

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica

**CARACTERIZAÇÃO DO INFLUXO DE CÁLCIO PELO RECEPTOR  
IONOTRÓPICO DE GLUTAMATO NMDAR EM LINFÓCITOS T $\alpha\beta^+$   
INTRAEPITELIAIS DA MUCOSA INTESTINAL EM MODELO MURINO**

**Rafaela Tardelli Andreoni**

Trabalho de Conclusão do Curso de Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Orientador: Prof. Dr. Jean Pierre Schatzmann  
Peron

São Paulo

2021

## AGRADECIMENTOS

Agradeço os membros do Laboratório de Interações Neuroimunes por terem me acolhido e me auxiliado durante minha passagem pelo laboratório. Sou muito grata por ter tido a oportunidade de trabalhar ao lado desse time inspirador, sempre entusiasmado e dedicado à ciência.

Agradeço, especialmente, ao Prof. Dr. Jean Pierre Schatzmann Peron pela orientação e pela oportunidade de experiência na academia e à Ma, Marília Garcia de Oliveira, por ter me acompanhado desde o primeiro dia no laboratório e por ter me proporcionado tantos momentos de aprendizado.

Agradeço aos meus pais por toda a dedicação que tiveram a mim e pelo apoio nas minhas escolhas.

Por fim, agradeço aos meus amigos por todo o suporte e incentivo, tê-los ao meu lado me fortaleceu e tornou minha vivência na universidade uma experiência muito mais agradável.

## SUMÁRIO

	Pág.
Lista de Abreviaturas .....	1
RESUMO .....	2
1. INTRODUÇÃO	4
2. OBJETIVOS	10
3. MATERIAIS E MÉTODOS	11
4. RESULTADOS	17
5. DISCUSSÃO	29
6. CONCLUSÃO	32
7. BIBLIOGRAFIA	33
8. ANEXOS	35

## LISTA DE ABREVIATURAS

CBA	<i>Cytometric Bead Array</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i> - Grupamento de Diferenciação
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CRE	<i>Causes Recombination Enzime</i> - Enzima Cre recombinase
EAE	Encefalomielite Autoimune Experimental
GALT	<i>Gut-Associated Lymphoid Tissue</i> - Tecido linfóide associado ao intestino
H&E	Coloração Hematoxilina-Eosina
IBD	<i>Inflammatory Bowel Disease</i> - Doença Inflamatória Intestinal
IEL	<i>Intraepithelial lymphocytes</i> - Linfócitos intraepiteliais
IL	Interleucina
IFN	Interferon
KGF	<i>Keratinocyte Grown Factor</i> - Fator de Crescimento de Queratinócitos
mLN	<i>Mesenteric Lymph Nodes</i> - Linfonodos mesentéricos
NFAT	<i>Nuclear factor of activated T-cells</i> - Fator Nuclear das células T ativadas
NMDA	N-metil-D-aspartato
NMDAR	Receptor de NMDA - N-metil-D-aspartato
SFB	Soro fetal bovino
TCR	<i>T Cell Receptor</i> - receptor da célula T
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i> - Fator de crescimento transformador
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i> - Fator de Necrose Tumoral

## RESUMO

**ANDREONI, R.T. CARACTERIZAÇÃO DO INFLUXO DE CÁLCIO PELO RECEPTOR IONOTRÓPICO DE GLUTAMATO NMDAR EM LINFÓCITOS T $\beta^+$  INTRAEPITELIAIS DA MUCOSA INTESTINAL EM MODELO MURINO.** 2021. no. 1054-20, P35, Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia-Bioquímica – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

**Palavras-chave:** Glutamato, NMDAR, linfócitos T intraepiteliais

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central, podendo também ser encontrado em abundância na dieta, pois se trata de um aminoácido presente na estrutura de diversas proteínas. Esse neurotransmissor pode exercer papel na ativação de linfócitos T através da ligação ao seu receptor ionotrópico NMDAR que, por ser um canal iônico, possibilita o influxo de cálcio, um importante sinalizador intracelular. O intestino possui um grande conjunto de tecidos linfoideos com funções imunes denominado GALT, onde diversos subtipos de linfócitos são encontrados na camada epitelial, sendo denominados linfócitos intraepiteliais, e também em outros compartimentos, como na lámina própria e nos linfonodos mesentéricos. É possível que os linfócitos do GALT sejam modulados pelo glutamato, pois, além do aporte desse neurotransmissor proveniente da dieta, o intestino também possui uma vasta rede neuronal denominada sistema nervoso entérico, capaz de se comunicar com as células imunes por meio da secreção desse neurotransmissor. Dessa forma, o presente estudo visa avaliar o papel do receptor ionotrópico de glutamato NMDAR em linfócitos T $\beta^+$  intraepiteliais da mucosa intestinal de camundongos. Para isso, foram avaliados animais deficientes do receptor NMDAR em células T CD4 $^+$  e CD8 $^+$  (C57BL/6 Cd4 $^{cre} \times Grin1^{flox}$ ) quanto a análise histológica do intestino delgado e análise fenotípica e funcional das células intraepiteliais por citometria de fluxo. Os resultados obtidos sugerem que a deleção do receptor NMDAR em linfócitos T $\beta^+$  é capaz reduzir a frequência de linfócitos T

CD4<sup>+</sup> e aumentar a frequência de linfócitos T CD8<sup>+</sup> nos linfonodos mesentéricos. Em contrapartida, no compartimento intraepitelial houve uma redução na frequência de linfócitos T CD8<sup>+</sup> e um aumento no número absoluto de linfócitos T CD4<sup>+</sup>. Apesar dos mecanismos que levaram a essas alterações ainda não serem totalmente compreendidos, esses resultados evidenciam a importância do receptor de glutamato NMDAR na homeostase do GALT.

## 1. INTRODUÇÃO

Há alguns anos nosso grupo vem estudando o papel do receptor ionotrópico de glutamato NMDAR em células do sistema imune utilizando o modelo murino de encefalomielite autoimune experimental (EAE), induzido pela imunização de camundongos com a glicoproteína de mielina produzida por oligodendrócitos (MOG<sub>35-55</sub>). Mais recentemente, nosso grupo também tem investigado o papel dos receptores NMDAR na maturação de linfócitos T CD4<sup>+</sup>. Para isso, são utilizados camundongos deficientes para este receptor em linfócitos Tαβ<sup>+</sup> por meio do cruzamento entre camundongos C57BL/6 *Cd4*<sup>cre</sup> com camundongos C57BL/6 *Grin1*<sup>f/f</sup>, promovendo a deleção dos receptores NMDAR especificamente em linfócitos Tαβ CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, devido à expressão do correceptor CD4 juntamente com a expressão do CD8 no estágio imaturo ou duplo positivo do desenvolvimento de linfócitos T no timo. Dando continuidade aos estudos em camundongos *Cd4*<sup>cre</sup> x *Grin1*<sup>flox</sup>, neste projeto temos o objetivo de investigar o papel do influxo de cálcio através do NMDAR em linfócitos Tαβ<sup>+</sup> intraepiteliais da mucosa intestinal. Sabidamente, o intestino é habitado por uma grande população de células imunes em toda a sua extensão, sendo que essas sofrem grande modulação pelo sistema nervoso entérico. Além disso, o glutamato também está presente na dieta e no metabolismo de bactérias. Sendo assim, pretendemos avaliar a ativação de NMDAR em linfócitos intraepiteliais do intestino e sua correlação com os mecanismos neuroimunomodulatórios presentes.

### 1.1 Glutamato e NMDAR

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central em mamíferos, sendo que esse possui papel fundamental na regulação de um grande número de condições fisiológicas e fisiopatológicas do organismo (FILPA et al., 2016). Esse neurotransmissor pertence à classe dos aminoácidos excitatórios, sendo um derivado do ácido glutâmico, e é produzido e armazenado dentro de vesículas pré-sinápticas em neurônios. Sua liberação é realizada nas fendas sinápticas de maneira Ca<sup>2+</sup> dependente (FONNUM, 1984) e a ação sobre

seus receptores gera uma indução muito rápida e potente, com efeitos importantes nas células alvo como, principalmente a despolarização da membrana (LEVITE, 2017). No intestino, o glutamato é metabolizado principalmente pelos enterócitos e funciona como a principal fonte energética para o tecido realizar suas funções, como o controle da motilidade e reflexos neuroendócrinos, além de ser precursor de outros neurotransmissores produzidos neste local. A modulação intestinal por meio do glutamato pode ser feita tanto pela secreção desse neurotransmissor por neurônios do sistema nervoso entérico quanto pela ingestão do mesmo através da dieta, já que o glutamato é um aminoácido presente na estrutura de muitas proteínas alimentares (TOMÉ, 2018).

O glutamato atua em duas principais classes de receptores: os metabotrópicos e os ionotrópicos. Nos receptores metabotrópicos (mGluRs) o glutamato atua ativando uma cascata intracelular dependente de proteína G, a qual esses receptores estão acoplados. Já nos receptores ionotrópicos (iGluRs) o glutamato tem ação na permeabilidade de canais iônicos, sendo seus principais representantes os receptores NMDAR, AMPAR e cainato (ROUSSEAU, 2008).

O receptor NMDAR, do inglês *N-methyl-D-aspartate receptor* é um receptor voltagem-dependente e está envolvido em muitos processos cognitivos, como o aprendizado e a memória. É encontrado principalmente na membrana de neurônios, sendo também muito presente em vários outros tipos celulares, como as células do sistema imune, incluindo os linfócitos T (FENNINGER; JEFFERIES, 2019). O NMDAR é um receptor hetero-tetramérico, formado por duas subunidades invariantes GluN1 e duas subunidades variáveis, que podem ser GluN2 ou GluN3, para as quais existem quatro (GluN2A-D) e três (GluN3A e GluN3B) subtipos, respectivamente (PAOLETTI; BELLONE; ZHOU, 2013). As quatro subunidades juntas compõem o canal iônico. Todas as subunidades possuem um domínio extracelular de amino terminal, um domínio de ligação, um domínio transmembrânico e um domínio intracelular de carboxila terminal (VYKLICKY et al., 2014). A ligação do glutamato ocorre na subunidade GluN2, mas para que haja ativação do NMDAR é obrigatório que ocorra simultaneamente a ligação do co-agonista, glicina ou D-serina, na subunidade GluN1. Assim que o receptor é ativado

ocorre a liberação do íon magnésio que antes bloqueava o canal iônico, permitindo o influxo de cálcio e sódio e efluxo de potássio na célula (CIOFFI, 2013).

## 1.2 Papel do cálcio na sinalização intracelular

O cálcio é um importante segundo mensageiro na determinação de várias funções das células do sistema imune. Nos linfócitos, o influxo de cálcio é crucial para a execução de funções como o metabolismo, proliferação, diferenciação e secreção de citocinas (TREBAK; KINET, 2019).

O mecanismo de regulação intracelular de cálcio nos linfócitos T se inicia através da estimulação por抗ígenos reconhecidos pelos receptores de células T (TCR), presentes na membrana dos linfócitos. Dessa forma, as altas concentrações de cálcio no citoplasma podem ativar diversas cascatas de sinalização que vão depender da amplitude, oscilação e local de entrada do  $\text{Ca}^{2+}$ . A indução de cascatas dependentes de  $\text{Ca}^{2+}$  como, por exemplo, a via da calcineurina e calmodulina, resulta na ativação de fatores de transcrição como o NFAT (do inglês *Nuclear factor of activated T-cells*), que tem papel importante na expansão clonal de linfócitos T pela transcrição da IL-2 (SRIKANTH et al., 2012).

