRIGUES, D.H.; VILELA, M.C.; MIRANDA, A.S.; AMARAL, D.C.; CAMARGOS, E.R.; CARVALHO, L.J.; HOWE, C.L.; TEIXEIRA, M.M.; TEIXEIRA, A.L. Inflammatory changes in the central nervous system are associated with behavioral impairment in *Plasmodium berghei* (strain ANKA)-infected mice. **Experimental Parasitology**, 125(3): 271-8, 2010.
- LAMB, T.J.; BROWN, D.E.; POTOCHNIK, A.J.; LANGHORNE, J. Insights into the immunopathogenesis of malaria using mouse models. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, 8(6): 1-22, 2006.
- LEWALLEN, S.; BRONZAN, R.N.; BEARE, N.A.; HARDING, S.P.; MOLYNEUX, M.E.; TAYLOR, T.E. Using malarial retinopathy to improve the classification of children with cerebral malaria. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 102(11): 1089-94, 2008.
- LIU, Y.P.; YANG, C.S.; TZENG, S.F. A Possible Therapeutic Strategy for CNS Repair: To blockade calcium regulation of glutamate aspartate transporter regulation in astrocytes. **Journal of Neurochemistry**, 105: 137-150, 2008.
- LOPANSRI, B.K.; ANSTEY, N.M.; WEINBERG, J.B.; STODDARD, G.J.; HOBBS, M.R.; LEVESQUE, M.C.; MWAIKAMBO, E.D.; GRANGER, D.L. Low plasma arginine concentrations in children with cerebral malaria and decreased nitric oxide production. **Lancet**, 361: 676-8, 2003.
- LOCHHEAD, J.; MOVAFFAGHY, A.; FALSINI, B.; HARDING, S.; RIVA, C.; MOLYNEUX, M. The effects of hypoxia on the ERG in paediatric cerebral malaria. **Eye**, 24(2): 259-64, 2010.
- LOU, J.; GASCHE, Y.; ZHENG, L.; CRITICO, B.; MONSO-HINARD, C.; JUILLARD, P.; MOREL, P.; BUURMAN, W.A.; GRAU, G.E. Differential reactivity of brain microvascular endothelial cells to TNF reflects the genetic susceptibility to cerebral malaria. **European Journal of Immunology**, 28(12): 3989-4000, 1998.

LOU J.; LUCAS, R.; GRAU, G.E. Pathogenesis of cerebral malaria: recent experimental data and possible applications for humans. **Clinical Microbiology Reviews**, 14(4): 810-820, 2001.

MA. N.; MADIGAN, M.C.; CHAN-LING, T.; HUNT, N.H. Compromised blood-nerve barrier, astrogliosis, and myelin disruption in optic nerves during fatal murine cerebral malaria. **Glia**, 19(2): 135-51, 1997.

MA, N.; HUNT, N.H.; MADIGAN, M.C.; CHAN-LING, T. Correlation between enhanced vascular permeability, up-regulation of cellular adhesion molecules and monocyte adhesion to the endothelium in the retina during the development of fatal murine cerebral malaria. **The American Journal of Pathology**, 149(5): 1745-62, 1996.

MANEERAT, Y.; VIRIYAVEJAKUL, P.; PUNPOOWONG, B.; JONES, M.; WILAIRATANA, P.; PONGPONRATN, E.; TURNER, G.D.; UDOMSANGPETCH, R. Inducible nitric oxide synthase expression is increased in the brain in fatal cerebral malaria. **Histopathology**, 37(3): 269-77, 2000.

MARSH, K.; ENGLISH, M.; CRAWNLEY, J.; PESHU, N. The pathogenesis of severe malaria in African children. **Ann. Trop. Med. Parasitol**, 90: 395-402, 1996.

MARTINS, Y.C.; CARVALHO, L.J.M.; DANIEL-RIBEIRO, C.T. Challenges in the determination of early predictors of cerebral malaria: lessons from the human disease and the experimental murine models. **Neuroimmunomodulation**, 16: 134-145, 2009.

MAUDE, R.J.; DONDORP, A.M.; SAYEED, A.A.; DAY, N.P.J.; WHITE, N.J.; BEARE, N.A.V. The eye in cerebral malaria: what can it teach us? **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 103(7): 661-664, 2009.

- McKENZIE, F.E.; SMITH, D.L.; O'MEARA, W. P.; RILEY, E.M. Strain Theory of Malaria: the first 50 years. **Advances in Parasitology**, 66:1-46, 2008.
- MEDANA, I.M.; CHAN-LING, T.; HUNT, N.H. Redistribution and degeneration of retinal astrocytes in experimental murine cerebral malaria: relationship to disruption of the blood-brain barrier. **Glia**, 16:51-64, 1996.
- MEDANA, I.M.; HUNT, N.H.; CHAN-LING, T. Early activation of microglia in the pathogenesis of fatal murine cerebral malaria. **Glia**, 19: 91-103, 1997a.
- MEDANA, I.M.; HUNT, N.H.; CHAUDHRI, G. Tumor Necrosis Factor- α expression in the brain during fatal murine cerebral malaria: evidence for production by microglia and astrocytes. **American Journal of Pathology**, 150(4): 1473-1486, 1997b.
- MEDANA, I.M.; CHAUDHRI, G., CHAN-LING, T., HUNT, N.H. Central nervous system in cerebral malaria: "innocent bystander" or active participant in the induction of immunopathology. **Immunology and Cell Biology**, 79: 101-120, 2001.
- MEDANA, I.M.; TURNER, G.D. Human cerebral malaria and the blood-brain barrier. **International Journal for Parasitology**, 36(5): 555-68, 2006.
- MILLER, L.H.; BARUCH, D.J.; MARSH, K.; DOUMBO, O.K. The pathogenic basis of malaria. **Nature**, 415: 673-679, 2002.
- MINC-GOLOMB, D.; TSARFATY, I.; SCHWARTZ, J.P. Expression of inducible nitric oxide synthase by neurons following exposure to endotoxin and cytokine. **British Journal of Pharmacology**, 112 (3): 720-722, 1994.
- MIRALLES, V. J.; LÓPEZ-MARTÍNEZ, I.; ZARAGOZA, R.; BORRÁS, E.; GARCÍA, C.; PALLARDÓ, F.V.; VIÑA, J.R. Na⁺ dependent glutamate transporters (EAAT1, EAAT2, EAAT3) in primary astrocyte cultures: effect of oxidative stress. **Brain Research**, 922: 21-29, 2001.

- MIRANDA, A.S.; VIEIRA, L.B.; LACERDA-QUEIROZ, N.; SOUZA, A.H.; RODRIGUES, D.H.; VILELA, M.C.; GOMEZ, M.V.; MACHADO, F.S.; RACHID, M.A.; TEIXEIRA, A.L. Increased levels of glutamate in the central nervous system are associated with behavioral symptoms in experimental malaria. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 43: 1173-1177, 2010.
- MOTA, M.M.; PRADEL, G.; VANDERBERG, J.P.; HAFALLA, J.C.; FREVERT, U.; NUSSENZWEIG, R.S.; NUSSENZWEIG, V.; RODRIGUÉZ, A. Migration of *Plasmodium* sporozoites through cells before infections. **Science**, 291: 141-4, 2001.
- NARSARIA, N.; MOHANTY, C.; DAS, B.K.; MISHRA, S.P.; PRASAD, R. Oxidative Stress in Children with Severe Malaria. **Journal of Tropical Pediatrics**, In Press, 2011.
- NATHAN, C.; XIE, Q.W. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. **Cells**, 78 (6): 915-8, 1994
- NICHOLLS, D.; ATTWELL, D. The release and uptake of excitatory amino acids. **Trends in Pharmacological Sciences**, 11: 462-468, 1990.
- OLIVEIRA, K.R.; HERCULANO, A.M.; CRESPO-LÓPEZ, M.E.; DO NASCIMENTO, J.L. Pharmacological characterization of glutamate Na⁺-independent transport in retinal cell cultures: implications in the glutathione metabolism. **Neurochemistry International**, 56(1): 56-99, 2010.
- OMER, F.M.; KURTZHALS, J.A.; RILEY, E.M. Maintaining the immunological balance in parasitic infections: a role for TGF-beta? **Parasitology Today**, 16(1): 18-23, 2000.
- O'SHEA, R.D. Roles and regulation of glutamate transporters in the central nervous system. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, 29: 1018-1023, 2002.

- PACHECO, R.; GALLART, T.; LUIS, C.; FRANCO, R. Role of glutamate on T-cell mediated immunity. **Journal of Neuroimmunology**, 185: 9-19, 2007.
- PAMPLIEGA, O.; DOMERCQ, M.; SORIA, F.N.; VILLOSLADA, P.; RODRÍGUEZ-ANTIGÜEDAD, A.; MATUTE C. Increased expression of cystine/glutamate antiporter in multiple sclerosis. **Journal of Neuroinflammation**, 8(63): 1-12, 2011.
- PARK, C.K.; CHA, J.; PARK, S.C.; LEE, P.Y.; KIM, J.H.; KIM, H.S.; KIM, S.A.; KIM, I.B.; CHUN, M.H. Differential expression of two glutamate transporters, GLAST and GLT-1, in an experimental rat model of glaucoma. **Experimental Brain Research**, 197: 101-9, 2009.
- PATEL, S.N.; BERGHOUT, J.; LOVEGROVE, F.E.; AYI, K.; CONROY, A.; SERGHIDES, L.; MIN-OO, G.; GOWDA, D.C.; SARMA, J.V.; RITTIRSCH, D.; WARD, P.A.; LILES, W.C.; GROS, P.; KAIN, K.C. C5 deficiency and C5a or C5aR blockade protects against cerebral malaria. **The Journal of Experimental Medicine**, 205(5): 1133-43, 2008.
- PERSSON, M.; SANDBERG, M.; HANSSON, E.; RÖNNBÄCK, L. Microglial glutamate uptake is coupled to glutathione synthesis and glutamate release. **European Journal of Neuroscience**, 24(4): 1063-70, 2006.
- PERSSON, M.; PEKNA, M.; HANSSON, E.; RÖNNBÄCK, L. The complement-derived anaphylatoxin C5a increases microglial GLT-1 expression and glutamate uptake in a TNF-alpha-independent manner. **European Journal of Neuroscience**, 29(2): 267-74, 2009.
- PERSSON, M.; RÖNNBÄCK, L. Microglial self-defence mediated through GLT-1 and glutathione. **Amino Acids**, In Press, 2011.
- PIANI, D.; FONTANA, A. Involvement of the cystine transport system Xc⁻ in the macrophage-induced glutamate-dependent cytotoxicity to neurons. **The Journal of Immunology**, 152: 3578-3585, 1994.

