



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

Universidade Federal de Alfenas

Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Saúde

Gabriel Monteiro da Silva. 700. Centro. Alfenas. MG. 37130-000. F:3299-1300



MARINA MALERBA DE SOUZA

**PARTICIPAÇÃO DE CANAIS IÔNICOS NA TRANSDUÇÃO DO SINAL
OSMÓTICO EM ASTRÓCITOS HIPOTALÂMICOS EM CULTURA**

Alfenas/MG
2019

MARINA MALERBA DE SOUZA

PARTICIPAÇÃO DE CANAIS IÔNICOS NA TRANSDUÇÃO DO SINAL OSMÓTICO
EM ASTRÓCITOS HIPOTALÂMICOS EM CULTURA

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências Aplicadas à Saúde pela Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG).

Área de concentração: Neurociências e Comportamento

Orientadora: Profa. Dra. Silvia Graciela Ruginsk Leitão

Alfenas/MG
2019

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas

S729p Souza, Marina Malerba de.
Participação de canais iônicos na transdução do sinal osmótico em astrócitos hipotalâmicos em cultura / Marina Malerba de Souza – Alfenas/MG, 2019.
63 f.: il. --

Orientadora: Silvia Graciela Ruginsk Leitão.
Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Saúde) - Universidade Federal de Alfenas, 2019.
Bibliografia.

1. Concentração Osmolar. 2. Astrócitos. 3. Canais Iônicos. 4. Proteína Glial Fibrilar Ácida. 5. Ácido Glutâmico. 6. Canais de Cálcio Tipo L. I. Leitão, Silvia Graciela Ruginsk. II. Título.

CDD-612.8

MARINA MALERBA DE SOUZA

PARTICIPAÇÃO DE CANAIS IÔNICOS NA TRANSDUÇÃO DO SINAL OSMÓTICO EM
ASTRÓCITOS HIPOTALÂMICOS EM CULTURA

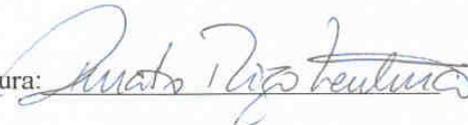
A Banca Examinadora, abaixo assinada, aprova a
Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para a obtenção do título de Mestre
em Biociências Aplicadas à Saúde pela
Universidade Federal de Alfenas. Área de
concentração: Neurociências e Comportamento.

Aprovado em: 28/02/2019

Profª. Dra. Silvia Graciela Ruginsk Leitão
Instituição: Universidade Federal de Alfenas-MG
– UNIFAL-MG

Assinatura: 

Prof. Dr. Renato Rizo Ventura
Instituição: Universidade Federal de Alfenas-MG
– UNIFAL-MG

Assinatura: 

Prof. Dr. Marcos Vinicios Salles Dias
Instituição: Universidade Federal de Alfenas-MG
– UNIFAL-MG

Assinatura: 

Dedico este projeto à minha família, minha base e porto seguro, responsáveis por quem sou e por onde cheguei: minha mãe Cristina, meu tio Dante e minha tia Anézia.

AGRADECIMENTOS

Ao Plano Espiritual, meu maior guia. Gratidão pelo apoio, pelo conforto, pela força, pelos pequenos sinais que guiaram meus passos e pela proteção, hoje e sempre.

À minha família, minha base e porto seguro. Gratidão pela confiança e fé depositadas em mim, pois se cheguei até aqui foi graças a cada um e vocês, ao apoio, à ajuda que me deram. E é por vocês que sigo lutando sempre: minha mãe Cristina, minha guerreira; meu tio Dante, meu verdadeiro pai e amigo; minha tia Anézia, amiga e companheira.

À Universidade Federal de Alfenas, minha amada UNIFAL-MG. Gratidão aos mestres e amigos que colocou em meu caminho. Hoje levo comigo um pouco do aprendizado passado por cada um deles, montando, assim, minha base profissional. Não me esquecerei de vocês e peço, humildemente, que não se esqueçam de mim.

À cidade de Alfenas – MG, minha segunda casa, minha morada pelos últimos sete anos. Gratidão por cada pessoa que colocou em minha vida: algumas permaneceram ao meu lado fisicamente; outras passaram pelo meu convívio e hoje enviam seu apoio a distância; teve quem passou brevemente e deixou sua marca; há quem passou apenas para deixar uma lição. Mas todos ajudaram no meu crescimento pessoal. Hoje me despeço dessa cidade com o sentimento de dever cumprido, com a gratidão registrada na pele e o coração leve.