Além disso, o NFAT, juntamente com outros fatores de transcrição  $\text{Ca}^{2+}$  dependentes, também são responsáveis pela transcrição de citocinas como IL-4, IL-10, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-17A, essenciais no contexto da indução de diferenciação e ativação de linfócitos T (VAETH; KAHLFUSS; FESKE, 2020).

A ativação de linfócitos T CD8 $^{+}$  por vias cálcio dependentes têm demonstrado papel importante na progressão de doenças inflamatórias intestinais como a IBD (do inglês *Inflammatory Bowel Disease*), de forma complementar a ação das células T CD4 $^{+}$ . Além disso, essas células também estão associadas à indução de colite de forma dependente de IL-17 (VAN WIJK; CHEROUTRE, 2012).

## 1.3 Epitélio da mucosa intestinal

O trato gastrointestinal é o maior conjunto de órgãos com funções imunes do corpo humano, possuindo uma vasta população de leucócitos residindo nos

tecidos não linfóides e tecidos linfóides. Esses leucócitos têm papel importante na defesa contra patógenos invasores, uma vez que o trato gastrointestinal é imensamente exposto a agentes patogênicos provenientes do meio externo. Histologicamente, o tecido intestinal é dividido em túnicas serosa, muscular, submucosa e mucosa, sendo que essa última reveste o lúmen. É denominada mucosa intestinal o conjunto de epitélio de revestimento, lâmina própria e camada muscular mucosa (NASCIUTTI et al., 2016, p. 289), sendo a mucosa intestinal o local do trato gastrointestinal onde são encontrados o maior número de células do sistema imune. O conjunto de tecidos do intestino que abrigam células imunes é denominado GALT, do inglês *gut-associated lymphoid tissue*, dentre eles podemos citar o epitélio intestinal, onde se encontram os linfócitos intraepiteliais ou IEL's, do inglês *intraepithelial lymphocytes*, a lâmina própria e as estruturas linfóides secundárias, como as placas de Peyer e os linfonodos mesentéricos (KABAT; POTT; MALOY, 2016).

Os linfócitos intraepiteliais se encontram entre os enterócitos do epitélio intestinal e são considerados uma das mais abundantes populações de células T do organismo. Devido ao seu fenótipo e propriedades únicas, são capazes de manter a integridade da barreira epitelial e homeostase imunológica, representando uma importante defesa contra patógenos no intestino, já que se encontram na interface de separação entre o meio externo (lúmen) e o meio interno, onde são encontradas as outras camadas intestinais (VAN KAER; OLIVARES-VILLAGÓMEZ, 2018).

Os IEL's podem ser divididos em dois grandes grupos de acordo com seu desenvolvimento e maturação, podendo ser convencionais (ou do tipo A), expressando TCR $\alpha\beta$  como receptor, juntamente com os correceptores CD4 ou CD8 $\alpha\beta$ , e não convencionais (ou do tipo B), expressando TCR $\alpha\beta$  ou TCR $\gamma\delta$  como receptor e hemodímeros de CD8 $\alpha\alpha$  (MA; TAO; ZHU, 2019). Ao contrário dos linfócitos T convencionais, que sofrem a maturação clássica, em que passam por seleção positiva no timo, algumas células progenitoras duplo negativas podem expressar TCR $\alpha\beta$  ou TCR $\gamma\delta$  mesmo na ausência de seleção positiva, expressando,

majoritariamente, hemodímeros de CD8 $\alpha\alpha$  ao invés dos correceptores convencionais. (GUY-GRAND; VASSALLI, 2002)

A maior parte dos linfócitos T intraepiteliais do intestino delgado possui fenótipo CD8 $^{+}$ , sendo que as células TCR $\alpha\beta^{+}$  CD8 $\alpha\beta^{+}$  são suas progenitoras. Esses linfócitos T CD8 $^{+}$  podem ter papel de linfócitos T de memória e atuam tanto na imunidade inata quanto de forma antígeno-específica. Eles estão envolvidos na prevenção e combate a vários patógenos, como por exemplo a infecção por *E. cuniculi* e secretam, principalmente IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ . Além disso, essas células também possuem ações citolíticas, causando morte celular via granzimas ou por meio de Fas-FasL (SHERIDAN; LEFRANÇOIS, 2010).

Os linfócitos T CD8 $^{+}$  não convencionais também são abundantes e de grande importância no epitélio intestinal. As células CD8 $\alpha\alpha^{+}$ , assim como as convencionais CD8 $\alpha\beta^{+}$ , possuem ações citolíticas por meio de granzimas e FasL, mas também possuem outras funções importantes, como a estimulação da proliferação de células epiteliais pela secreção de KGF (nas TCR $\gamma\delta^{+}$ ) e ações reguladoras, como a secreção de IL-10 e TGF- $\beta$ , que gera supressão de células T CD4 $^{+}$  efetoras, além de auxiliarem nas trocas das classes de anticorpos. (QIU et al., 2015).

Logo, percebe-se a complexidade das populações celulares do sistema imune presentes no epitélio intestinal. A compreensão da biologia destas populações celulares, de suas interações com fatores ambientais, como microbiota e dieta, assim como com fatores patogênicos, é, portanto, importante para entender amplamente seu papel no contexto neuroimunomodulatório.

#### **1.4 Linfonodos mesentéricos**

Como já mencionado anteriormente, os linfonodos mesentéricos fazem parte do GALT e desempenham funções importantes na apresentação de抗ígenos presentes no intestino para linfócitos T. Os mLN são encontrados nas dobras do mesentério ao longo da camada de tecido adiposo que envolve esse órgão (LUCEY; STUHLFAUT; SOTO, 2005).

Os linfonodos mesentéricos são responsáveis pela drenagem do líquido intersticial dos intestinos delgado e grosso e representam uma barreira de proteção contra抗ígenos que entram em contato com o organismo por meio da mucosa intestinal (EROFEEVA; MNIKHOVICH, 2020). Justamente por conta dessas características, os mLN apresentam papel crucial no contexto das colites (ou IBD), pois o tecido linfático é afetado durante episódios de inflamação intestinal, levando ao acúmulo de fluido intersticial, responsável pelos episódios de linfadenopatia mesentérica e edema, característicos desse conjunto de doenças (SAHIN et al., 2018).

Sabe-se também que os linfonodos mesentéricos compõem o compartimento intestinal que abriga a maior quantidade de linfócitos T naïve e funcionam como local apropriado para interações intercelulares, já que também são locais de residência de inúmeras células dendríticas, células especializadas em apresentação de抗ígenos (CHAPUY; SARFATI, 2020). Dessa forma, eles são tecidos capazes construir respostas imunológicas adequadas de ativação celular a partir de informações importantes de caráter imunológico (PABST et al., 2009).

Além disso, os mLN também proporcionam um microambiente ótimo para o desenvolvimento de linfócitos T regulatórios (Tregs) Foxp3<sup>+</sup>, muito importantes nos contextos da auto-tolerância e da atenuação de respostas pró-inflamatórias agudas. (PEZOLDT et al., 2018)

Portanto, no contexto intestinal, a presença de linfonodos proporcionando esse ambiente de modulação de respostas de ativação de linfócitos T e B (VON ANDRIAN; MEMPEL, 2003) e de manutenção da tolerância é de grande importância, considerando que o intestino é um órgão de interface com o meio externo, estando constantemente exposto a organismos patogênicos.

Sendo assim, no presente projeto investigamos o papel do receptor de glutamato ionotrópico NMDAR na celularidade e ativação de linfócitos intraepiteliais e dos linfonodos mesentéricos no intuito de compreender sua relevância neste compartimento celular.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar o papel do receptor ionotrópico de glutamato NMDAR em linfócitos Tαβ CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> intraepiteliais da mucosa intestinal e de linfonodos mesentéricos de camundongos.

### 2.2 Objetivos Específicos

1. Caracterizar histologicamente a morfologia do intestino delgado de camundongos C5Bl/6 *Grin1<sup>f/f</sup>* e *Cd4<sup>cre</sup>xGrin1<sup>flox</sup>*;
2. Analisar a frequência e número absoluto de linfócitos Tαβ (T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>), linfócitos Tγδ, células dendríticas e macrófagos intraepiteliais da mucosa do intestino delgado de camundongos C5Bl/6 *Grin1<sup>f/f</sup>* e *Cd4<sup>cre</sup>xGrin1<sup>flox</sup>*;
3. Analisar a frequência e número absoluto de linfócitos Tαβ (T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>), linfócitos Tγδ, células dendríticas e macrófagos de linfonodos mesentéricos de camundongos C5Bl/6 *Grin1<sup>f/f</sup>* e *Cd4<sup>cre</sup>xGrin1<sup>flox</sup>*;
4. Quantificar a produção intracelular das citocinas IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IFN-γ, TNF-α, IL-17 e IL-10 por linfócitos Tαβ (T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>), linfócitos Tγδ, células dendríticas e macrófagos intraepiteliais da mucosa do intestino delgado de camundongos C5Bl/6 *Grin1<sup>f/f</sup>* e *Cd4<sup>cre</sup>xGrin1<sup>flox</sup>*;
5. Quantificar a produção intracelular das citocinas IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IFN-γ, TNF-α, IL-17 e IL-10 por linfócitos Tαβ (T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>), linfócitos Tγδ, células dendríticas e macrófagos de linfonodos mesentéricos de camundongos C5Bl/6 *Grin1<sup>f/f</sup>* e *Cd4<sup>cre</sup>xGrin1<sup>flox</sup>*;
6. Caracterizar o influxo de cálcio pelo receptor NMDAR em células totais e linfócitos T de baço de camundongos C5Bl/6 *Grin1<sup>f/f</sup>* e *Cd4<sup>cre</sup>xGrin1<sup>flox</sup>*.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Animais**

Foram utilizados camundongos C57BL/6 deficientes do receptor ionotrópico glutamatérgico NMDAR ( $Cd4^{cre} \times Grin1^{fl/fl}$ ) em linfócitos T CD4 $^{+}$  e CD8 $^{+}$  e seus respectivos controles ( $Grin1^{f/f}$ ) com idade entre 6-8 semanas e de ambos os sexos, originários do Biotério do Departamento de Imunologia da Universidade de São Paulo. Todos os experimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), nº de protocolo 1287040618.

#### **3.2 Obtenção das células do baço**

Os animais foram eutanasiados por excesso de anestésico xilazina e cetamina seguido de deslocamento cervical e o baço foi coletado e depositado em peneiras de 70  $\mu\text{m}$  (Cell Strainer) para posterior maceração com êmbolo de seringa de 1 mL em meio RPMI1640 (LGC Biotecnologia). As células em suspensão foram centrifugadas a 500 g por 5 minutos, a 4 °C e o sobrenadante foi descartado. O pellet foi ressuspensionado em 1 mL de tampão de lise celular e aguardamos um minuto para lise das hemácias. Em seguida, foi adicionado 9 mL de PBS 1x e o tubo foi novamente centrifugado a 500 g por 5 minutos, a 4 °C e o sobrenadante foi descartado. O pellet foi ressuspensionado em 1 mL de meio RPMI completo (1% L-glutamina, 1% aminoácidos não-essenciais, 1% penicilina/streptomicina, 1% piruvato de sódio, 1% MEM-vitamina e 10% de soro bovino fetal) para a contagem celular.