POW, D.V.; BARNETT, N.L.; PENFOLD, P. Are neuronal transporters relevant in retinal glutamate homeostasis? **Neurochemistry International**, 37: 191-198, 2000.

POW, D.V. Amino acids and their transporters in the retina. **Neurochemistry International**, 38: 463-484, 2001a.

POW, D.V. Visualising the activity of the cystine-glutamate antiporter in glial cells using antibodies to aminoadipic acid, a selectively transported substrate. **Glia**, 34: 27-38, 2001b.

QUINLAN, E.M.; PHILPOT, B.D.; HUGANIR, R.L.; BEAR, M.F. Rapid, experience-dependent expression of synaptic NMDA receptors in visual cortex in vivo. **Nature Neuroscience**, 2: 352-357, 1999.

RABACCHI, S.; BAILLY, Y.; DELHAYE-BOUCHAUD, N.; MARIANI, J. Involvement of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor in synapse elimination during cerebellar development. **Science**, 256: 1823-1825, 1992.

RAMÓN Y CAJAL, S. Lá Retine de vertebrés. **La cellule**, 9: 119-257, 1892.

RANDALL, L.M.; AMANTE, F.H.; MCSWEENEY, K.A.; ZHOU, Y.; STANLEY, A.C.; HAQUE, A.; JONES, M.K.; HILL, G.R.; BOYLE, G.M.; ENGWERDA, C.R. Common strategies to prevent and modulate experimental cerebral malaria in mouse strains with different susceptibilities. **Infection and immunity**, 76(7): 3312-20, 2008.

RAUEN, T.; KANNER, B.I. Localization of the glutamate transporter GLT-1 in rat and macaque monkey retinae. **Neuroscience Letters**, 169: 137-140, 1994.

RAUEN, T.; ROTHSTEIN, J.D.; WÄSSLE, H. Differential expression of the three glutamate transporter subtypes in the rat retina. **Cell Tissue Research**, 286: 325-336, 1996.

- RAUEN, T. Diversity of glutamate transporter expression and function in the mammalian retina. **Amino Acids**, 19: 53-62, 2000.
- REICHELT, W.; STABEL-BUROW, J.; PANNICKE, T.; WEICHERT, H.; HEINEMANN. The glutathione level of retinal Müller glial cells is dependent on the high-affinity sodium-dependent uptake of glutamate. **Neuroscience**, 77: 1213-1224, 1997.
- REIS, P.A.; COMIM, C.M.; HERMANI, F.; SILVA, B.; BARICHELLO, T.; PORTELLA, A.C.; GOMES, F.C.A.; SAB, I.M.; VALBER S. FRUTUOSO, V.S.; OLIVEIRA, M.F.; BOZZA, P.T.; BOZZA, F.A.; DAL-PIZZOL, F.; ZIMMERMAN, G.A.; QUEVEDO, J.; CASTRO-FARIA-NETO, H.C. Cognitive dysfunction is sustained after rescue therapy in experimental cerebral malaria, and is reduced by additive antioxidant therapy. **PLoS Pathogens**, 6(6): 1-16, 2010.
- REST, J.R. Cerebral malaria in inbred mice. I. A new model and its pathology. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 76(3): 410-5, 1982.
- ROSSI, D.J.; SLATER, N.T. The developmental onset of NMDA receptor-channel activity during neuronal migration. **Neuropharmacology**, 32: 1239-1248, 1993.
- SACHS, J.; MALANEY, P. The economic and social burden of malaria. **Nature**, 415: 680-5, 2002.
- SAGARA, J.; MIURA, K.; BANNAI, S. Cystine uptake and glutathione level in fetal brain cells in primary culture and in suspension. **Journal of Neurochemistry**, 61: 1667-1671, 1993.
- SAYEED, A.A.; MAUDE, R.J.; HASAN, M.U.; MOHAMMED, M.; HOQUE, M.G.; DONDORP, A.M.; FAIZ, M.A. Malaria retinopathy in Bangladeshi adults. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 84(1): 141-

147, 2011.

SCHIMEL, A.M.; ABRAHAM, L.; COX, D.; SENE, A.; KRAUS, C.; DACE, D.S.; ERCAL, N.; APTE, R.S. N-acetylcysteine amide (naca) prevents retinal degeneration by up-regulating reduced glutathione production and reversing lipid peroxidation. **The American Journal of Pathology**, 178(5): 2032-43, 2011.

SCHOFIELD, L., GRAU, G.E. Immunological processes in malaria pathogenesis. **Nature Reviews Immunology**, 5(9): 722-35, 2005.

SEAL, R.P.; AMARA, S.G. Excitatory amino acid transporters: a family in flux. **Annual Review of Pharmacology Toxicology**, 39: 431-456, 1999.

SHIGERI, Y.; SEAL, R.P.; SHIMAMOTO, K. Molecular pharmacology of glutamate transporters EAATs and VGLUTs. **Brain Research Reviews**, 45: 250-265, 2004.

SNOW, R.W.; GUERRA, C.A.; NOOR, A.M.; MYINT, H.Y.; HAY, S.I. The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. **Nature**, 434: 214-7, 2005.

SULLIVAN D. Uncertainty in mapping malaria epidemiology: implications for control. **Epidemiologic Reviews**, 32: 175-187, 2010.

TADEI, W.P.; THACHER, B.D. Malaria vectors in the Brazilian Amazon: *Anopheles* of the subgenus *Nyssorrhynchus*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 42: 87-94, 2000.

TILLEUX S.; HERMANS E. Neuroinflammation and regulation of glial glutamate uptake in neurological disorders. **Journal of neuroscience Research**, 85: 2029-2070, 2007.

TUTEJA, R. Malaria: an overview. **FESB Journal**, 274: 4670-4679, 2007.

VAN DER HEYDE, H.C.; NOLAN, J.; COMBES, V.; GRAMAGLIA, I.; GRAU, G.E. A unified hypothesis for the genesis of cerebral malaria: sequestration, inflammation and hemostasis leading to microcirculatory dysfunction. **Trends in Parasitology**, 22(11): 503-8, 2006.

WALTHER, B.; WALTHER, M. What does it take to control malaria? **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, 101(8): 657-72, 2007.

WARD, M.M.; JOBLING, A.I.; KALLONIATIS, M.; FLETCHER, E.L. Glutamate uptake in retinal glial cells during diabetes. **Diabetologia**, 48(2): 351-60, 2005.

WHEELER, D.L.; CHAPPEY, C.; LASH, A.E.; LEIPE, D.D.; MADDEN, T.L.; SCHULER, G.D.; TATUSOVA, T.A.; RAPP, B.A. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. **Nucleic Acids Research**, 28(1): 10-4, 2000.

WHITE, N.J.; TURNER, G.D.; MEDANA, I.M.; DONDORP, A.M.; DAY, N.P. The murine cerebral malaria phenomenon. **Trends in Parasitology**, 26(1): 11-15, 2010.

WIESE, L.; KURTZHALS, J.A.; PENKOWA, M. Neuronal apoptosis, metallothionein expression and proinflammatory responses during cerebral malaria in mice. **Experimental Neurology**, 200(1): 216-26, 2006.

World Health Organization (WHO) . World Malaria Report, 2009.

World Health Organization (WHO) . World Malaria Report, 2010.

ZENG, K.; XU, H.; CHEN, K.; ZHU, J.; ZHOU, Y.; ZHANG, Q.; MANTIAN, M. Effects of taurine on glutamate uptake and degradation in Müller cells under diabetic conditions via antioxidant mechanism. **Molecular and Cellular Neurosciences**, 45: 192-9, 2010.

ZOU, J.Y.; CREWS, F.T. TNF- α potentiates glutamate neurotoxicity by inhibiting glutamate uptake in organotypic brain slice cultures: neuroprotection by NF κ B inhibition. **Brain Research**, 1034: 11-24, 2005.