A toda equipe do Laboratório de Fisiologia, minha segunda família. Gratidão pelo apoio, pelas conversas, pelas risadas, pelas melhores festinhas de confraternização (diga-se de passagem, somos os melhores nisso). Gratidão pela companhia nas manhãs de inverno, ao tomar chá na cozinha (nunca me esquecerei do aroma de capim cidreira ao entrar); pelos almoços em grupo, quando pedíamos marmita, não somente por não ter tempo para ir almoçar em casa, mas também para podermos passar um tempo juntos, conversando e gargalhando; pelos fins de tarde, sempre com uma boa xícara de café nas mãos; e pelas noites que me acompanharam no Bar do Tié. Gratidão por me receberem sempre com um sorriso e/ou um abraço; por entrar no laboratório durante os verões de Alfenas e não querer mais sair, pois o ar condicionado estava no mínimo (ninguém resistia e dizia “ah, que delícia está aqui dentro”). Gratidão pelos muitos dias de experimentos e pelas mais de 12h que já chegamos a passar trancados dentro do laboratório, mas que, ao retornar pra casa e deitar na cama para descansar, trazia-me um grande sentimento de dever cumprido. Gratidão a vocês: Prof.

Renato, Profa. Jalile, Prof. Giovani, Prof. Bento, Vanusa, Andréia, Bianca, Milton, Rodrigo Dias, Rodrigo Placido, Priscila.

À Profa. Dra. Silvia Graciela Ruginsk Leitão, minha eterna gratidão pelos quase cinco anos de orientação, parceria e amizade. Gratidão pelo aprendizado, pelas dicas e pelos ensinamentos, que são a grande base profissional que eu jamais imaginei receber. Gratidão pela paciência comigo, principalmente quando eu me encontrava mais distraída ou cansada e já não conseguia raciocinar de forma rápida e clara; pela atenção e dedicação depositadas em mim, principalmente quando eu não entendia algum cálculo e/ou procedimento, tendo que me explicar mais de uma vez. Gratidão pelas caronas de Alfenas para Ribeirão Preto e vice-versa e as três horas de viagem que me faziam rir, alegrava-me com suas histórias e me acalmava como um momento no qual eu podia fazer algum desabafo. Gratidão por ter acreditado e confiado em mim para a realização desse projeto. Gratidão por ter entendido os momentos que passei nesses últimos dois anos, e por não ter desistido de mim quando eu mesma já estava desistindo.

Aos amigos de Ribeirão, meus irmãos do coração: Michelle, Rafael, Natália, Raphael, Guilherme e a nossa pequena Milena. Minha eterna gratidão por sempre me receberem de braços abertos. Gratidão por terem respeitado minha escolha de viver essa jornada e por nunca terem deixado de me apoiar, mesmo morado em outra cidade por sete anos e não podendo estar presente fisicamente em vários momentos. Gratidão por cada reencontro, por cada mensagem enviada, por cada risada que arrancaram do meu rosto, pela força nos momentos difíceis e pela amizade sempre.

Às minhas companheiras de república e amigas: Isabella e Karina, anjos que foram enviados para estar ao meu lado nesses últimos anos, e talvez os mais difíceis para mim. Gratidão pela força e apoio nos meus piores momentos. Gratidão pelo “você está bem?” e “se quiser conversar, pode falar comigo!”. Gratidão pelos dias cansativos que cada uma passava, mas ao nos encontrarmos a noite, na nossa cozinha, o sorriso e as risadas eram garantidos. Gratidão por entenderem e apoiarem a minha ausência em Alfenas enquanto eu trabalhava na FMRP-USP.

À minha amiga Mayara Lambert. Gratidão pelo companheirismo desde o início da nossa jornada na cidade de Alfenas, passando juntas pela graduação e, por último, enfrentando ao meu lado a pós-graduação. Gratidão por cada encontro, por cada fim de tarde

no Bar do Tié, por cada festinha, por cada mensagem, por cada conversa, pelo apoio e pela força que sempre me deu.