#### **3.3 Obtenção das células de linfonodos mesentéricos**

Os animais foram eutanasiados por excesso de anestésico xilazina e cetamina seguido de deslocamento cervical e os linfonodos mesentéricos foram coletados e depositados em peneiras de 70  $\mu\text{m}$  dentro de placas de Petri para maceração com êmbolo de seringa de 1 mL em meio RPMI. As células em

suspensão foram centrifugadas a 500 g por 5 minutos, a 4 °C e o sobrenadante foi descartado. O pellet foi ressuspensionado em 1 mL de meio RPMI completo para a contagem de células viáveis coradas com 0,5% de azul de tripan em câmara de neubauer. Posteriormente, as células foram ou armazenadas em TRIzol ® (Invitrogen, EUA) para posterior análise por PCR em tempo real ou submetidas ao protocolo de marcação extracelular para determinar a frequência e fenótipo das células de interesse por citometria de fluxo.

### **3.4 Obtenção das células intraepiteliais do intestino delgado**

Após a eutanásia dos animais e coleta dos linfonodos mesentéricos, foi coletado o intestino delgado, o qual foi depositado sobre uma placa de Petri contendo 10 mL de 15 meio RPMI com 3% de SFB gelado e sobre uma superfície com gelo. Realizamos a limpeza do tecido, removendo todo o tecido conjuntivo e a gordura do mesentério. Removemos todas as placas de Peyer encontradas em todo o comprimento do intestino delgado e, posteriormente, foi realizado o corte longitudinal do tecido. Com o intestino delgado aberto, as fezes foram removidas através da agitação deste sobre a placa de Petri e depois foi realizada uma lavagem do tecido já aberto em uma nova placa de Petri, sobre gelo, contendo PBS 1x também gelado, para a remoção de todas as fezes. O tecido aberto foi cortado em pedaços de 1,5 a 2 cm e adicionado a um tubo côncico de 50 mL contendo 20 mL de meio RPMI com 3% de SFB e adicionalmente 5 mM de EDTA e 0.145 mg/mL de DTT (DL-Dithiotreitol). O recipiente foi incubado em um agitador aquecido à 37°C contendo 5% de CO<sub>2</sub> por 20 minutos. Após a agitação do intestino delgado ocorre a separação das células da camada intraepitelial. O conteúdo foi despejado em uma peneira de cozinha apoiada em um bêquer de 500 mL mantido em gelo. O processo é repetido 3 vezes voltando os pedaços de intestino delgado para um tubo contendo 10 mL de RPMI com 2 mM de EDTA que foi agitado vigorosamente e despejado novamente na peneira. A suspensão celular contida no bêquer foi filtrada através de uma *cell strainer* de 70 µM em um tubo de 50 mL sobre gelo e foi então centrifugada por 8 min a 1500 rpm, 4°C, o sobrenadante foi descartado. O pellet foi ressuspensionado em 20 mL de RPMI + 3% SFB e passado por uma *cell strainer* de

40 µM, a suspensão foi novamente centrifugada por 8 min a 1500 rpm, 4°C. O pellet foi ressuspensionado em 4 mL de gradiente de Percoll a 37,5% e os tubos foram centrifugados a temperatura ambiente por 20 min a 1700 rpm. Com uma pipeta Pasteur foi removido o sobrenadante e o pellet foi ressuspensionado em 0,5 mL de RPMI + 3% SFB e transferido para um novo tubo de 15 mL. As células foram lavadas em 10 mL de RPMI + 3% SFB, centrifugadas novamente por 8 min a 1350 rpm, 4°C, o sobrenadante foi descartado e as células intraepiteliais, por fim, ressuspensionadas em 1 mL de RPMI + 10% SFB.

### **3.5 Marcação extracelular para avaliação do fenótipo celular**

Um  $\times 10^6$  de células derivadas dos linfonodos mesentéricos ou dos compartimentos intraepitelial do intestino delgado foram incubadas com os anticorpos extracelulares anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8α, anti-CD11c, anti-CD45, anti-F4/80 e anti-TCRγδ por 30 minutos a 4 °C. As células foram lavadas e o sobrenadante descartado.

### **3.6 Cultura celular para avaliação da secreção de citocinas**

Um  $\times 10^6$  de células intraepiteliais do intestino delgado e linfonodos mesentéricos foram estimuladas ou não in vitro com 50 ng/mL de PMA e 1 µg/mL de Ionomicina e cultivadas em placa de 96 well fundo U por 4 horas em estufa a 37°C contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Após este período, a placa foi centrifugada a 450 g por 8 minutos, 4 °C e o sobrenadante coletado e armazenado em freezer -80 °C para posterior análise da secreção de citocinas por CBA.

### **3.7 Dosagem da secreção de citocinas por Cytometric Bead Array (CBA)**

O sobrenadante das células estimuladas, já coletado e armazenado a -80 °C, foi utilizado para a dosagem de citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IFN-γ, TNF-α, IL-17 e IL-10 com o kit CBA Mouse Th1/Th2/Th17 (BD Biosciences). O kit possui os reagentes necessários para o preparo da curva (cytokines standards) e das amostras (beads de captura e detector PE).

O protocolo foi realizado de acordo com o datasheet disponibilizado no link a seguir: [https://www.bdbiosciences.com/documents/CBA\\_MouseTh1Th2Th17\\_Kit\\_Manual.pdf](https://www.bdbiosciences.com/documents/CBA_MouseTh1Th2Th17_Kit_Manual.pdf). A leitura foi realizada no citômetro de fluxo Accuri (BD Biosciences) e a análise realizada utilizando o software FCAP Array.

### **3.8 Avaliação do influxo de cálcio em células do baço**

As suspensões de células totais do baço, preparadas conforme descrito no item 3.2, foram plaqueadas na contagem de 125.000 células por poço em uma placa de 96 poços e foram centrifugadas a 1000 rpm por 3 minutos. Os sobrenadantes foram descartados e os pellets ressuspensos com 50 µL do buffer (Fluo-4 Direct + HBSS + HEPES 1%) e logo em seguida a placa foi incubada a 37°C a 5% de CO<sub>2</sub> por 1h. Após a incubação, foram adicionados 50 µL de solução de Fluo-4 Direct (Thermo Fischer) com Probenecida diretamente nos poços contendo as células e a placa foi incubada por mais 30 min a 37°C e 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente, as células foram lavadas e foi utilizado o protocolo de marcação extracelular para citometria de fluxo utilizando os anticorpos anti-CD3, conforme descrito no item 3.5. Em seguida, as amostras foram analisadas em citômetro de fluxo através da excitação em 494 nm e emissão em 516 nm (FITC), onde é possível determinar o cálcio intracelular. Foram utilizados os seguintes estímulos durante a aquisição e após 1 minuto de leitura: Ionomicina (10 µg/mL) – controle positivo, NMDA (300 µM), NMDA (300 µM) + MK801 (200 µM) ou NMDA (300 µM) em células incubadas ou não com MK801 (200 µM) previamente por 20 min. As amostras continuaram sendo adquiridas por mais 9 minutos após estimulação. A aquisição foi realizada no citômetro de fluxo Accuri (BD Biosciences) e a análise dos dados foi realizada utilizando o software FlowJo 10.

### 3.9 Histologia

Para caracterização histológica, o intestino delgado foi coletado e segmentado em duodeno, jejuno e íleo. Após a lavagem das fezes, descrito em detalhes no item 3.3, primeiramente foi realizada a fixação de cada segmento com Paraformol a 4% *overnight* em temperatura ambiente. Após isso, os segmentos foram lavados com PBS e foi utilizada a técnica de *Swiss roll* para preparar as amostras. Esta técnica consiste em enrolar os segmentos do intestino delgado, separadamente com o auxílio de uma pinça até obtermos um número significativo de camadas (em torno de 6 camadas por segmento). Após isso, as amostras foram desidratadas utilizando 5 mL de Sacarose 15% nas primeiras 24h a 4°C e, posteriormente, 5 mL de Sacarose 30% por até 48h a 4°C A seguir, as amostras foram adicionadas ao meio Tissue-Tek O.C.T. (Sakura) e congeladas com auxílio de gelo seco. As preparações foram seccionadas em micrótomo automático em cortes de 5 µm e depois foram coradas pelo método de coloração H&E. Para imunofluorescência, o tecido foi seccionado em cortes de 18 µm.

#### 3.9.1 Coloração H&E

As amostras preparadas como descrito acima foram seccionadas em cortes de 5 µm de espessura em micrótomo automático e posicionadas sobre uma lâmina polarizada. Posteriormente, foi realizado a coloração desta lâmina com hematoxilina e eosina (H&E), segundo (FISCHER et al., 2008) A análise dos segmentos se deu através do microscópio invertido EVOS (Thermo Scientific).

#### 3.9.2 Imunofluorescência

Para identificação das células interesse, as amostras, preparadas conforme descrito no item 3.9, foram seccionadas em cortes de 18 µm de espessura em micrótomo automático e posicionadas sobre uma lâmina polarizada. Esta lâmina contendo os cortes de segmentos do intestino delgado foi permeabilizada e bloqueada com a solução de BSA a 5% e Triton-X a 0,5% por 30 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados os anticorpos anti-CD3

(PerCP) e anti-CD103 (FITC) sobre a lâmina e esta foi incubada no escuro por 1 hora a temperatura ambiente. Após a incubação, foi adicionada uma gota do meio Vectashield com DAPI, para a coloração do núcleo das células, e adicionado uma lamínula por cima. A lâmina foi incubada por mais 10 minutos e, em seguida, observada no microscópio de fluorescência ZOE (Biorad).

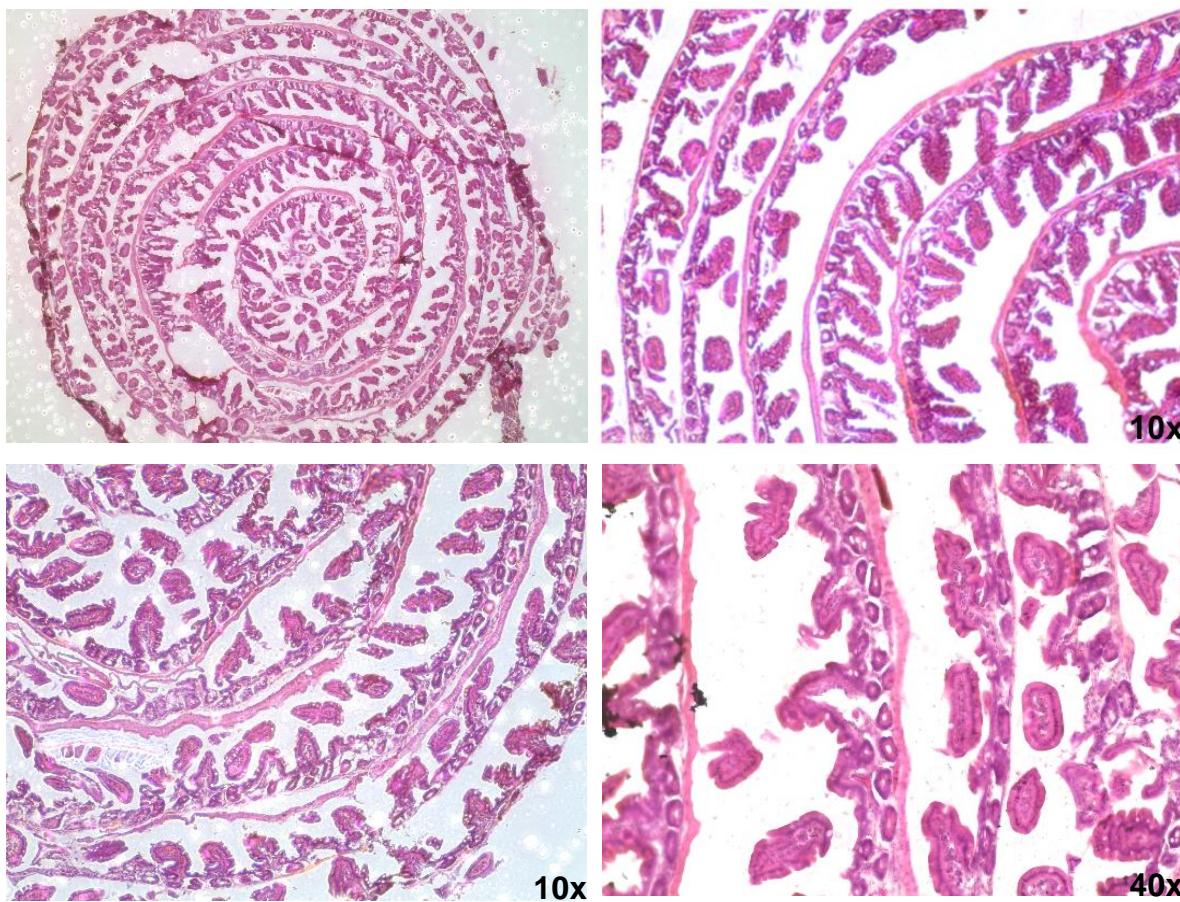
### **3.10 Análise Estatística**

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software computacional *GraphPad Prism* (GraphPad Software Incorporation) versão 6.0. O método utilizado foi o teste t de Student e a significância entre os grupos foi estatisticamente considerada quando  $P \leq 0,05$ .