Pharmacological characterization of glutamate Na^+ -independent transport in retinal cell cultures: Implications in the glutathione metabolism

Karen Renata Matos Oliveira ^a, Anderson Manoel Herculano ^b, Maria Elena Crespo-López ^c, José Luiz Martins do Nascimento ^{a,*}

^a Laboratório de Neuroquímica Molecular e Celular, Universidade Federal do Pará, Belém, PA, Brazil

^b Laboratório de Neuroendocrinologia, Universidade Federal do Pará, Belém, PA, Brazil

^c Laboratório de Farmacologia Molecular, Universidade Federal do Pará, Belém, PA, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 June 2009

Received in revised form 3 September 2009

Accepted 7 September 2009

Available online 12 September 2009

Keywords:

System x_{CG}^-

Cysteine uptake

Glutamate uptake

System x_{AG}^-

Glutathione

ABSTRACT

L-Glutamate is the primary excitatory neurotransmitter in the mammalian central nervous system (CNS). Mechanisms for the removal of glutamate are vital for maintaining normal function of retina. In the present study, using retinal cell cultures obtained from chick embryos, we characterize, pharmacologically, the presence of two glutamate transporter mechanisms, Na^+ -dependent and Na^+ -independent uptake systems. Na^+ -independent uptake system seems to present characteristics related to system x_{CG}^- (cystine–glutamate exchanger) that in the current work demonstrated highlighted contribution to the glutamate transport in retina, which is not observed in other tissues. Our results showed that glutamate shares x_{CG}^- system with another amino acid, L-cysteine, suggesting the possible involvement of this component in processes related to the release of the glutathione antioxidant molecule. Furthermore, cysteine uptake by Na^+ -independent transport appears to be more evident in glial cell cultures than in neuronal cell cultures. So, Na^+ -independent transport system seems to have other functions besides amino acid transport, demonstrating a physiological role in modulating cell redox status.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

L-Glutamate is the major excitatory neurotransmitter in the mammalian central nervous system (CNS), and has been involved in many complex physiological processes such as developmental plasticity, memory, learning and long-term potentiation (Quinlan et al., 1999; Shigeri et al., 2004). In the retina, this amino acid is responsible for the synaptic transmission between photoreceptor cells, bipolar cells and ganglion cells and its excessive action in different types of receptors may result in neuronal cell death by excitotoxicity (Kalloniatis and Napper, 1996; Rauen et al., 1996).

Several studies have been demonstrated the potential involvement of glutamate-mediated toxicity in both acute (traumatic brain injury, ischaemia) and chronic (Alzheimer's disease, Huntington's disease, glaucoma and most recently, Wernicke's encephalopathy) neurodegenerative conditions (Suemori et al., 2006; Sheldon and Robinson, 2007; Hazell, 2009).

Thereby, termination of glutamatergic neurotransmission is achieved by the removal of glutamate from the extracellular space by molecular transporters located in the plasmatic membrane of

pre-synaptic terminals and surrounding glial cells (O'Shea, 2002; Beart and O'Shea, 2007). In the CNS, excitatory amino acid transporters (EAATs) are the main responsible for the removal of glutamate neurotransmitter, maintaining its extracellular concentration below excitotoxic levels (Danbolt, 2001; Balcar, 2002; Kanai and Hediger, 2004). The transport of glutamate by EAATs is characterized as electrogenic, once it is thermodynamically coupled to the cotransport of at least two sodium ions (Na^+), one proton (H^+) and the counter-transport of a potassium ion (Tanaka, 2000; Amara and Fontana, 2002; Bridges and Esslinger, 2005). Thereby, these transporters are known as Na^+ -dependent high-affinity glutamate transporters (Shigeri et al., 2004; Bridges and Esslinger, 2005). This transport is, also, coupled to a Cl^- channel, which function has not already been described.

Furthermore, a great number of different membrane transporters have already been characterized, regulating the flux of glutamate in distinct areas of the CNS, including the retina. These systems are commonly differentiated based upon their ionic dependence and include both sodium-independent system x_{CG}^- (Baker et al., 2002; Patel et al., 2004) and sodium-dependent system x_{AG}^- represented by the EAATs (Palacin et al., 1998; McBean, 2002).

System x_{CG}^- (cystine–glutamate exchanger) is a member of the glycoprotein-associated amino acid transporter family and has already been described in hepatocytes, alveolar type II cells, human

* Corresponding author at: Laboratório de Neuroquímica Molecular e Celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Campus Universitário do Guamá, Rua Augusto Corrêa 01, 66075-110 Belém, PA, Brazil. Tel.: +55 91 3201 7545; fax: +55 91 3182 1601.

E-mail address: jlmm@ufpa.br (J.L.M. do Nascimento).

endothelial cells and macrophages (Ishii et al., 1992). In the CNS, this system was identified in primary cultures of neurons (Sagara et al., 1993) and astrocytes (Allen et al., 2001; Goehner and Robinson, 2001); C6 glioma cells (Cho and Bannai, 1990); microglia (Piani and Fontana, 1994) and human gliomas (Ye et al., 1999).

Under physiological conditions, system x_{CG}^- transports cystine into cells coupled to the efflux of intracellular glutamate, by a Na^+ -independent mechanism (Bender et al., 2000). Once taken up by cells, cystine is rapidly and spontaneously reduced to cysteine, which is required for the synthesis of glutathione (GSH), an endogenous antioxidant essential for cellular defense (McBean, 2002; Tomi et al., 2003). The tripeptide GSH is produced from the amino acids glutamate, cysteine and glycine by the consecutive actions of two enzymatic reactions (Yoneyama et al., 2008) and its role as a free radical scavenger is particularly important in the retina since this tissue is extremely vulnerable to oxidation because of its high oxygen consumption, high unsaturated fatty acid content and exposure to light (Handelman and Dratz, 1986; Ahuja et al., 2005). Furthermore, system x_{CG}^- can also mediate the influx of glutamate when its concentration outside the cell is higher (Bringmann et al., 2009).

Indeed, it is becoming increasingly relevant the importance of the inter-dependency between neurons and astrocytes in maintaining the level of some intracellular molecules and amino acids (Struzynska, 2009). Cysteine, the rate-limiting substrate for the glutathione synthesis, is one of these amino acids, which is continuously released from astrocyte and taken up by neuronal cells (Wang and Cynader, 2000; Stewart et al., 2002; Bringmann et al., 2009).

Both *in vivo* and *in vitro* studies demonstrated that GSH levels are, usually, higher in astrocytes than in neurons, varying in function of the CNS area (Langeveld et al., 1996; Cooper and Kristal, 1997; Dringen et al., 2000; Struzynska, 2009). In culture models, the low levels of GSH in neurons are justified by the fact that these cells are unable to transport cystine, rely on the availability of cysteine for their GSH synthesis (Kranich et al., 1996).

In C6 glioma cells, cystine used for GSH synthesis is obtained, principally, by the transport system x_{CG}^- (Cho and Bannai, 1990). Although, it is not clear which system, x_{AG}^- or x_{CG}^- , is the principal responsible for the levels of GSH and also, the mechanisms used by systems during this process.

Besides, a wide variety of works are being developed, trying to elucidate the mechanisms whereby GSH can be released by cells (Dringen et al., 1997, 1999). Sagara et al. (1996) suggested that, in astrocytes, this release could be ion independent and mediated by a carrier protein, although little is known about this process. Recently, the multidrug transporter protein (MRP1) has been shown to be responsible for the efflux of GSH from astrocytes under oxidative stress conditions, although it is not clear the involvement of this carrier under physiological conditions (Hirrlinger et al., 2001; Minich et al., 2006).

Based on that, in the present work, primary retinal cell cultures were employed as an experimental model to assess the participation of Na^+ -dependent and Na^+ -independent systems in the glutamate and cysteine transport, highlighting the possible involvement of these systems in the metabolism of glutathione.

1. Materials and methods

1.1. Materials

Cell culture reagents were obtained from GIBCO (Paisley, UK) and tissue culture plasticware from TPP. L - $[^3H]$ Glutamate (specific activity—1050 Ci/mmol) and L - $[^{35}S]$ Cysteine (specific activity—1050 Ci/mmol) were purchased from Amersham Bioscience Biotech (Hampshire, UK). Polyornithine, L -glutamate, cysteine, glutathione and transporter inhibitors, such as *DL*-threo- β -benzyloxyaspartate (TBOA) and *L*-trans-pyrrolidine-2,4-dicarboxylic acid (PDC) were provided by Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). All other reagents were of analytical grade. Fertilized white Leghorn eggs were obtained from a local hatchery and maintained at a humid atmosphere.

1.2. Retinal cell culture

Chick embryos were staged according to Hamburguer and Hamilton (1951) and neuron/glia-mixed cultures were prepared as previously described by Herculano et al. (2006). Briefly, under sterile conditions, 7–8-day old chick embryo (E7–E8) retinas were properly dissected on calcium and magnesium-free salt balanced solution (CMF) at 0–4 °C, cleared from the pigmented epithelium and other ocular tissues. For enzymatic dissociation, retina was transferred to a glass containing trypsin (0.05%) for 3–5 min at 37 °C. After, the tissue was mechanically dissociated with a pipette and then submitted to a brief centrifugation. The pellet was suspended in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin and 500 μ g/ml glutamine. Cells were seeded in 35 mm plastic dishes, pretreated with polyornithine (10 μ g/ml during 30 min) and maintained at 37 °C in a humidified 5% CO_2 –95% air atmosphere. After 7–8 days *in vitro* (DIV7–DIV8), cultures showed a confluent monolayer containing both neurons and glial cells at a density of 2 – 3×10^6 cells per plate.

1.3. Retinal glial cell culture

Purified glial cell cultures were prepared from the retina of 9–10-day old chick embryos as described earlier. After carefully dissecting, retinal cells were plated into 35 mm cultures dishes without pretreatment with polyornithine. The cultures were maintained in DMEM with 10% FBS during, at least, 15 days (DIV15) until confluent monolayer was formed, containing, predominantly, glial cells ($\approx 95\%$) and a small number of neurons ($\approx 5\%$). In order to accelerate neuronal cell death, the culture medium was replenished every 3 days.

1.4. Retinal neuronal cell culture

Retinal neuronal cell cultures were also prepared from 7-day old chick embryos using the same procedures above, with slight modifications. Cells were cultivated in DMEM supplemented with 1% FBS in 35 mm plates and pretreated with polyornithine. Neuronal cultures were maintained during 5 days *in vitro* (DIV5) at 37 °C in an atmosphere containing 95% of air and 5% of CO_2 , and after this period no glial contamination (less than 5%) was detected in confluent neuronal culture.