À Profa. Marília Gabriella Alves Goulart Pereira, do Laboratório de Bioquímica da UNIFAL-MG, gratidão por ter aberto seu espaço para o desenvolvimento experimental desse projeto, por toda ajuda com a sala de cultura e com o preparo dos materiais. Gratidão, pelos experimentos que fizemos juntas, pela companhia, pelas conversas, pelo apoio, pelas dicas e pelos conselhos sobre o futuro profissional, dos quais não me esquecerei.

À Profa. Livia Moda, especialista no manuseio do microscópio Confocal, minha eterna gratidão por disponibilizar seu tempo para me ajudar no registro das imagens de cada grupo experimental do projeto.

À Adriana, secretária do Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Saúde, gratidão por toda a atenção, por toda a ajuda e disponibilidade dada, não só a mim, mas a todos os pós-graduandos do programa. Gratidão pelo apoio.

Ao Laboratório de Neuroendocrinologia da FMRP-USP, principalmente à Milene, à Val e ao Léo, minha eterna gratidão por toda a ajuda e por todo o suporte dado a mim, uma vez que eu me encontrava em um ambiente desconhecido e um tanto perdida.

A toda a equipe do Laboratório de Neurofisiologia e Sinapse da FMRP-USP: Prof. Dr. Ricardo Maurício Xavier Leão, Fernandinho, Alexandra, Nikollas, Dani, Helena, Procópio, Júnia. Gratidão por terem me recebido de braços abertos e por terem me dado todo o apoio e atenção. Gratidão por terem confiado em mim na utilização do laboratório e no desenvolvimento dos experimentos referentes à nossa parceria. Gratidão pelos ensinamentos, pela orientação, pelas conversas, pelas risadas e por terem se tornado minha segunda casa pelos últimos cinco meses.

A FAPEMIG e ao órgão de fomento CAPES. Gratidão pelo apoio financeiro, sem o qual não seria possível minha permanência na cidade de Alfenas para desenvolver este projeto.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“If I have seen further than others, it is by standing upon the shoulders of giants.”

(Sir Isaac Newton, 1643-1727)

RESUMO

Evidências recentes mostram que os astrócitos constituem elementos essenciais às respostas adaptativas induzidas por desafios osmóticos. Em neurônios, a transdução do sinal osmótico é mediada pela abertura ou fechamento de canais iônicos, alguns deles expressos por astrócitos, tais como o *transient receptor potential vanilloid type 1* (TRPV1), os *stretch-inactivated channels* (SIC) e canais de Ca^{2+} tipo-L (LTCCs, sigla para *L-type calcium channels*). Assim, o presente estudo pretendeu avaliar, em presença de hiperosmolalidade e do bloqueio seletivo de canais iônicos, a viabilidade celular, a morfologia dos astrócitos (por meio da expressão da proteína ácida glial fibrilar – GFAP) e a captação de aspartato triciado. Para tanto, as células foram incubadas em condições basais (DMEM Base: ~300 mOsm/Kg H_2O , 109 mM de NaCl) e em condições de aumento das concentrações extracelulares de sódio (DMEM Hipertônico: ~360 mOsm/Kg H_2O , 132 mM de NaCl), na presença de bloqueadores específicos para os canais iônicos listados acima (Verapamil, 10 μM , bloqueador LTCC; Capsazepina, 30 μM , antagonista TRPV1; Gadolínio, 100 μM , bloqueador SIC). Interessantemente, somente o tratamento com Capsazepina teve efeito sobre a viabilidade celular, diminuindo a morte de astrócitos. A incubação com DMEM hipertônico reduziu significativamente a expressão de GFAP em astrócitos hipotalâmicos, bem como a captação de aspartato triciado. Um efeito similar de redução da expressão da GFAP foi observado nas condições basais em resposta à incubação com Verapamil. Contudo, a incubação com Verapamil não alterou a resposta de captação de aspartato, seja em condições basais ou hipertônicas. A incubação com Capsazepina, por sua vez, reverteu a resposta induzida pelo DMEM hipertônico sobre a expressão de GFAP, sem interferir na captação de aspartato. E, finalmente, o bloqueio dos canais SIC pela incubação com Gadolínio, induziu uma resposta aberrante de aumento intenso da expressão de GFAP, apenas em presença do meio hipertônico. Portanto, concluímos que os LTCCs desempenham um papel importante na expressão de GFAP, preferencialmente em condições basais ou não relacionadas ao estímulo osmótico. Por outro lado, os canais TRPV1 e, principalmente, o SIC, parecem desempenhar papéis fundamentais nos rearranjos estruturais observados nos astrócitos em resposta ao estímulo hipertônico. Contudo, os LTCCs e os TRPV1 parecem não mediar as mudanças ocorridas no transporte de glutamato em presença de hiperosmolalidade. Já os SIC mostraram aumentar tal transporte.