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Histologia

Como é possível observar nas imagens da **Figura 1**, iniciamos nossos estudos pela padronização da análise histológica do jejuno corado por H&E, preparado pela técnica do *Swiss Roll*. O tecido permaneceu estruturado durante a coloração, sendo possível observar as células epiteliais e estruturas como as vilosidades e criptas, além da musculatura lisa da mucosa intestinal. Todavia, não foi possível medir as vilosidades e criptas. Nota-se que em algumas regiões em que deveria estar presente a lâmina própria, são encontradas lacunas, isso pode ter ocorrido devido a fragilidade dessa camada, que pode ter se perdido durante a técnica de coloração. O resultado da coloração foi satisfatório, porém é possível perceber um excesso de eosina, o que dificulta a observação dos núcleos celulares. Apesar disso, não observamos alterações grosseiras na estrutura do tecido dos animais *Grin1<sup>f/f</sup>*.



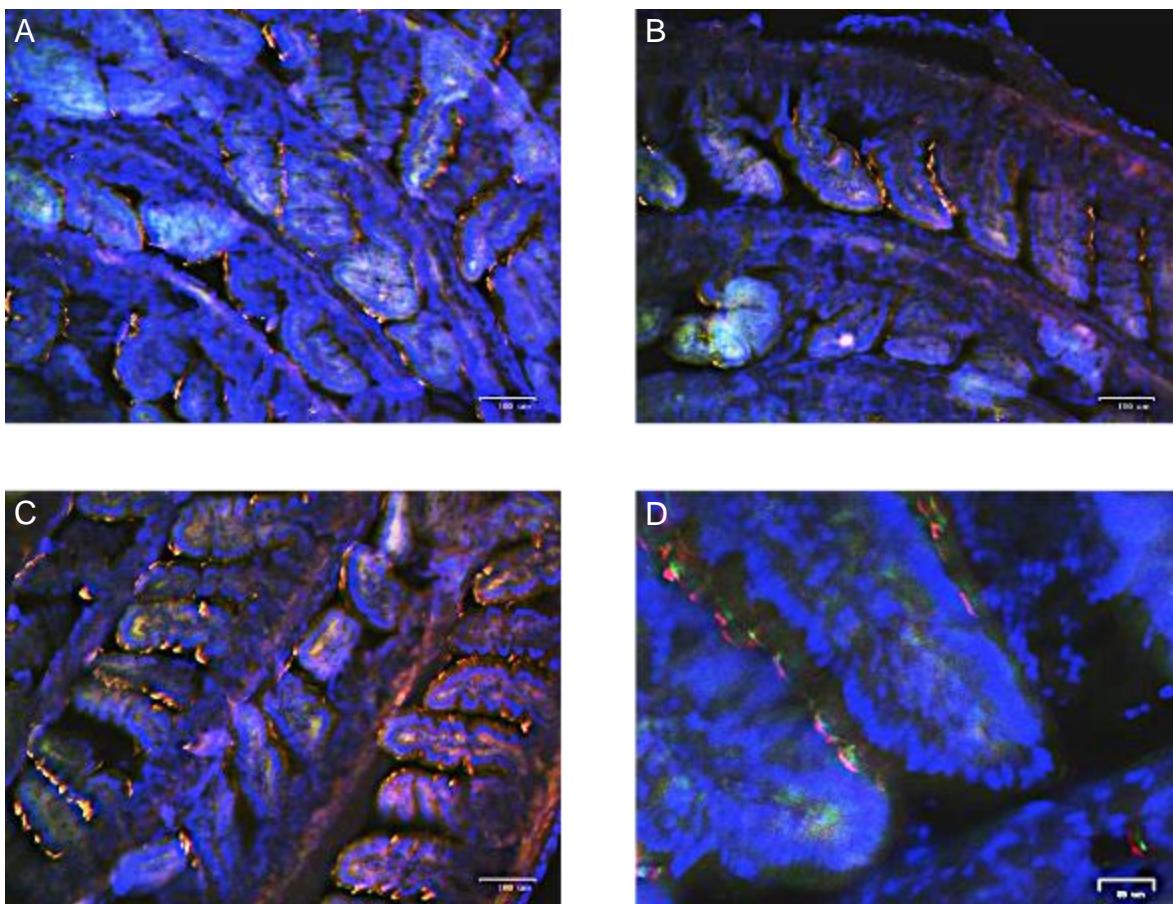
**Figura 1. Coloração H&E do segmento jejuno de camundongo *Grin1<sup>fl/fl</sup>*.** Tecido de jejuno coletado de camundongo *Grin1<sup>fl/fl</sup>* com 8 semanas, fixado *overnight* com PFA 4% e enrolado pela técnica de Swiss Roll. A preparação foi mergulhada em solução de sacarose 15% nas primeiras 24h a 4°C e, posteriormente, em solução de sacarose 30% por até 48h a 4°C. Em seguida a amostra foi congelada a -80°C com Tissue Tek O.C.T e seccionada transversalmente pelo micrótomo em espessura de 5 µm. As lâminas com os cortes foram coradas com hematoxilina e eosina e as imagens foram obtidas por microscopia de campo claro EVOS (Thermo Scientific).

#### 4.1.2 Imunofluorescência

Nas **Figuras 2A, 2B e 2C** podemos observar o resultado da imunofluorescência em diferentes quadrantes na amostra de duodeno de camundongos *Grin1<sup>fl/fl</sup>*. Na **Figura 2D** está representado um trecho das vilosidades intestinais em maior aumento. Analisando a **Figura 2** podemos observar a localização dos linfócitos T na camada epitelial ao longo das vilosidades intestinais

evidenciada pela marcação com anti-CD3. A marcação para células dendríticas com anti-CD103 não foi totalmente bem-sucedida, porém é possível observar algumas células presentes também nas vilosidades intestinais.

Os núcleos celulares, marcados com DAPI, podem ser observados por toda a extensão do tecido intestinal, evidenciados na imagem de maior aumento (**Fig. 2D**).



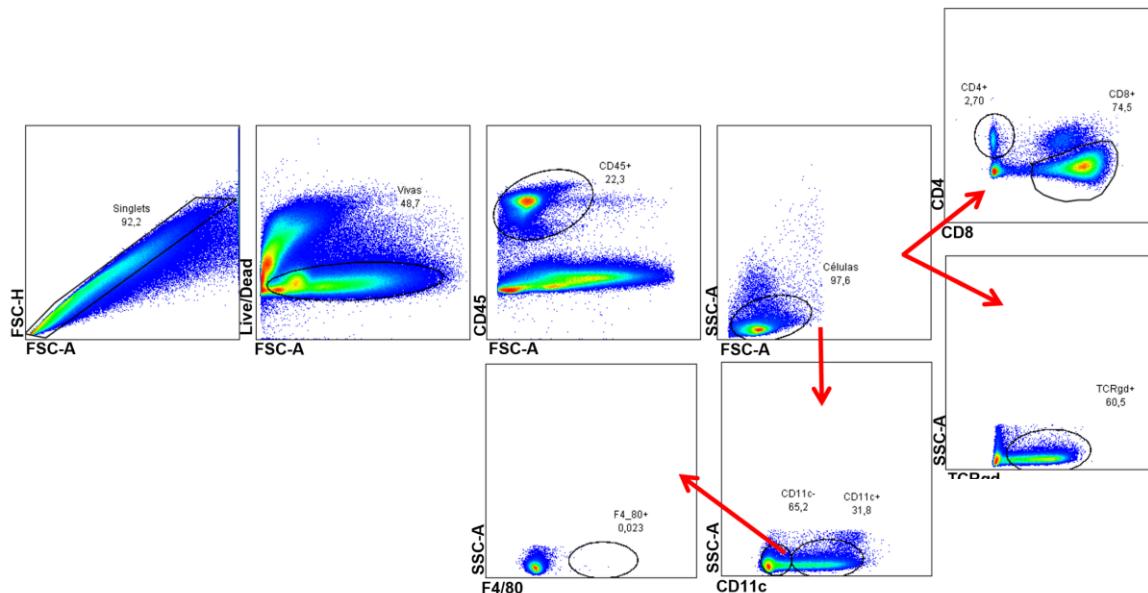
**Figura 2. Células dendríticas e linfócitos T presente no duodeno de camundongo *Grin1<sup>fl/fl</sup>*.**  
 Tecido de duodeno coletado de camundongo *Grin1<sup>fl/fl</sup>* com 8 semanas, fixado *overnight* com PFA 4% e enrolado pela técnica de *Swiss Roll*. A preparação foi mergulhada em solução de sacarose 15% nas primeiras 24h a 4°C e, posteriormente, em solução de sacarose 30% por até 48h a 4°C. Em seguida a amostra foi congelada a -80°C com Tissue Tek O.C.T e cortada transversalmente pelo micrótomo em espessura de 18 µm. As lâminas com os cortes foram permeabilizadas, bloqueadas e marcadas com anticorpos anti-CD3 (PerCP Cy5.5) e anti-CD103 (FITC) e vedadas com DAPI (VectaShield). As imagens foram obtidas pelo microscópio de fluorescência ZOE (Biorad).