1.5. L - $[^3H]$ Glutamate and L - $[^{35}S]$ Cysteine uptake assay in primary retinal cell cultures

After reaching full confluency, cultures were used to perform the uptake assay as described previously (do Nascimento et al., 1998). To evaluate glutamate uptake, retinal cultures were washed four times with modified Hank's balanced salt solution, which consists of (in mM): NaCl 128, KCl 4, $MgCl_2$ 1, $CaCl_2$ 2, glucose 12 and HEPES 20, adjusted to pH 7.4, and then incubated with $[^3H]$ Glutamate (1 μ Ci/ml) during 5 min. To study Na^+ -dependent glutamate transport, sodium chloride (NaCl) was replaced by lithium chloride (LiCl) in the uptake buffer. All uptake assays were performed at room temperature (37 °C). After $[^3H]$ Glutamate time incubation, the uptake was stopped by rapidly rinsing the cells three times with ice-cold Hank's solution and then, cells were lysed with 5% TCA. The radioactivity presented in the cells was determined by liquid scintillation spectroscopy.

To further characterize the effect of glutamate transport inhibitors, cells were pretreated (before $[^3H]$ Glutamate incubation) during 10 min with TBOA and PDC, separately, at 10 μ M, 50 μ M, 100 μ M and 500 μ M. Indeed, the same procedure was used to evaluate the effect of cysteine.

L - $[^{35}S]$ Cysteine uptake assay was assessed according to the methodology described above, substituting $[^3H]$ Glutamate by $[^{35}S]$ Cysteine.

Likewise, the same procedure was applied to evaluate glutamate and cysteine transport in the three types of cultures used in the present work.

1.6. Glutathione assay

Intracellular and extracellular levels of glutathione (GSH) were determined by the method described by Anderson (1969) with minor modifications. This procedure allows to determine, spectrophotometrically, the total levels of glutathione (GSH and GSSG) by the reduction of 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) in nitrobenzoic acid (TNB). In this reaction, the sample is incubated in two different groups: in the first group the sample is incubated only with DTNB to measure the levels of $-SH$ group and in the second group the sample is incubated with GSH reductase (that converts GSSG into GSH), NADPH and DTNB to measure the total levels of GSH produced by the reaction. Then, the final result is expressed by the difference between these two groups as the total levels of glutathione.

To evaluate the relationship between Na^+ -independent transport and GSH content, the culture medium was removed and the cells were quickly washed three times with Hank's solution (pH 7.4). Subsequently, cultures were incubated, during 90 min with: Hank's solution–LiCl (as control); cysteine (500 μ M); PDC (500 μ M) and cysteine (500 μ M) + PDC (500 μ M).

After the treatment, the incubation medium was removed and substituted with PBS/EDTA (1 mM) to scrape the cells. An aliquot was separated to protein determination, using the method described by Lowry et al. (1951). The left volume was centrifuged at 3000 rpm, during 10 min.

The supernatant was separated and incubated in assay solution containing PBS/EDTA (1 mM); GSH reductase (100 U/ml) and NADPH (4 mM). After 15 min, DTNB (5 mM) was added to the reaction. The results of total GSH were expressed in percentage of the control.

To determine the levels of total glutathione by Na⁺-dependent system, the buffer containing LiCl was replaced by the buffer containing NaCl.

The extracellular content of glutathione was assessed by the treatment of mixed retinal cultures with: Hank's solution–LiCl (as control) and cysteine (500 μM), separately, during 1 h. After this period, the cultures were rinsed three times with Hank's solution and maintained for more than 1 h with buffer. The buffer was taken off and the levels of GSH were determined according to the protocol described above.

1.7. Statistical analysis

All experiments were conducted in duplicate or triplicate and repeated three to four times. Data were expressed as means ± SD of percent of control. Statistical analysis were performed by Student's *t*-test for the comparison of two groups and ANOVA followed by Tukey–Kramer for multiple comparison test. All analyses were performed with GraphPad Instat version 2.05.

2. Results

2.1. Glutamate transport in retinal cell culture

To characterize the involvement of different uptake systems in glutamate transport, mixed retinal cell cultures were submitted to the uptake assay with ³H-glutamate in the presence and absence of NaCl. The results demonstrated that the absence of Na⁺ led to a significant decrease in ³H-glutamate uptake, therefore, indicating the presence of two distinct mechanisms of glutamate transport in retinal cultures, a Na⁺-dependent (52 ± 7.69%) and a Na⁺-independent (48 ± 4.83%) transport systems (Fig. 1).

To assure the specificity of glutamate transport, uptake assays were carried out in the presence of different concentrations of PDC or TBOA. Results in Fig. 2, showed a highly potent and significant concentration-dependent inhibition of glutamate uptake by both inhibitors, suggesting that PDC and TBOA are able to inhibit both Na⁺-dependent and Na⁺-independent glutamate transport.

Once 48% of total glutamate uptake occurred in the absence of NaCl, further experiments were conducted in order to establish and characterize the great involvement of a Na⁺-independent system for glutamate transport in retinal cells.

2.2. Na⁺-independent glutamate transport in retinal cell cultures

In order to verify the specificity of Na⁺-independent transport for glutamate, retinal cell cultures were treated with different concentrations of PDC. Our results showed a significant reduction of ³H-glutamate transport in all used PDC concentrations (Fig. 3a).

Since previous works demonstrated that both glutamate and cysteine represent important substrates for x_{CG}⁻ system, we

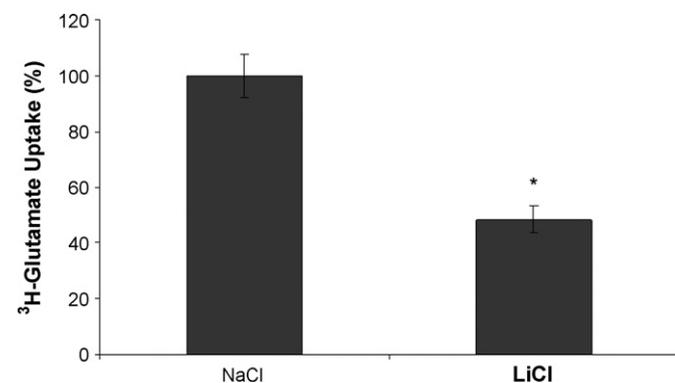


Fig. 1. Na⁺-dependent and Na⁺-independent ³H-L-glutamate uptake in mixed retinal cultures from chick embryo (E8DIV7). Na⁺-dependent ³H-L-glutamate uptake value is calculated by the difference between the two components. **p* < 0.001 (Student's *t*-test).

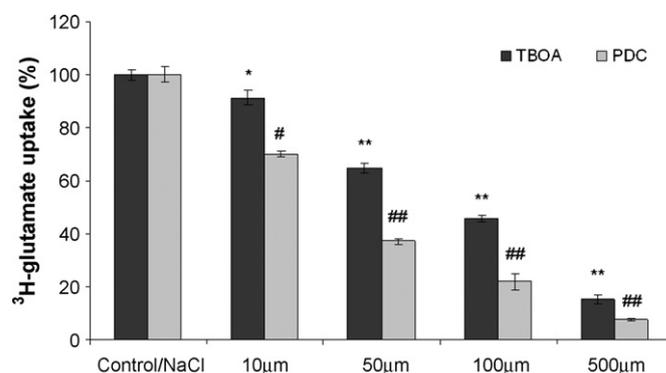


Fig. 2. Effect of different concentrations of TBOA and PDC in the Na⁺-dependent ³H-L-glutamate uptake in mixed retinal cultures from chick embryo (E8DIV7). **p* < 0.01 vs control/NaCl TBOA; ***p* < 0.001 vs control/NaCl TBOA; #*p* < 0.01 vs control/NaCl PDC; ##*p* < 0.001 vs control/NaCl PDC (ANOVA, Tukey–Kramer post-test).

evaluated the effect of cysteine treatment (50 μM, 100 μM, 500 μM and 1 mM) in Na⁺-independent glutamate transport. At the concentration of 50 μM, a slight decrease of 10 ± 9.07% in the glutamate uptake value was observed, which remained at the concentration of 100 μM. However, a higher reduction (31 ± 7.28%) was noticed in the presence of 500 μM of cysteine (Fig. 3b). At higher concentrations as 1 mM, the blockade of glutamate uptake by cysteine became more evident, decreasing the transport around 62 ± 2.71%, as shown in Fig. 3b. DTT (500 μM), used as control, did not show any influence in the ³H-glutamate uptake value (Fig. 3b). These results demonstrated that glutamate Na⁺-independent transport could be regulated by the amino acid cysteine.

2.3. Cysteine uptake in retinal cell cultures

As cysteine elicited an inhibitory effect towards Na⁺-independent glutamate uptake, evidencing that this component exhibit characteristics related to the x_{CG}⁻ system, we focus our work in the direct activity of this transporter, evaluating the uptake of cysteine by this system.

To characterize cysteine transport system, mixed retinal cell cultures were submitted to the uptake assay with ³⁵S-cysteine in presence and absence of NaCl. As shown in Fig. 4a, the removal of Na⁺ (equimolar substitution by LiCl) promoted a reduction of (48 ± 5%) in the total of ³⁵S-cysteine uptake, similar of what was noticed in the uptake assay with ³H-glutamate (Fig. 1).

To ensure that Na⁺-independent component present itself as the glutamate–cysteine exchanger, we evaluated ³⁵S-cysteine uptake rate in the presence of different concentrations of glutamate. As shown in Fig. 4b, glutamate (20 μM, 60 μM and 100 μM) reduced ³⁵S-cysteine uptake to about 51 ± 4%, 67 ± 8.6% and 75 ± 5.8%, respectively.