Palavras-chave: Concentração Osmolar, Astrócitos, Canais Iônicos, Proteína Glial Fibrilar Ácida, Ácido Glutâmico, Canais de Cálcio Tipo L.

ABSTRACT

Recent evidence shows that astrocytes are essential elements to the adaptive responses induced by osmotic challenges. In neurons, the osmotic signal transduction is mediated by the opening or closing of ion channels, some of which are also expressed by astrocytes, such as transient potential receptor vanilloid type 1 (TRPV1), stretch-activated channels (SAC) and L-type calcium channels (LTCCs). Thus, the present study aimed to evaluate cell viability, astrocyte morphology (through the expression of the Glial Fibrillary Acidic Protein - GFAP) and the uptake of tritiated aspartate in the presence of hyperosmolality and selective ion channel blockers. The cells were incubated under basal conditions (DMEM Base: ~ 300 mOsm / kg H₂O, 109 mM NaCl) and under conditions of increased extracellular sodium concentrations (Hypertonic DMEM: ~ 360 mOsm / kg H₂O, 132 mM NaCl) in the presence of specific ion channel blockers (Verapamil, 10 μM, LTCC blocker; Capsazepine, 30 μM, TRPV1 antagonist; Gadolinium, 100 μM, SAC blocker). Interestingly, only Capsazepine showed a significant effect on cellular viability, decreasing astrocytes death rate. Incubation with hypertonic DMEM significantly reduced GFAP expression in hypothalamic astrocytes, as well as the uptake of tritiated aspartate. A similar effect of reduced GFAP expression was observed under basal conditions in response to incubation with Verapamil. However, incubation with Verapamil did not alter aspartate uptake, either under basal or hypertonic conditions. Incubation with Capsazepine, in turn, reversed the response induced by hypertonic DMEM on GFAP expression, without interfering with aspartate uptake. And, finally, blocking the SAC channels by incubation with Gadolinium, induced an aberrant response of increased GFAP expression, only in the presence of the hypertonic medium. Thus, we have concluded that LTCCs play an important role in GFAP expression, preferably under basal conditions or those unrelated to osmotic stimulation. On the other hand, TRPV1 channels, and especially SAC, seem to play fundamental roles in the structural rearrangements observed in astrocytes in response to the hypertonic stimulus. LTCCs and TRPV1, in turn, do not appear to mediate changes in glutamate transport in the presence of hypertonicity. The SACs have shown to increase such transport.