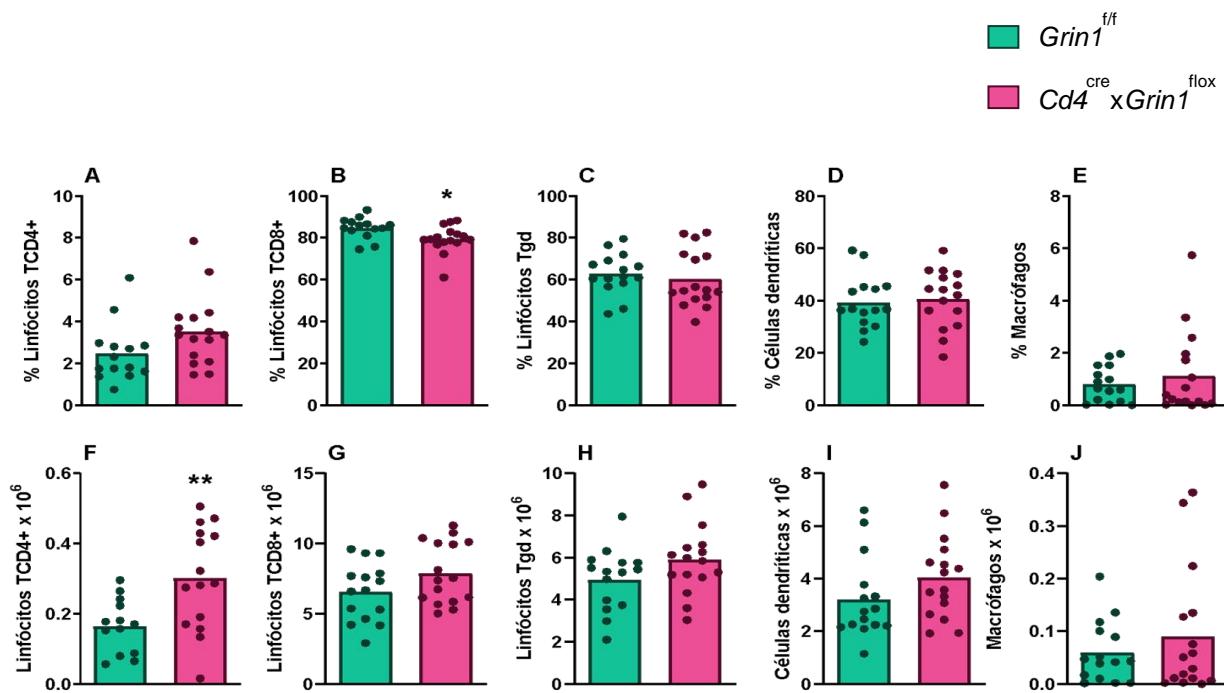
#### 4.2 Frequência e número absoluto de células imunes inatas e adaptativas intraepiteliais do intestino delgado

Posteriormente, decidimos avaliar a possível alteração na frequência de células imunes nos animais deficientes para NMDAR em linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> em comparação ao controle. Para tanto, na **Figura 3** está representada a estratégia de gates utilizando os seguintes marcadores: CD45 (marcador de leucócitos), CD4 e CD8 (marcadores das subpopulações de linfócitos T $\alpha\beta$ ), TCR $\gamma\delta$  (receptor de linfócitos T $\gamma\delta$ ), CD11c (marcador de células dendríticas) e F4/80 (marcador de macrófagos).

É possível observar que o percentual de células T CD4<sup>+</sup> intraepiteliais nos camundongos *CD4<sup>cre</sup>Grin1<sup>flox</sup>* mostrou uma tendência a estar aumentado quando em comparação com o grupo controle *Grin1<sup>ff</sup>* (**Fig. 3A**) enquanto o número absoluto se encontra aumentado (**Fig. 3F**).

Já em relação às células T CD8<sup>+</sup> intraepiteliais, o percentual de células encontra-se reduzido no grupo experimental em comparação ao grupo controle (**Fig. 3B**), sem comprometer seu número absoluto (**Fig. 3G**). Não foram observadas diferenças no percentual e número absoluto de linfócitos T $\gamma\delta$  (**Fig. 3C**), células dendríticas (**Fig. 3D**) e macrófagos (**Fig. 3E**) entre os grupos.

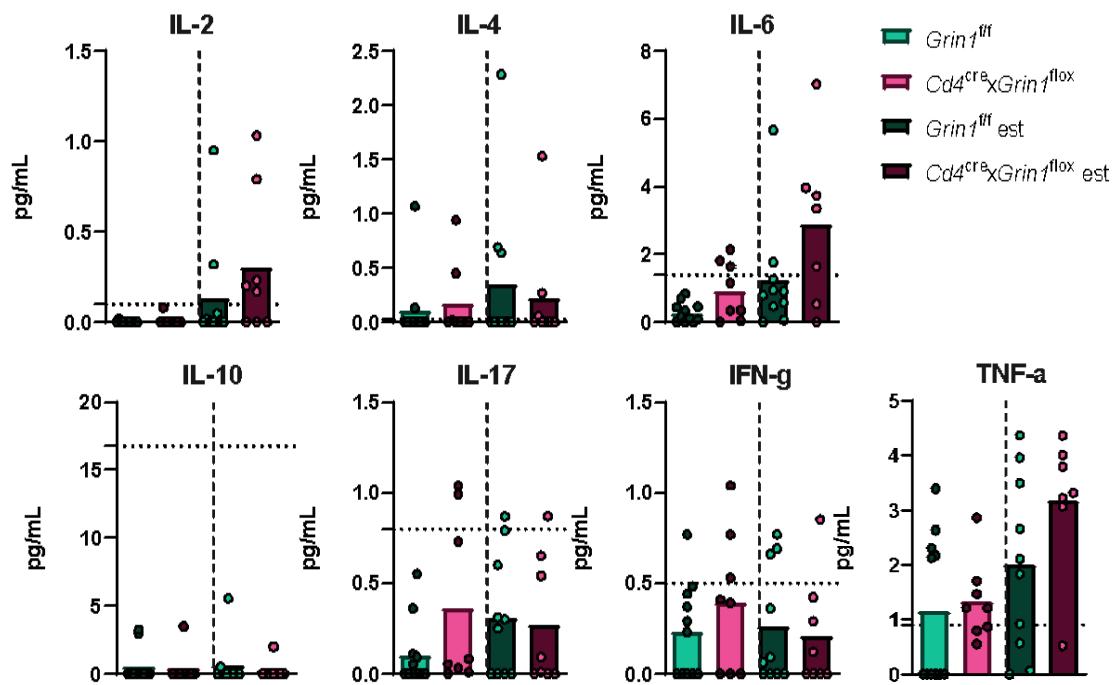




**Figura 3. Caracterização da frequência de células imunes intraepiteliais do intestino delgado de camundongos  $CD4^{cre} \times Grin1^{flox}$ .** Células isoladas do epitélio da mucosa intestinal de camundongos  $Grin1^{f/f}$  e  $CD4^{cre} Grin1^{flox}$  com 8 semanas de idade. *Dots plots* ilustrativos da estratégia de gates utilizada. As células foram marcadas com CD45, CD4, CD8, TCR $\gamma\delta$ , CD11c e F4/80 para avaliar a frequência de linfócitos T $\alpha\beta$  CD4 $^{+}$  (A e F) e CD8 $^{+}$  (B e G), linfócitos T $\gamma\delta$  (C e H), células dendríticas (D e I) e macrófagos (E e J) por citometria de fluxo (BD LSРFortessa). Foram utilizados n=15 camundongos  $Grin1^{f/f}$  e n=16  $CD4^{cre} \times Grin1^{flox}$ , provenientes de três experimentos diferentes.

#### 4.3 Secreção de citocinas por células imunes inatas e adaptativas intraepiteliais do intestino

No intuito de detectarmos alterações funcionais com a deleção do receptor NMDAR nos linfócitos T, observamos na **Figura 4**, que após o estímulo foram capturadas todas as citocinas avaliadas provenientes de células intraepiteliais para ambos os grupos. Todavia, não foi possível notar diferença significativa no perfil de secreção dessas citocinas entre o grupo experimental e controle.



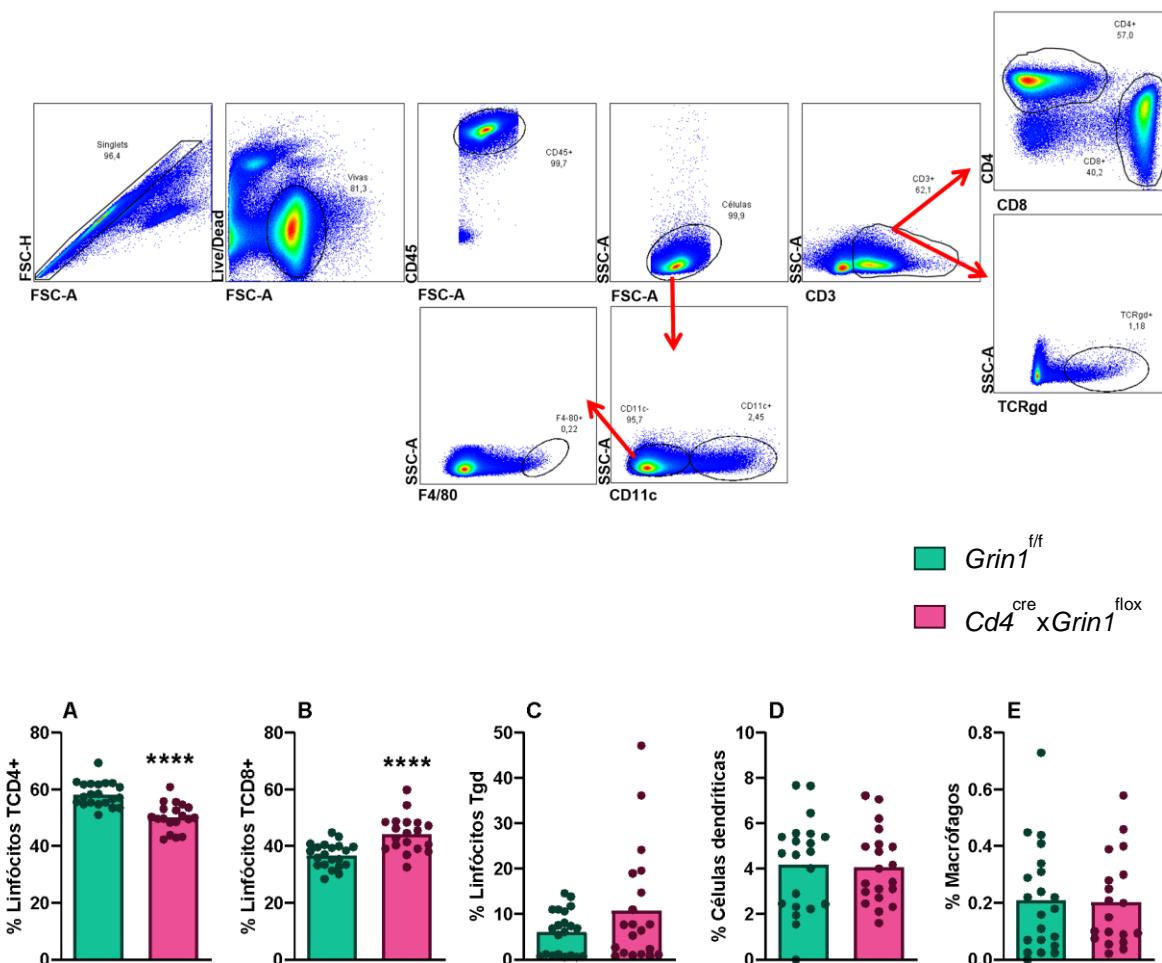
**Figura 4. Caracterização do perfil de secreção de citocinas pelas células imunes intraepiteliais de camundongos *CD4<sup>cre</sup>xGrin1<sup>fflox</sup>*.** Células isoladas do epitélio da mucosa intestinal de camundongos *Grin1<sup>ff</sup>* e *CD4<sup>cre</sup>xGrin1<sup>fflox</sup>* com 8 semanas de idade. As células foram estimuladas ou não com 50 ng/mL de PMA e 1 µg/mL de Ionomicina por 4 horas a 37 °C. Foram dosadas as citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IFN-γ e TNF-α do sobrenadante das culturas pelo ensaio de CBA por citometria de fluxo. Foram utilizados n=11 camundongos *Grin1<sup>ff</sup>* e n=9 camundongos *Cd4<sup>cre</sup>xGrin1<sup>fflox</sup>*, provenientes de dois experimentos independentes.