As shown in Fig. 4c, the use of PDC at the concentrations of 10 μM, 50 μM, 100 μM and 500 μM promoted a decrease of 23 ± 3.81%, 38 ± 1.25%, 63 ± 3.43% and 66 ± 4.37% in ³⁵S-cysteine uptake value, respectively.

2.4. Cysteine transport in neurons purified culture and in glial purified cultures of retina

After characterization of Na⁺-independent transport as an important agent of glutamate–cysteine transport in the retinal cells, we investigated its functional localization in two different cellular types present in culture. To ensure the phenotype of the different types of cultures, an immunocytochemical study was performed, showing that glial purified cultures were >95% positives for synemin while neurons purified cultures were >95% positives for β-acetyltubulin (da Costa et al., 2009) (data not showed).

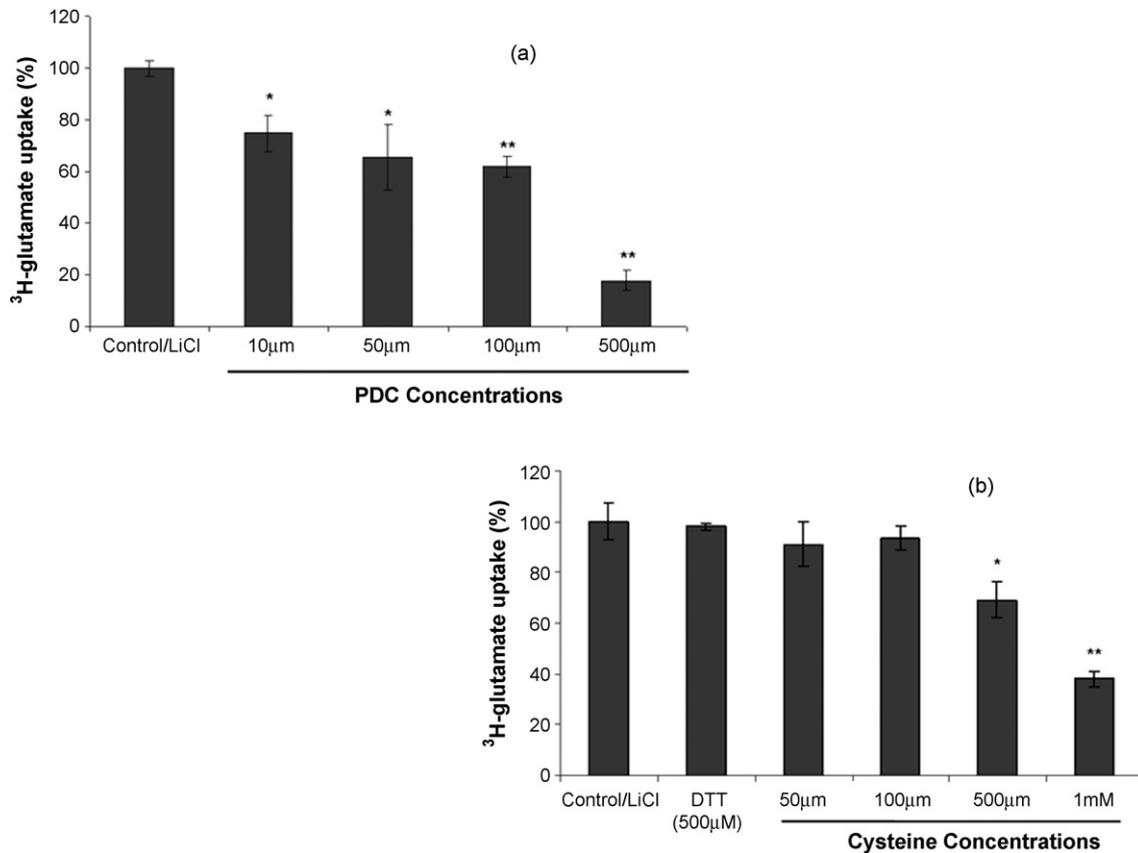


Fig. 3. Effect of different concentrations of PDC (a) and L-cysteine (b) in the Na⁺-independent ³H-L-glutamate uptake in mixed retinal cultures from chick embryo (E8DIV7). (a) **p* < 0.01 vs control/LiCl; ***p* < 0.001 vs control/LiCl (ANOVA, Tukey–Kramer post-test). (b) **p* < 0.01 vs control/LiCl; ***p* < 0.001 vs control/LiCl (ANOVA, Tukey–Kramer post-test).

³⁵S-cysteine uptake assay was carried out in order to determine the contribution of Na⁺-independent component to the cysteine transport in neurons purified culture and in glial purified culture. As demonstrated in Fig. 5, the removal of Na⁺ promoted a large

inhibition ($86 \pm 2.3\%$) of ³⁵S-cysteine uptake in neurons purified culture. However, in glial purified cultures, we observed a discrete reduction ($18 \pm 5.67\%$) of ³⁵S-cysteine uptake values, suggesting a higher participation (82%) of Na⁺-independent component in this

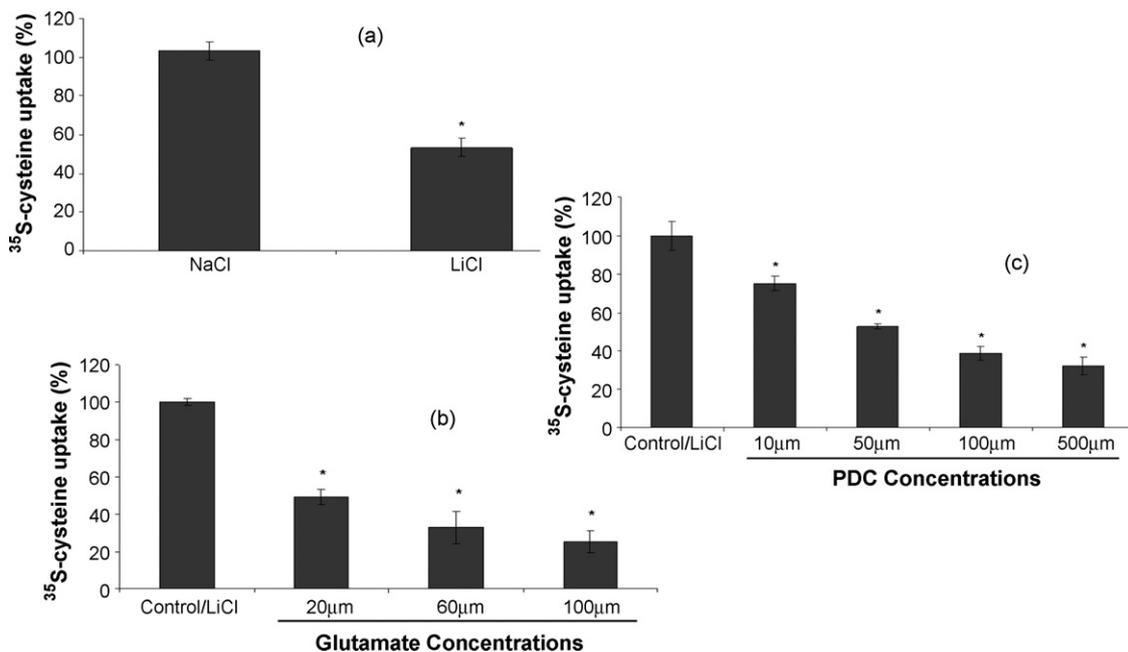


Fig. 4. Na⁺-dependent and Na⁺-independent ³⁵S-cysteine uptake in mixed retinal cultures from chick embryo (E8DIV7). Na⁺-dependent ³⁵S-cysteine uptake value is calculated by the difference between the two components, (a) **p* < 0.001 (Student's *t*-test); effect of different concentrations of glutamate in the Na⁺-independent ³⁵S-cysteine uptake in mixed retinal cultures from chick embryo (E8DIV7), (b) **p* < 0.001 vs control/LiCl (ANOVA, Tukey–Kramer post-test); effect of different concentrations of PDC in the Na⁺-independent ³⁵S-cysteine uptake in mixed retinal cultures from chick embryo (E8DIV7), (c) **p* < 0.001 vs control/LiCl (ANOVA, Tukey–Kramer post-test).

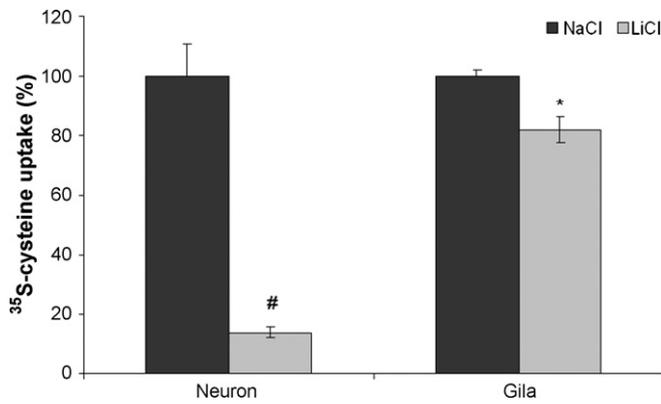


Fig. 5. Na⁺-dependent and Na⁺-independent ³⁵S-cysteine uptake in neuronal cell cultures (E7DIV4) and glial cell cultures (E9DIV15) from chick embryo. #*p* < 0.001 vs NaCl/neuron; **p* < 0.05 vs NaCl/glia; (Student's *t*-test).

cellular type. These results strongly suggested that x_{CC}⁻ system is localized in Müller glial cells.

2.5. Total glutathione (GSH) levels in mixed retinal cell cultures

Several mechanisms of amino acid transport, as system x_{AG}⁻ and system x_{CC}⁻, seem to be involved in the synthesis of GSH molecule. In this way, the intracellular concentration of GSH was measured in retinal cell cultures in the presence of NaCl and in the presence of LiCl to evaluate the contribution of both components (Na⁺-dependent and Na⁺-independent systems) in the formation of intracellular GSH. The results demonstrated that, during a period of 2 h, the intracellular levels of GSH were not significantly different between the Na⁺-dependent transport (35 μmol/mg/min) and the Na⁺-independent transport (36 μmol/mg/min), showing that in retina cells, the main route responsible for the GSH synthesis seemed not to be related to Na⁺-dependent component (Fig. 6a).

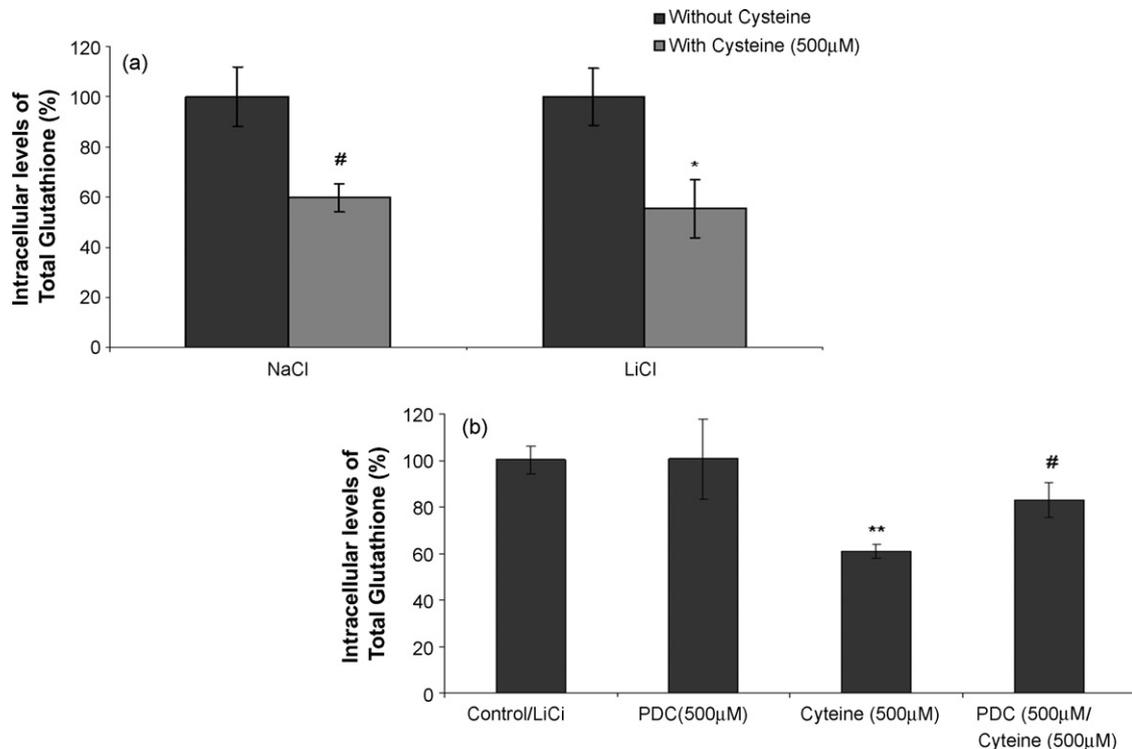


Fig. 6. Effect of cysteine (a) and cysteine + PDC (b) in the intracellular levels of glutathione in mixed retinal cell cultures from chick embryo (E8DIV7). (a) #*p* < 0.001 vs without cysteine/NaCl; **p* < 0.001 vs with cysteine/LiCl; (Student's *t*-test); (b) ***p* < 0.001 vs control/LiCl; #*p* < 0.01 vs cysteine (500 μM) (ANOVA, Tukey–Kramer post-test).

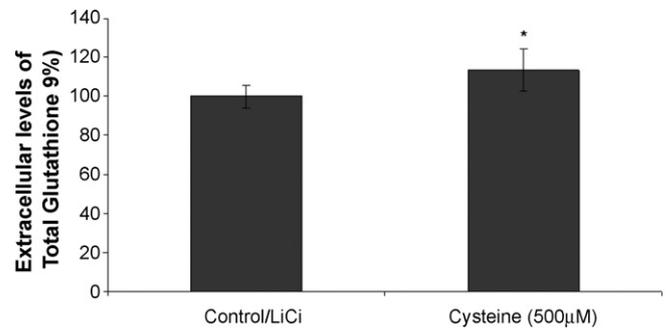


Fig. 7. Effect of cysteine in the extracellular levels of glutathione in mixed retinal cell culture from chick embryo (E8DIV7). **p* < 0.01 vs control/LiCl (Student's *t*-test).

Interestingly, treatment with 500 μM of cysteine, a key rate-limiting substrate for GSH biosynthesis, led to a reduction of 43% in the concentration of intracellular GSH (20 μmol/mg/min) in relation with control (35 μmol/mg/min) (Fig. 6a). As Na⁺-independent component seems to be the main system involved in the regulation of GSH content, in subsequent experiments we characterized the activity of this component by examining the combining effect of cysteine (500 μM) with PDC (500 μM) characterized in early experiments as a blocker of Na⁺-independently system. As shown in Fig. 6b this treatment gradually recovered the effect induced by cysteine, resulting in an increase of 23 ± 7.39% in the levels of intracellular GSH in comparison to the group exposed only to cysteine. The group treated only with PDC did not show any alteration in the amount of intracellular GSH, exhibiting the same levels as the control group.

In order to evaluate if cysteine treatment could have induced an efflux of GSH we performed the measurement of extracellular levels of GSH. In Fig. 7, we demonstrated that cysteine increase in 22% GSH levels in the extracellular medium, differing from what was observed in the intracellular medium.

3. Discussion

In retina, an important structure of the visual system, different mechanisms of cellular transport play an essential role in maintaining the glutamate neurotransmitter at lower concentrations in the synaptic cleft, ensuring the normal function of this tissue and also protecting the neurons from possible excitotoxic damages. The results obtained in the present study showed that retinal cells taken up the extracellular glutamate by two different mechanisms which is described as Na⁺-dependent and Na⁺-independent. Although the transport of this neurotransmitter has already been reported in other cerebral tissues (Robinson et al., 1991; Struzynska, 2009), the current work is the first one to characterize, pharmacologically, the active contribution of two distinct transport systems to the total glutamate net uptake in retina.

Our results demonstrated that both mechanisms, Na⁺-dependent and Na⁺-independent, equally contributed to glutamate uptake in the retina, highlighting the higher participation of Na⁺-independent component (48% of the total glutamate transport), which is not observed in other areas of the CNS (Robinson et al., 1991). Differing from what was observed in this work, in glial and neuronal cell cultures obtained from distinct CNS areas as cerebellum, hippocampus and cortex, the Na⁺-independent component represent less than 5% of the total glutamate uptake, while the Na⁺-dependent mechanism is responsible for the 95% left (Garlin et al., 1995; Wang et al., 1998).

The remarkable contribution of Na⁺-independent component in retinal cell cultures appeared as a novel data in the literature, since earlier studies with retinal cells in suspension showed that glutamate transport occurs, essentially, in the presence of ion Na⁺, with discreet (≈14%) or insignificant contribution of Na⁺-independent transport system (Muller et al., 1998; Rauen et al., 1998). However, in some cellular types as C6 glioma cells, Na⁺-independent component is responsible for, approximately, 55% of the total glutamate uptake (Cho and Bannai, 1990), similar of what was observed in our study with retinal cells. So, the relative contribution of Na⁺-independent component varies in different cells types, becoming more evident in those more susceptible to stress conditions, like retinal cells and gliomas.

Since Na⁺-independent mechanism seems to play a relevant role in glutamate uptake, we directed our study to the characterization of this component. Between several mechanisms of glutamate transport that has already been described in other tissues, this work suggested the involvement of system x_{CG}⁻, once it is the only Na⁺-independent system which presents affinity to glutamate (McBean, 2002; Dun et al., 2005).

Reduction of 31% on the total of glutamate transport with cysteine (500 μM), a substrate to system x_{CG}⁻, strongly suggests evidence of the presence and activity of this system in the retinal cells, indicating that in this cellular type, both glutamate and cysteine, utilize the same Na⁺-independent mechanism of transport. In agreement with our results, Dun et al. (2005) characterized the functionality of system x_{CG}⁻ in retinal ganglion cells line (RGC-5), demonstrating a total inhibition of Na⁺-independent glutamate uptake by dipeptides as cystine and amino acid as glutamate, and a partial inhibition by cysteine. Amino acids as arginine, alanine, serine, leucine, methionine, and phenylalanine did not exhibit any effect towards the Na⁺-independent glutamate uptake, indicating that the specificity of these substrates to the Na⁺-independent mechanism is according to the specificity known to system x_{CG}⁻.

Our results also suggest that the presence of system x_{CG}⁻ in retina could be associated with other cellular types than ganglionar neurons as described by Dun et al. (2005), since our retinal culture model do not present this cellular type (Finlay et al., 1996).

Based on the exposed, additional experiments were carried out to evaluate if the activity of system x_{CG}⁻ could be related to the

direct transport of cysteine instead of cystine as describes in other works. The characterization of this transporter, by the cysteine uptake assay, showed that this mechanism participate in similar ways both to the glutamate uptake (48% of the total uptake) and cysteine uptake (52% of the total uptake), indicating that both amino acids, are transported by system x_{CG}⁻, although with some different properties.

The present study demonstrated avid uptake of cysteine by two distinct mechanisms in retinal cell cultures, being the first one to characterize a large contribution of a Na⁺-independent systems for cysteine uptake in retinal cells. Nevertheless, it is generally believed that cysteine transport is accomplished, principally by two Na⁺-dependent systems, ASC and x_{AG}⁻ (Shafgat et al., 1993). Few works described the existence of Na⁺-independent transport systems responsible for cysteine uptake. Among them, Shanker et al. (2001) showed up a discreet contribution of two Na⁺-independent cysteine transport systems in cortex primary cultures: GGT system and L system, which are unable to transport the amino acid glutamate.