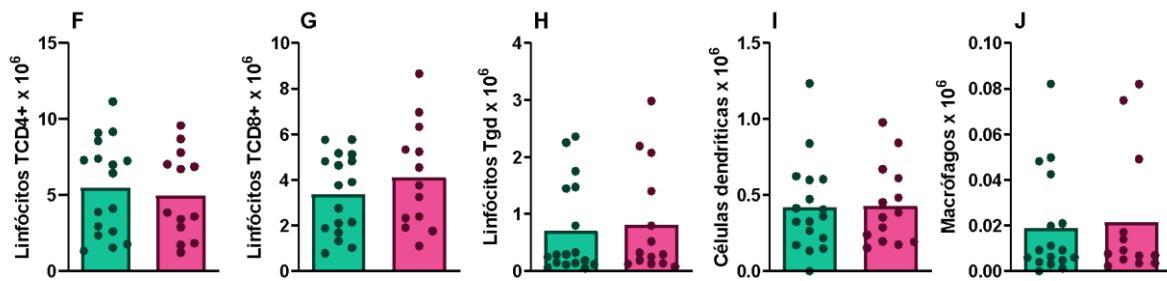
#### 4.4 Frequência e número absoluto de células imunes inatas e adaptativas nos linfonodos mesentéricos

Devido à algumas problemáticas que encontramos durante a execução desse trabalho, tanto experimentais e técnicas, como devido a pandemia de COVID-19, impedindo que fossem cumpridos todos os objetivos pretendidos, uma abordagem que adotamos para complementá-lo foi analisar também os linfonodos mesentéricos desses camundongos, já que são tecidos que podem facilmente ser coletados e processados juntamente ao protocolo de coleta de intestino delgado e suas células apresentam boa viabilidade.

Na **Figura 5A** está representada a estratégia de gates utilizando os seguintes marcadores: CD45 (marcador de leucócitos), CD4 e CD8 (marcadores das subpopulações de linfócitos T $\alpha\beta$ ), TCR $\gamma\delta$  (marcador de linfócitos T $\gamma\delta$ ), CD11c (marcador de células dendríticas) e F4/80 (marcador de macrófagos).

Foi possível observar que o percentual de linfócitos T CD4 $^{+}$  encontra-se reduzido nos linfonodos mesentéricos de camundongos *Cd4<sup>cre</sup> x Grin1<sup>flox</sup>* quando comparados ao grupo controle *Grin1<sup>f/f</sup>* (**Fig. 5A**). Já o percentual de linfócitos T CD8 $^{+}$  encontra-se aumentado no grupo experimental (**Fig. 5B**). Não foram observadas diferenças no percentual de linfócitos T $\gamma\delta$  (**Fig 5C**), células dendríticas (**Fig. 5D**) e macrófagos (**Fig. 5E**) entre os grupos. Também não foram encontradas diferenças significativas no número absoluto em nenhuma das populações celulares avaliadas de linfonodos mesentéricos.

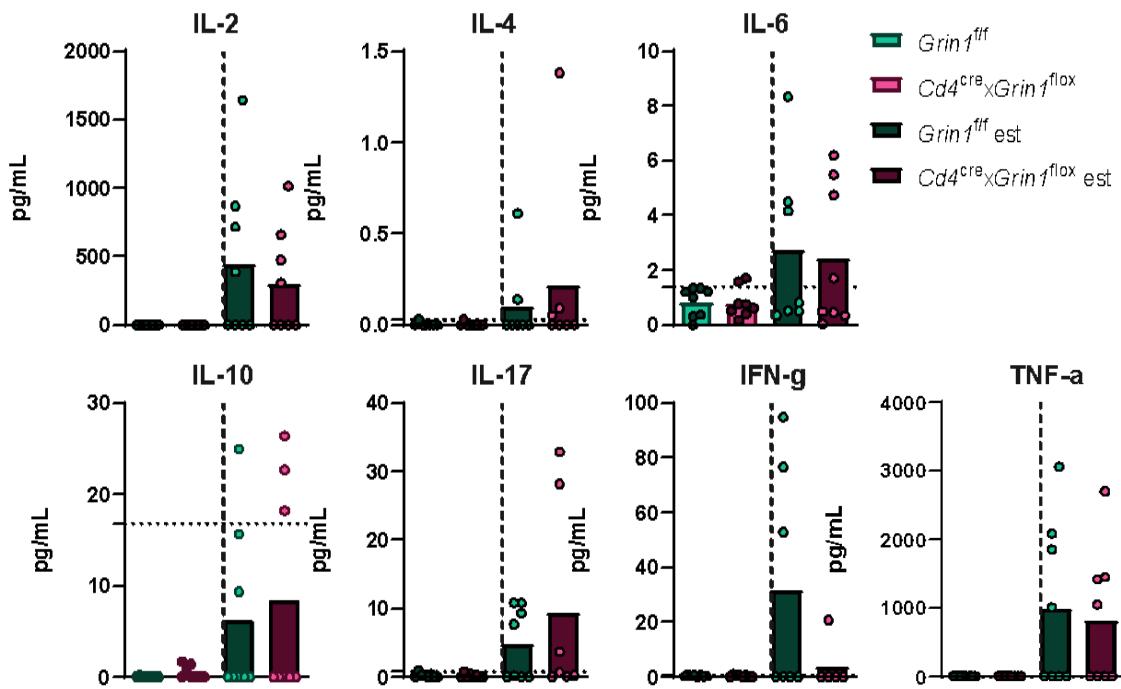




**Figura 5. Caracterização da frequência de células imunes dos linfonodos mesentéricos de camundongos  $CD4^{cre} \times Grin1^{fl/fl}$ .** Células dos linfonodos mesentéricos de camundongos  $Grin1^{+/+}$  e  $CD4^{cre} \times Grin1^{fl/fl}$  com 8 semanas de idade. Dots plots ilustrativos da estratégia de gates utilizada. As células foram marcadas com CD45, CD4, CD8, TCR $\gamma\delta$ , CD11c e F4/80 para avaliar a frequência de linfócitos T $\alpha\beta$   $CD4^+$  (A e F) e  $CD8^+$  (B e G), linfócitos T $\gamma\delta$  (C e H), células dendríticas (D e I) e macrófagos (E e J) por citometria de fluxo (BD LSRIFortessa). Foram utilizados n=21 camundongos  $Grin1^{+/+}$  e n=19 camundongos  $CD4^{cre} \times Grin1^{fl/fl}$ , provenientes de quatro experimentos independentes para a frequência e três experimentos independentes para o número absoluto,

#### 4.5 Secreção de citocinas por células dos linfonodos mesentéricos

Na **Figura 6**, é possível observar que após o estímulo foram capturadas todas as citocinas avaliadas provenientes de linfonodos mesentéricos para ambos os grupos, porém, assim como para as células intraepiteliais do intestino delgado, não foi possível notar diferença significativa no perfil de secreção dessas citocinas entre o grupo experimental e controle.



**Figura 6. Caracterização do perfil de secreção de citocinas pelas células dos linfonodos mesentéricos de camundongos *CD4<sup>cre</sup>xGrin1<sup>fl/fl</sup>*.** Células dos linfonodos mesentéricos de camundongos *Grin1<sup>fl/fl</sup>* e *CD4<sup>cre</sup>xGrin1<sup>fl/fl</sup>* com 8 semanas de idade. As células foram submetidas à cultura e estimuladas ou não com 50 ng/mL de PMA e 1 µg/mL de Ionomicina por 4 horas a 37 °C. Foram dosadas as citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IFN-γ e TNF-α do sobrenadante das culturas pelo ensaio de CBA por citometria de fluxo. Foram utilizados n=11 camundongos *Grin1<sup>fl/fl</sup>* e n=9 *Cd4<sup>cre</sup>xGrin1<sup>fl/fl</sup>*, provenientes de dois experimentos independentes.

## 5.6 Ensaio de influxo de cálcio em células de baço

Para padronizar o protocolo de caracterização do influxo de cálcio para linfócitos T CD8<sup>+</sup> e T CD4<sup>+</sup>, utilizamos células do baço de camundongos C57BL6 *Grin1<sup>fl/fl</sup>*. As células previamente marcadas com o Fluo-4 Direct foram submetidas a diferentes estímulos durante a aquisição pelo citômetro de fluxo Accuri.

Na **Figura 7A**, em condição basal, ou seja, sem estímulo, é possível notar que o cálcio intracelular permaneceu em níveis basais. Ao comparar as células estimuladas com Ionomicina (**Fig.7B**) com as células sem estímulo (**Fig.7A**), é possível observar um aumento na concentração intracelular de cálcio que coincide

com o exato momento em que foi adicionado a Ionomicina, um indutor da abertura de canais de  $\text{Ca}^{2+}$ . Observa-se, também, que as células estimuladas com Ionomicina (**Fig. 7B**) apresentaram perfis diferentes de queda de concentração intracelular de cálcio, o que nos leva a acreditar que existem populações celulares distintas em nossa suspensão celular.

Nas células em que foi adicionado NMDA (**Fig. 7C**), nota-se que no momento em que esse estímulo foi adicionado houve um ligeiro aumento na concentração intracelular de cálcio, não tão significativa quanto o ocorrido nas células estimuladas com Ionomicina (**Fig. 7B**), o que é esperado, uma vez que a Ionomicina age sobre todos os diferentes tipos de receptores/canais de cálcio, não apenas sobre o NMDAR.

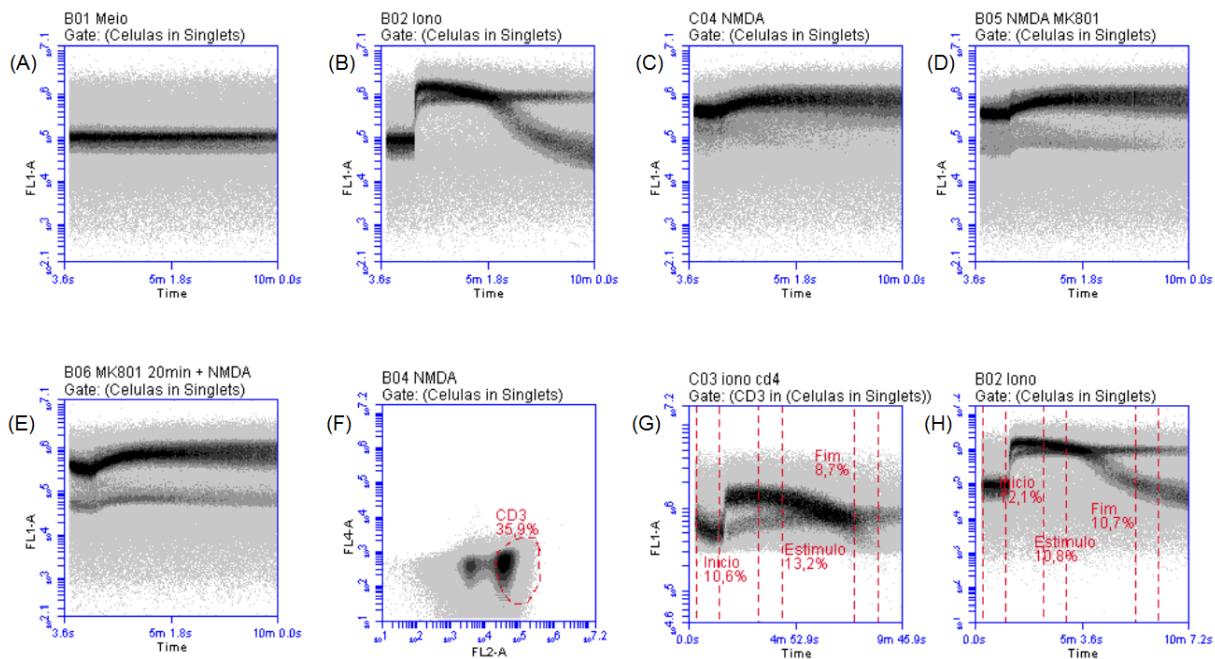
Nas suspensões celulares representadas pelas **Figuras 7D e 7E**, além do estímulo do NMDA também foi adicionado MK081, inibidor seletivo do receptor NMDAR. Enquanto na **Figura 7D** ambos os estímulos foram adicionados juntos, a suspensão celular representada pela **Figura 7E** foi incubada previamente com MK801 por 20 minutos e o estímulo do NMDA apenas foi adicionado durante a aquisição no citômetro. Nota-se que ambos os estímulos com MK801 não foram capazes de bloquear o NMDAR, já que não foi possível observar um aumento da concentração de cálcio intracelular (**Fig. 7C**).