In the present work, we observed that the participation of Na⁺-independent component to the cysteine uptake was more highlighted in glial cell cultures than in neuronal cell cultures, suggesting the possible involvement of other cysteine Na⁺-independent transport system in the glial cells of retina. This finding could be associated to the fact that in cellular cultures, the level of GSH is higher in glia than in neurons (Kranich et al., 1996).

Indeed, in CNS cells, cysteine assumes an important functional role, being the principal amino acid responsible for the maintenance of GSH intracellular levels. Then, the active presence of a mechanism (system x_{CG}⁻) capable of transport cysteine in the glial cells of retina, appeared as an interesting finding, since the levels of GSH are, normally, maintained by the transport of cystine instead of cysteine. Interestingly, our results demonstrated, as Dun et al. (2005) that the inhibition of glutamate transport by system x_{CG}⁻ occurs only in the presence of higher concentrations of cysteine (500 μM), meanwhile lower concentrations of glutamate (20 μM) already led to a great reduction of the cysteine transport by Na⁺-independent component. Thus, these results indicate that, in retinal cells, system x_{CG}⁻ presents a lower affinity by the cysteine transport and higher affinity by glutamate transport.

Given the higher activity of system x_{CG}⁻ showed in retinal cells, we further tried to determine a physiological role for this system, beyond only amino acid transport. In this way, the results exposed until now, indicate a probably participation of system x_{CG}⁻ in the regulation of GSH content in retinal tissue. The contribution of this system to the biosynthesis of GSH was already described in microglia cells (Persson et al., 2006). So, our work is the first one to correlate the transport of cysteine by system x_{CG}⁻, contributing directly to the GSH metabolism.

When intracellular concentrations of GSH were evaluated, we observed the same content of this antioxidant both in Na⁺-dependent and Na⁺-independent systems, suggesting that, in retinal cells, the levels of GSH were not mediated by a Na⁺-dependent mechanism. In Müller cells, Reichelt et al. (1997) characterized the indirect participation of Na⁺-dependent mechanism in the synthesis of GSH, showing that glutamate used for GSH synthesis came from system x_{AG}⁻ and that, consequently, the excess of glutamate in the intracellular medium serves as a substrate to the counter-transport of glutamate-cystine by system x_{CG}⁻. However, these events do not constitute rate-limiting steps to the synthesis of GSH, as the transport of cysteine by system x_{CG}⁻.

Interestingly, we verified a reduction in the intracellular concentration of GSH when we submitted the retinal cultures to the treatment with 500 μM of cysteine, being this reduction observed in the Na⁺-independent component as well as in the Na⁺-dependent component. Based on these results, two possible

hypothesis could be presented: the first one, and more probable, that x_{CC}^- transporter is taken up cysteine supply to the system and then releasing the excess of GSH in the extracellular space; the second one is that the x_{CC}^- transporter is taken up the cysteine and releasing the glutamate in the extracellular space, reducing in this way, the amount of intracellular GSH.

Interestingly, the treatment with glutamate increases the release of GSH in the extracellular space (Frade et al., 2008), suggesting that this could be an important neuroprotective mechanism against glutamate excitotoxicity.

Earlier reports characterized the release of GSH in cortical astrocytes cultures (Yudkoff et al., 1990; Sagara et al., 1996), evidencing the participation of a carrier protein in this process (Stewart et al., 2002). Although, the mechanism responsible for GSH release in different cell types remains unknown. Recently, a wide variety of works have showed the release of GSH by different cellular types and tissue, suggesting that this compound plays an important role in the extracellular space (Ballatori et al., 2005). GSH released by astrocytes could serve as a substrate to the ectoenzyme, γ -glutamyltranspeptidase to former the dipeptide γ -GlyCys or cysteine, both used by neurons as GSH precursor (Wang and Cynader, 2000; Dringen and Hirrlinger, 2003).

Indeed, our results demonstrated that glutamatergic transporter antagonist PDC (500 μ M) reverted, partially, the cysteine effect, possibly by blocking the x_{CC}^- transporter preventing the entry of cysteine and the exit of GSH or glutamate. Then, the result suggests the involvement of system x_{CC}^- in the release of GSH in the retina.

In our experiments, we tested the first hypothesis proposed when we evaluate the levels of GSH in the extracellular space. It was observed that in the extracellular space, cysteine did not promote any reduction in the level of GSH as observed in the intracellular space. In this experiment, we observed that the use of cysteine promote a discreet arise in the extracellular concentration of GSH, evidencing that the system x_{CC}^- could coupled the cysteine transport with the release of the own GSH, characterizing a mechanism of GSH releasing in retinal cells, which by now has not been described.

Acknowledgements

We would like to thank Makaru Ltda. which provides chick embryos for our study. This work was supported by grants from CAPES and CNPq.

References

- Ahuja, P., Caffé, A.R., Ahuja, S., Ekström, P., Van Veen, T., 2005. Decreased glutathione transferase levels in rd1/rd1 mouse retina: replenishment protects photoreceptors in retinal explants. *Neuroscience* 131, 935–943.
- Allen, J.W., Shanker, G., Aschner, M., 2001. Methylmercury inhibits the *in vitro* uptake of the glutathione precursor, cystine, in astrocytes, but not in neurons. *Brain Res.* 894, 131–140.
- Amara, S.G., Fontana, A.C.K., 2002. Excitatory amino acid transporters: keeping up with glutamate. *Neurochem. Int.* 41, 313–318.
- Anderson, M., 1969. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological sample. *Methods Enzymol.* 113, 548–555.
- Baker XI, D.A., Shen, Z., Swanson, H., Kalivas, P.W.P.W., 2002. The origin and neuronal function of *in vivo* nonsynaptic glutamate. *J. Neurosci.* 22, 9134–9141.
- Balcar, V.J., 2002. Molecular pharmacology of the Na^+ -dependent transport of acidic amino acids in the mammalian central nervous system. *Biol. Pharm. Bull.* 25, 291–301.
- Ballatori, N., Hammond, C.L., Cunningham, J.B., Krance, S.M., Marchan, R., 2005. Molecular mechanisms of reduced glutathione transport: role of the MRP/CFTR/ABCC and OATP/SLC221A families of membrane proteins. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 204, 238–255.
- Beart, P.M., O'Shea, R.D., 2007. Transporters for L-glutamate: an update on their molecular pharmacology and pathological involvement. *Br. J. Pharmacol.* 150, 5–17.
- Bender, A.S., Reichelt, W., Norenberg, M.D., 2000. Characterization of cystine uptake in cultured astrocytes. *Neurochem. Int.* 37, 269–276.
- Bridges, R.J., Esslinger, C.S., 2005. The excitatory amino acid transporters: pharmacological insights on substrate and inhibitor specificity of the EAAT subtypes. *Pharmacol. Ther.* 107, 271–285.
- Bringmann, A., Pannicke, T., Biedermann, B., Francke, M., Iandiev, I., Grosche, J., Wiedemann, P., Albrecht, J., Reichenbach, A., 2009. Role of retinal glial cells in neurotransmitter uptake and metabolism. *Neurochem. Int.* 54, 143–160.
- Cho, Y., Bannai, S., 1990. Uptake of glutamate and cystine in C-6 glioma cells and in cultured astrocytes. *J. Neurochem.* 55, 2091–2097.
- Cooper, A.J., Kristal, B.S., 1997. Multiple roles of glutathione in the central nervous system. *Biol. Chem.* 378, 793–802.
- da Costa, B.L.S.A., Kang, K.D., Rittenhouse, K.D., Osborn, N.N., 2009. The localization of PGE2 receptor subtypes in rat retinal cultures and the neuroprotective effect of the EP2 agonist butaprost. *Neurochem. Int.* 55, 199–207.
- Danbolt, N.C., 2001. Glutamate uptake. *Prog. Neurobiol.* 65, 1–105.
- do Nascimento, J.L.M., Kubrusly, R.C.C., Reis, R.A.M., de Mello, M.C.F., de Mello, F.G., 1998. Atypical effect of dopamine in modulating the functional inhibition of NMDA receptors of cultured retina cells. *Eur. J. Pharmacol.* 343, 103–110.
- Dringen, R., Kranich, O., Löschnann, P., Hamprecht, B., 1997. Use of dipeptides for the synthesis of glutathione by astroglia-rich primary cultures. *J. Neurochem.* 69, 868–874.
- Dringen, R., Pfeiffer, B., Hamprecht, B., 1999. Synthesis of the anti-oxidant glutathione in neurons: supply by astrocytes of CysGly as precursor for neuronal glutathione. *J. Neurosci.* 19, 562–569.
- Dringen, R., Gutterer, J.M., Hirrlinger, J., 2000. Glutathione metabolism in brain: metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species. *Eur. J. Biochem.* 267, 4912–4916.
- Dringen, R., Hirrlinger, J., 2003. Glutathione pathways in the brain. *Biol. Chem.* 384, 505–516.
- Dun, Y., Mysona, B., Van Ells, T., Amarnath, L., Ola, M.S., Ganapathy, V., Smith, S.B., 2005. Expression of the cystine-glutamate exchanger (xc-) in retinal ganglion cells and regulation by nitric oxide and oxidative stress. *Cell Tissue Res.* 324, 189–202.
- Finlay, D., Wilkinson, G., Kypta, R., Curtis, I., Reichardt, L., 1996. Retinal cultures. *Methods Cell Biol.* 51, 265–283.
- Frade, J., Pope, S., Schmidt, M., Dringen, R., Barbosa, R., Pocock, J., Laranjinha, J., Heales, S., 2008. Glutamate induces release of glutathione from cultured rat astrocytes—a possible neuroprotective mechanism? *J. Neurochem.* 105, 1144–1152.
- Garlin, A.B., Sinor, A.D., Sinor, J.D., Jee, S.H., Grinspan, J.B., Robinson, M.B., 1995. Pharmacology of sodium-dependent high-affinity L-[3 H]glutamate transport in glial cultures. *J. Neurochem.* 64, 2572–2580.
- Gochenauer, G.E., Robinson, M.B., 2001. Dibutyryl-cAMP (dbcAMP) up-regulates astrocytic chloride-dependent L-[3 H]glutamate transport and expression of both system Xc $^-$ subunits. *J. Neurochem.* 78, 276–286.
- Hamburguer, V., Hamilton, H.L., 1951. A series of the normal estagies in the development of the chick embryo. *J. Morphol.* 88, 49–92.
- Handelman, G.J., Dratz, E.A., 1986. The role of antioxidants in the retina and retinal pigment epithelium and the nature of prooxidant-induced damage. *Adv. Free Radic. Biol. Med.* 2, 1–89.
- Hazell, A.S., 2009. Astrocytes are a major target in thiamine deficiency and Wernicke's encephalopathy. *Neurochem. Int.* 55, 129–135.
- Herculano, A.M., Crespo-López, M.E., Lima, S.M., Picanço-diniz, D.L., do Nascimento, J.L., 2006. Methylmercury intoxication activates nitric oxide synthase in chick retinal cell culture. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 39, 415–418.
- Hirrlinger, J., König, J., Keppler, D., Lindenau, J., Schulz, J.B., Dringen, R., 2001. The multidrug resistance protein MRP1 mediates the release of glutathione disulfide from rat astrocytes during oxidative stress. *J. Neurochem.* 76, 627–636.
- Ishii, T., Sato, H., Miura, K., Sagara, J.I., Bannai, S., 1992. Induction of cystine transport activity by stress. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 663, 497–498.
- Kalloniatis, M., Napper, G.A., 1996. Glutamate metabolic pathways in displaced ganglion cells of the chicken retina. *J. Comp. Neurol.* 367, 518–536.
- Kanai, Y., Hediger, M.A., 2004. The glutamate/neutral amino acid transporter family SLC1: molecular, physiological, pharmacological aspects. *Pflügers Archiv: Eur. J. Physiol.* 447, 469–479.
- Kranich, O., Hamprecht, B., Dringen, R., 1996. Different preferences in the utilization of amino acids for glutathione synthesis in cultured neurons and astroglial cells derived from rat brain. *Neurosci. Lett.* 219, 211–214.
- Langeveld, C.H., Schepens, E., Jongenelen, C.A.M., Stoof, J.C., Hjelte, O.P., Ottersen, O.P., Drukarch, B., 1996. Presence of glutathione immunoreactivity in cultured neurones and astrocytes. *Neuroreport* 7, 1833–1836.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- McBean, G.J., 2002. Cerebral cystine uptake: a tale of two transporters. *Trends Pharmacol. Sci.* 23, 299–302.
- Minich, T., Riemer, J., Schulz, J.B., Wielinga, P., Wijnholds, J., Dringen, R., 2006. The multidrug resistance protein 1 (Mrp1), but not Mrp5, mediates export of glutathione and glutathione disulfide from brain astrocytes. *J. Neurochem.* 97, 373–384.
- Muller, A., Maurin, L., Bonne, C., 1998. Free radicals and glutamate uptake in the retina. *Gen. Pharmacol.* 30, 315–318.
- O'Shea, R.D., 2002. Roles and regulation of glutamate transporters in the central nervous system. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 29, 1018–1023.
- Palacin, M., Estevez, R., Bertran, J., Zorzano, A., 1998. Molecular biology of mammalian plasma membrane amino acid transporters. *Physiol. Rev.* 78, 969–1053.
- Patel, S., Warren, B.A., Rhoderick, J.F., Bridges, R.J., 2004. Differentiation of substrate and non-substrate inhibitors of transport system x_c^- : an obligate exchanger of L-glutamate and L-cystine. *Neuropharmacology* 46, 273–284.

- Persson, M., Sandberg, M., Hansson, E., Rönnbäck, L., 2006. Microglial glutamate uptake is couple to glutathione synthesis and glutamate release. *Eur. J. Neurosci.* 24, 1063–1070.
- Piani, D., Fontana, A., 1994. Involvement of the cystine transport system Xc⁻ in the macrophage-induced glutamate-dependent cytotoxicity to neurons. *J. Immunol.* 152, 3578–3585.
- Quinlan, E.M., Philpot, B.D., Haganir, R.L., Bear, M.F., 1999. Rapid, experience-dependent expression of synaptic NMDA receptors in visual cortex in vivo. *Nat. Neurosci.* 2, 352–357.
- Rauen, T., Rothstein, J.D., Wässle, H., 1996. Differential expression of the three glutamate transporter subtypes in the rat retina. *Cell Tissue Res.* 286, 325–336.
- Rauen, T., Taylor, W.R., Kuhlbrodt, K., Wiessner, M., 1998. High-affinity glutamate transporters in the rat retina: a major role of the glial glutamate transporter GLAST-1 in transmitter clearance. *Cell Tissue Res.* 291, 19–31.
- Reichelt, W., Stabel-Burow, J., Pannicke, T., Weichert, H., Heinemann, 1997. The glutathione level of retinal Müller glial cells is dependent on the high-affinity sodium-dependent uptake of glutamate. *Neuroscience* 77, 1213–1224.
- Robinson, M.B., Hunter-Ensor, M., Sinor, J., 1991. Pharmacologically distinct sodium-dependent L-[³H]glutamate transport processes in rat brain. *Brain Res.* 544, 196–202.
- Sagara, J., Miura, K., Bannai, S., 1993. Cystine uptake and glutathione level in fetal brain cells in primary culture and in suspension. *J. Neurochem.* 61, 1667–1671.
- Sagara, J., Makino, N., Bannai, S., 1996. Glutathione efflux from cultured astrocytes. *J. Neurochem.* 66, 1876–1881.
- Shafgat, S., Tamarappoo, B.K., Kilberg, M.S., Puranam, R.S., McNamara, J.O., Guadano-Ferraz, A., Fremeau Jr., R.T., 1993. Cloning and expression of a novel Na⁺-dependent neutral amino acid transporter structurally related to mammalian Na⁺/glutamate cotransporters. *J. Biol. Chem.* 268, 15351–15355.
- Shanker, G., Allen, J.W., Mutkus, L.A., Aschner, M., 2001. The uptake of cysteine in cultured primary astrocytes and neurons. *Brain Res.* 902, 156–163.
- Sheldon, A.L., Robinson, M.B., 2007. The role of glutamate transporters in neurodegenerative diseases and potential opportunities for intervention. *Neurochem. Int.* 51, 333–355.
- Shigeri, Y., Seal, R.P., Shimamoto, K., 2004. Molecular pharmacology of glutamate transporters EAATs and VGLUTs. *Brain Res. Rev.* 45, 250–265.
- Stewart, V.C., Stone, R., Gegg, M.E., Sharp, M.A., Hurst, R.D., Clark, J.B., Heales, S.J.R., 2002. Preservation of extracellular glutathione by an astrocyte derived factor with properties comparable to extracellular superoxide dismutase. *J. Neurochem.* 83, 984–991.
- Struzynska, L., 2009. A glutamatergic component of lea toxicity in adult brain: the role of astrocytic glutamate transporters. *Neurochem. Int.* 55, 151–156.
- Suemori, S., Shimazawa, M., Kawase, K., Satoh, M., Nagase, H., Yamamoto, T., Hara, H., 2006. Metallothionein, an endogenous antioxidant, protects against retinal neuron damage in mice. *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* 47, 3975–3982.
- Tanaka, K., 2000. Functions of glutamate transporters in the brain. *Neurosci. Res.* 37, 15–19.
- Tomi, M., Funaki, T., Abukawa, H., Katayama, K., Kondo, T., Ohtsuki, S., Ueda, M., Obinata, M., Terasaki, T., Hosoya, K., 2003. Expression and regulation of L-cystine transporter, system xc⁻, in the newly developed rat retinal Müller cell line (TR-MUL). *Glia* 43, 208–217.
- Wang, G.J., Chung, H.J., Schnuer, J., Pratt, K., Zable, A.C., Kavanaugh, M.P., Rosenberg, P.A., 1998. High affinity glutamate transport in rat cortical neurons in culture. *Mol. Pharmacol.* 53, 88–96.
- Wang, X.F., Cynader, M.S., 2000. Astrocytes provide cysteine to neurons by releasing glutathione. *J. Neurochem.* 74, 1434–1442.
- Yoneyama, M., Nishiyama, N., Shuto, M., Sugiyama, C., Kawada, K., Seko, K., Nagashima, R., Ogita, K., 2008. In vivo depletion of endogenous glutathione facilitates trimethyltin-induced neuronal damage in the dentate gyrus of mice by enhancing oxidative stress. *Neurochem. Int.* 52, 761–769.
- Ye, Z., Rothstein, J.D., Sontheimer, H., 1999. Compromised glutamate transport in human glioma cells: reduction-mislocalization of sodium-dependent glutamate transporters and enhanced activity of cystine-glutamate exchange. *J. Neurosci.* 19, 10767–10777.
- Yudkoff, M., Pleasure, D., Cregar, L., Lin, Z.P., Nissim, I., Stern, J., Nissim, I., 1990. Glutathione turnover in cultured astrocytes: studies with [¹⁵N]glutamate. *J. Neurochem.* 55, 137–145.