Na **Figura 7F** está representado o *gate* para a marcação de CD3, mostrando que 35,9% da suspensão de células do baço são linfócitos T. Na **Figura 7G** selecionamos o *gate* de CD3 e repetimos o ensaio de da **Figura 7B** com o estímulo de Ionomicina e marcação para CD4. A marcação para CD4 não foi observada, mas ao comparar o gráfico com a seleção para células marcadas (**Fig. 7G**) com o gráfico de células totais do baço (**Fig. 7H**) nota-se um perfil de decaimento da concentração de cálcio distinto.

Observa-se que o basal de cálcio intracelular se mostra diferente nas diferentes amostras, não se sabe ao certo o porquê desse ocorrido já que todas as amostras foram incubadas nas mesmas condições.

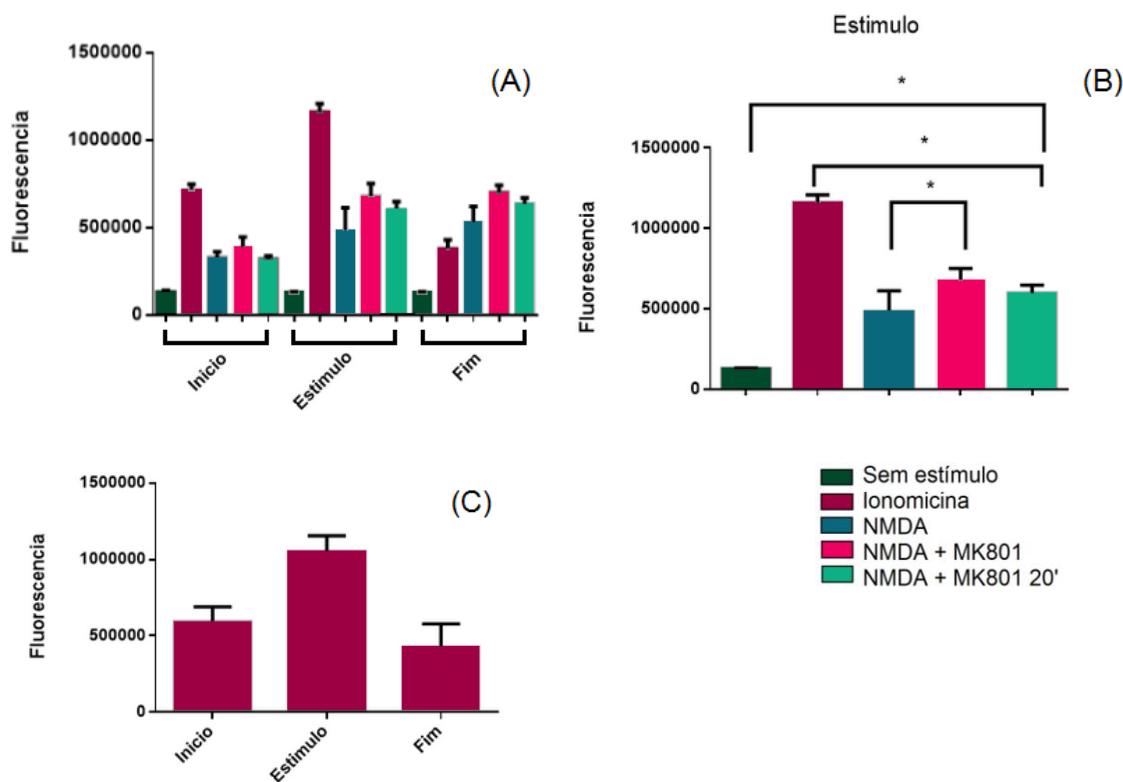
Na **Figura 8A** observa-se o gráfico da fluorescência em cada uma das suspensões de células não marcadas no início, no momento da adição do estímulo

e no final. Na **Figura 8B** é possível observar por meio da fluorescência a diferença do influxo de cálcio em cada uma das suspensões celulares não marcadas no momento da adição dos estímulos em comparação à amostra que só contém meio. Na **Figura 8C** está representado o gráfico de fluorescência apenas das suspensões de células marcadas com CD3 no início, no momento da adição do estímulo (Ionomicina) e no final. Nota-se que houve uma tendência de aumento na fluorescência, ou seja, no influxo de cálcio na célula, durante a administração da Ionomicina em linfócitos T embora a análise não tenha mostrado diferenças significativas.



**Figura 7. Caracterização do influxo de cálcio em células de baço de camundongos *Grin1<sup>ff</sup>*.**

Suspensão de células de baço de camundongos *Grin1<sup>ff</sup>* foram plaqueadas e incubadas com Fluo-4 Direct para a marcação de Cálcio intracelular. Cada amostra, durante a leitura sofreu a injeção ou não de um dos seguintes estímulos: A-Não estimulada, B-Ionomicina (10 µg/mL), C- NMDA (300 µM), D- NMDA (300 µM) + MK801 (200 µM), E- NMDA (300 µM) + MK801 (200 µM por 20 min previamente). Em F está representado o gate para CD3 (FL2). Em G podemos observar o influxo de cálcio dentro da população CD3<sup>+</sup> após estimulação com Ionomicina (10 µg/ mL) e em H está representado esse mesmo resultado para células totais do baço. Os eventos foram lidos no citômetro de fluxo Accuri.



**Figura 8. Análise gráfica da caracterização do influxo de cálcio em células de baço de camundongos *Grin1<sup>ff</sup>*.** Gráficos da emissão de fluorescência pelas suspensões de células de baço de camundongos *Grin1<sup>ff</sup>* incubadas com Fluo-4 Direct para marcação intracelular de cálcio estimuladas ou não com Ionomicina (10 µg/mL), NMDA (300 µM), NMDA (300 µM) +MK801 (200 µM) e NMDA (300 µM) +MK801 (200 µM por 20 min previamente). No gráfico A é possível observar a emissão de fluorescência pelas suspensões de células não marcadas em três momentos: no início da leitura, no momento da adição dos estímulos e no final da leitura. No gráfico B está representado de modo comparativo a emissão de fluorescência de cada suspensão celular no momento da adição dos estímulos. O gráfico C apresenta a fluorescência emitida pela suspensão celular marcada para CD3 em três momentos: no início da leitura, no momento da adição dos estímulos e no final da leitura.

## 5. DISCUSSÃO

Estudos recentes têm demonstrado que os linfócitos T apresentam receptores NMDAR similares àqueles expressos pelas células do sistema nervoso central, confirmando que o glutamato é um neurotransmissor funcional em células imunes (MIGLIO; VARSALDI; LOMBARDI, 2005).

O receptor NDMAR atua como um canal iônico, aumentando os níveis intracelulares de cálcio nas células imunes no contexto da ativação celular, contribuindo com reações locais e sistêmicas mediadas por linfócitos T, como secreção de citocinas, polarização da subpopulação de linfócitos T helper, proliferação celular, modulação da expressão gênica e indução de espécies reativas de oxigênio. (ZAINULLINA et al., 2011)

Além disso, sabe-se que o glutamato é um importante modulador das funções intestinais agindo sobre células do GALT (RUTH; FIELD, 2013). No intestino, esse neurotransmissor pode ser proveniente da dieta, da secreção por neurônios do sistema nervoso entérico ou até mesmo ser resultado do metabolismo de bactérias da microbiota intestinal (TOMÉ, 2018).

Primeiramente, fizemos a análise histológica por coloração H&E e imunofluorescência do intestino delgado de camundongos *Grin1<sup>f/f</sup>*, na qual foi possível observar a estrutura do tecido intestinal e identificar linfócitos T residentes. Nas imagens obtidas foi possível notar as vilosidades e identificar a camada mucosa, na qual são encontrados os linfócitos T intraepiteliais. Não foi possível trazer imagens de histologia de camundongos *CD4<sup>cre</sup>Grin1<sup>fl/fl</sup>* para comparação, pois não conseguimos obter resultados satisfatórios para esse grupo devido à dificuldade enfrentada na etapa de secção dos *Swiss Rolls* no micrótomo. Ao avaliar as imagens de imunofluorescência, estas não apresentaram boa resolução devido ao excesso de DAPI nas amostras. Esse resultado aponta que, possivelmente, o protocolo de imunofluorescência não estava bem padronizado, podendo indicar que as células não tenham sido devidamente permeabilizadas. Porém, mesmo com os artefatos presentes nas imagens, é possível observar a presença de linfócitos T na mucosa intestinal.

Posteriormente fizemos a análise da frequência celular e do perfil de secreção de citocinas de células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> intraepiteliais e dos linfonodos mesentéricos de camundongos deficientes do receptor NMDAR.

De acordo com nossos resultados, a deleção de receptores NMDAR em linfócitos Tαβ está relacionada à redução na frequência de linfócitos T CD4<sup>+</sup> nos linfonodos mesentéricos, e um aumento no número absoluto de linfócitos T CD4<sup>+</sup> intraepiteliais do intestino delgado, o que sugere uma maior proliferação dessas células no intestino delgado de animais *Cd4<sup>cre</sup>xGrin1<sup>flox</sup>* e nos faz pensar na hipótese de que essas células estão migrando entre os compartimentos (dos mLN para a mucosa intestinal).

Para linfócitos T CD8<sup>+</sup>, a deleção do receptor NMDAR demonstrou gerar um aumento na frequência dessa população nos linfonodos mesentéricos. Ao contrário do que ocorreu com a população T CD8<sup>+</sup> no epitélio da mucosa intestinal, que se mostrou reduzida nos camundongos deficientes do receptor NMDAR. Esses resultados sugerem que essas células de perfil citotóxico podem ter sofrido uma migração para os linfonodos mesentéricos. Os linfócitos Tγδ, células dendríticas e macrófagos não demonstraram qualquer alteração na sua frequência ou número absoluto em decorrência da deleção do receptor NMDAR em linfócitos Tαβ.

Avaliamos também o perfil de secreção de citocinas de perfil Th1, Th2 e Th17 por células do epitélio da mucosa intestinal e linfonodos mesentéricos. As células estimuladas com PMA e Ionomicina, tanto provenientes de animais *Cd4<sup>cre</sup>xGrin1<sup>flox</sup>* quanto de animais *Grin1<sup>ff</sup>*, não demonstraram alterações nos níveis de secreção de citocinas quando comparado com as células não estimuladas. Acreditamos que isso ocorreu pois não conseguimos uma boa viabilidade de células estimuladas.

Por fim, fizemos algumas tentativas de estabelecimento do protocolo do ensaio de influxo de cálcio. No nosso primeiro teste, realizado com células de baço de camundongos *Grin1<sup>ff</sup>*, pudemos observar que, para as células não marcadas, o estímulo com Ionomicina resultou em um aumento da fluorescência, que representa o Ca<sup>2+</sup> intracelular, enquanto o estímulo com NMDA gerou apenas uma tendência de aumento da fluorescência. Esses resultados são condizentes, uma vez que o NMDAR representa uma pequena parcela dos canais de cálcio presentes nas

células (estimulado pelo NMDA) enquanto a Ionomicina é capaz de ativar todos os canais de cálcio das células. Ainda nas células não marcadas, observamos que o MK801 (inibidor não competitivo de NMDAR) não demonstrou bloquear o receptor NMDAR conforme esperado. É possível que a concentração de MK801 utilizada tenha sido mais alta do que o adequado e tenha causado um efeito *off-target* de ligação do MK801 preferencialmente em outros canais iônicos ou até mesmo em outras proteínas intracelulares (SUN et al., 2018). Já para as células marcadas com CD3, observou-se uma tendência de aumento no influxo de cálcio nas células estimuladas com Ionomicina, o que sugere que nosso protocolo funcionou para linfócitos T, uma vez que conseguimos estimular os canais de cálcio dessas células. Não fizemos o protocolo de adição dos outros estímulos para células marcadas pois o objetivo desse ensaio era apenas verificar se o protocolo do Fluo-4-Direct (Thermo Fischer) e os anticorpos anti-CD3 estavam funcionando.

Com esse trabalho era esperado também que fosse possível observar a contribuição dos receptores NMDAR nos linfócitos Ta $\beta$  do epitélio intestinal, pressupondo que a deleção dos receptores NMDAR levaria à uma redução no influxo de cálcio, o que levaria à diminuição do perfil inflamatório desses linfócitos. Porém, não foi possível trazer resultados comparativos dos ensaios de influxo de cálcio para linfócitos Ta $\beta$  intestinais devido a alguns contratemplos que enfrentamos durante a execução desse trabalho.

Primeiramente, a pandemia de SARS-CoV-2 tornou o acesso aos laboratórios do ICB-IV restritos, dificultando a execução desse e de outros experimentos. Após a reabertura dos laboratórios, nos deparamos também com problemas técnicos em relação ao citômetro de fluxo Accuri (BD Biosciences), necessário para a aquisição das amostras desse ensaio. Tentamos ajustar o protocolo para leitura das amostras no outro citômetro que tínhamos disponível, Attune (Thermo Fischer), porém os resultados não foram satisfatórios, uma vez que o fluxo de aquisição de amostras por esse aparelho não é contínuo, o que dificulta a adição dos estímulos e rápida aquisição. Por esses motivos, não foi possível o cumprimento da totalidade dos objetivos propostos por esse trabalho até o prazo estipulado.

## 6. CONCLUSÃO

Observou-se os seguintes resultados provenientes da deleção do receptor de glutamato NMDAR em linfócitos T $\alpha\beta^+$ :

- ✓ Aumento absoluto de linfócitos TCD4 $^+$  e redução da porcentagem de linfócitos TCD8 $^+$  intraepiteliais do intestino delgado de camundongos;
- ✓ Redução do percentual de linfócitos TCD4 $^+$  e aumento da porcentagem de linfócitos TCD8 $^+$  nos linfonodos mesentéricos.

## 7. BIBLIOGRAFIA

- CHAPUY, L.; SARFATI, M. Single-Cell Protein and RNA Expression Analysis of Mononuclear Phagocytes in Intestinal Mucosa and Mesenteric Lymph Nodes of Ulcerative Colitis and Crohn's Disease Patients. **Cells**, v. 9, n. 4, 2020.
- CIOFFI, C. L. Modulation of NMDA receptor function as a treatment for schizophrenia. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, n. 18, p. 5034–5044, 2013.
- EROFEEVA, L. M.; MNIKHOVICH, M. V. Structural and Functional Changes in the Mesenteric Lymph Nodes in Humans during Aging. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 168, n. 5, p. 694–698, 2020.
- FENNINGER, F.; JEFFERIES, W. A. What's Bred in the Bone: Calcium Channels in Lymphocytes. **The Journal of Immunology**, v. 202, n. 4, p. 1021–1030, 2019.
- FILPA, V. et al. Role of glutamatergic neurotransmission in the enteric nervous system and brain-gut axis in health and disease. **Neuropharmacology**, v. 111, p. 14–33, 2016.
- FISCHER, A. H. et al. Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 3, n. 5, p. 4986–4988, 2008.
- FONNUM, F. Glutamate: A Neurotransmitter in Mammalian Brain. **Journal of Neurochemistry**, v. 42, n. 1, p. 1–11, 1984.
- GUY-GRAND, D.; VASSALLI, P. Gut intraepithelial lymphocyte development. **Current Opinion in Immunology**, v. 14, n. 2, p. 255–259, 2002.
- KABAT, A. M.; POTT, J.; MALOY, K. J. The mucosal immune system and its regulation by autophagy. **Frontiers in Immunology**, v. 7, n. JUN, p. 1–25, 2016.
- LEVITE, M. Glutamate, T cells and multiple sclerosis. **Journal of Neural Transmission**, v. 124, n. 7, p. 775–798, 2017.
- LUCEY, B. C.; STUHLFAUT, J. W.; SOTO, J. A. Nodes Seen at Imaging: Causes and OBJECTIVES. **Test**, p. 351–365, 2005.
- MA, H.; TAO, W.; ZHU, S. T lymphocytes in the intestinal mucosa: defense and tolerance. **Cellular and Molecular Immunology**, n. February, 2019.
- MIGLIO, G.; VARSALDI, F.; LOMBARDI, G. Human T lymphocytes express N-methyl-D-aspartate receptors functionally active in controlling T cell activation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 338, n. 4, p. 1875–1883, 2005.
- PABST, O. et al. Mesenteric lymph node stroma cells in the generation of intestinal immune responses. **Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)**, v. 87, n. 10, p. 945–951, 2009.
- PAOLETTI, P.; BELLONE, C.; ZHOU, Q. NMDA receptor subunit diversity: Impact on receptor

- properties, synaptic plasticity and disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 14, n. 6, p. 383–400, 2013.
- PEZOLDT, J. et al. Neonatally imprinted stromal cell subsets induce tolerogenic dendritic cells in mesenteric lymph nodes. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, 2018.
- QIU, Y. et al. Role of the intestinal cytokine microenvironment in shaping the intraepithelial lymphocyte repertoire. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 97, n. 5, p. 849–857, 2015.
- ROUSSEAUX, C. G. A Review of Glutamate Receptors I: Current Understanding of Their Biology. **Journal of Toxicologic Pathology**, v. 21, n. 1, p. 25–51, 2008.
- RUTH, M. R.; FIELD, C. J. The immune modifying effects of amino acids on gut-associated lymphoid tissue. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 4, n. 1, p. 1–10, 2013.
- SAHIN, A. et al. A neglected issue in ulcerative colitis: Mesenteric lymph nodes. **Journal of Clinical Medicine**, v. 7, n. 6, 2018.
- SHERIDAN, B. S.; LEFRANÇOIS, L. Intraepithelial lymphocytes: To serve and protect. **Current Gastroenterology Reports**, v. 12, n. 6, p. 513–521, 2010.
- SRIKANTH, S. et al. Store-operated Ca<sup>2+</sup> entry (SOCE) pathways. **Store-operated Ca<sup>2+</sup> entry (SOCE) pathways**, 2012.
- SUN, W. et al. Incomplete block of NMDA receptors by intracellular MK-801. **Neuropharmacology**, v. 143, n. September, p. 122–129, 2018.
- TOMÉ, D. The roles of dietary glutamate in the intestine. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 73, n. Suppl 5, p. 15–20, 2018.
- TREBAK, M.; KINET, J. P. Calcium signalling in T cells. **Nature Reviews Immunology**, v. 19, n. 3, p. 154–169, 2019.
- VAETH, M.; KAHLFUSS, S.; FESKE, S. CRAC Channels and Calcium Signaling in T Cell-Mediated Immunity. **Trends in Immunology**, v. 41, n. 10, p. 878–901, 2020.
- VAN KAER, L.; OLIVARES-VILLAGÓMEZ, D. Development, Homeostasis, and Functions of Intestinal Intraepithelial Lymphocytes. **The Journal of Immunology**, v. 200, n. 7, p. 2235–2244, 2018.
- VAN WIJK, F.; CHEROUTRE, H. NIH Public Access. **Changes**, v. 29, n. 6, p. 997–1003, 2012.
- VON ANDRIAN, U. H.; MEMPEL, T. R. Homing and cellular traffic in lymph nodes. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, n. 11, p. 867–878, 2003.
- VYKLICKY, V. et al. Structure, function, and pharmacology of NMDA receptor channels. **Physiological research**, v. 63 Suppl 1, p. S191-203, 2014.
- ZAINULLINA, L. F. et al. NMDA receptors as a possible component of store-operated Ca<sup>2+</sup> entry in

human T-lymphocytes. **Biochemistry (Moscow)**, v. 76, n. 11, p. 1220–1226, 2011.

## 8. ANEXOS



**Instituto  
de Ciências  
Biomédicas**  
*Excelência em Ensino e Pesquisa*

**Universidade de São Paulo  
Comissão de Ética no  
Uso de Animais**

CEUA N: 1287040618

Título: "Caracterização fenotípica e funcional de linfócitos T alfa beta da mucosa intestinal em camundongos CD4crexGrin1flox"

Pesquisador: Jean Pierre Schatzmann Peron  
Área: Imunologia

**JUSTIFICATIVA**

Gostaríamos de incluir a aluna Rafaela Tardelli Andreoni no protocolo de ética já aprovado, para realizar atividades de iniciação científica. A bolsa da aluna foi enviada ao programa PIBIC CNPq.

**JUSTIFICATIVA (EMENDA)**

Gostaríamos de incluir a aluna Rafaela Tardelli Andreoni no protocolo de ética já aprovado, para realizar atividades de iniciação científica. A bolsa da aluna foi enviada ao programa PIBIC CNPq.

MEMBROS ADICIONADOS OU REMOVIDOS DA PROPOSTA

**Pesquisador ADICIONADO:**

E-mail:	rafaela.andreoni@usp.br	Telefone:	11989997763
Nome:	Rafaela Tardelli Andreoni	Nível:	Aluno de graduação
Instituição:	Universidade de São Paulo		
Vínculo:	Aluno de Iniciação Científica		
Experiência:	Não: 0 (anos)	Treinamento:	Sim: 40 (horas)
Cv. Lattes:	<a href="http://lattes.cnpq.br/0353337545062538">http://lattes.cnpq.br/0353337545062538</a>		
Setor:	Imunologia	Função:	Executante

Obs: A aluna Rafaela possui treinamento de 10 horas no curso de Uso de Animais para Experimentação, certificado em anexo.

Rafaela Andreoni

Rafaela Tardelli Andreoni

Jean Pierre Peron

Jean Pierre Schatzmann Peron