Keywords: Osmolar Concentration, Astrocytes, Ion Channels, Glial Fibrillary Acidic Protein, Glutamic Acid, Calcium Channels L-Type.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Principais vias corporais de ganho e perda de água e NaCl.....	14
Figura 2 – Desenho representativo do controle da abertura/fechamento dos SIC pela osmolalidade.....	25
Figura 3 – Fotomicrografia representando cultura de células.....	29
Figura 4 – Viabilidade celular avaliada pelo ensaio de MTT em resposta aos diferentes tratamentos	36
Figura 5 – Efeitos da incubação com meio hipertônico contendo ou não Verapamil (10 μ M) sobre a expressão de GFAP em astrócitos hipotalâmicos.....	37
Figura 6 – Painel representativo das alterações na expressão de GFAP nas diversas condições experimentais.....	38
Figura 7 – Efeitos da incubação com meio hipertônico contendo ou não Capsazepina (30 μ M) sobre a expressão de GFAP em astrócitos hipotalâmicos.....	39
Figura 8 – Painel representativo das alterações na expressão de GFAP nas diversas condições experimentais.....	40
Figura 9 – Efeitos da incubação com meio hipertônico contendo ou não Gadolínio (100 μ M) sobre a expressão de GFAP em astrócitos hipotalâmicos.....	41
Figura 10 – Painel representativo das alterações na expressão de GFAP nas diversas condições experimentais.....	43
Figura 11 – Efeitos da incubação com meio DMEM hipertônico contendo ou não Capsazepina (30 μ M) sobre a captação de aspartato triciado em astrócitos hipotalâmicos.....	44
Figura 12 – Efeitos da incubação com meio DMEM hipertônico contendo ou não Capsazepina (30 μ M) sobre a captação de aspartato triciado em astrócitos hipotalâmicos.....	45
Figura 13 – Efeitos da incubação com meio DMEM hipertônico contendo ou não Gadolínio (100 μ M) sobre a captação de aspartato triciado em astrócitos hipotalâmicos.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AVP	Arginina vasopressina
GFAP	Glial fibrillary acid protein, proteína ácida fibrilar glial
GLAST	Glutamate and Aspartate Transporter, transportador de glutamato e aspartato
GLT-1	Glutamate Transporter type 1, transportador de glutamato do tipo 1
GS	Glutamina Sintetase
HMB	Hipotálamo Médio Basal
LEC	Líquido extracelular
LTCC	L-Type Calcium Channel, canal de cálcio do tipo L
MNCs	Magnocellular neurosecretory cells, células neurosecretoras magnocelulares
NPV	Núcleo paraventricular do hipotálamo
NSO	Núcleo supraóptico do hipotálamo
OVLT	Órgão Vasculoso da Lâmina Terminal
SAC	Stretch-Activated Channels, canais ativados por estiramento
SFO	Subfornical organ, Órgão Subfornical
SIC	Stretch-Inactivated Cationic Channels, canais catiônicos inativados por estiramento
SNC	Sistema Nervoso Central
TRPV1	Transient Receptor Potential Vanilloid type 1, receptor transiente do potencial vanilóide do tipo 1
VOCC	Voltage-Operated Ca^{2+} channels, canais de Ca^{2+} sensíveis à voltagem

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	Composição do sistema nervoso central	16
2.2	Os astrócitos e suas funções	18
2.3	A importância dos astrócitos na rede neurônio-gliial: a sinapse tripartite	19
2.4	Os astrócitos e o glutamato	20
2.5	Possíveis mecanismos relacionados à transdução do sinal osmótico em astrócitos	21
<i>2.5.1</i>	<i>Canais de cálcio tipo-L (LTCCs)</i>	21
<i>2.5.2</i>	<i>Receptor de Potencial Transitório Vaniloide 1 (TRPV1)</i>	22
<i>2.5.3</i>	<i>Canais catiônicos inativados por estiramento (SIC)</i>	23
3	JUSTIFICATIVA	26
4	OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS	27
5	METODOLOGIA	28
5.1	Animais	28
5.2	Cultura Primária de astrócitos hipotalâmicos	28
5.3	Pré-incubação	29
5.4	Incubação com DMEM Base ou DMEM Hipertônico	30
5.5	Ensaio de viabilidade celular pelo método de MTT	30
5.6	Imunofluorescência para GFAP	31
5.7	Ensaio de captação de aspartato triciado (³H-triciado)	32
5.8	Análise Estatística	32
6	PROCOLOS EXPERIMENTAIS	34
6.1	Efeitos do bloqueio de canais iônicos específicos e da hiperosmolalidade sobre a viabilidade de astrócitos hipotalâmicos	34
6.2	Efeitos do bloqueio de canais iônicos específicos e da hiperosmolalidade sobre a expressão de GFAP em astrócitos hipotalâmicos	34
6.3	Efeitos do bloqueio de canais iônicos específicos sobre a captação de aspartato triciado	35
7	RESULTADOS	36
7.1	Viabilidade celular	36

7.2	Expressão de GFAP	37
7.3	Captção de aspartato triciado	43
8	DISCUSSÃO.....	47
8.1	Viabilidade celular	48
8.2	Expressão de GFAP	49
8.3	Captção de aspartato triciado	52
9	CONCLUSÃO	55
	REFERÊNCIAS	56
	ANEXO.....	62

1 INTRODUÇÃO

A sobrevivência do organismo depende, fundamentalmente, da regulação precisa do volume dos fluidos corporais e da osmolalidade. Nos fluidos orgânicos, a osmolalidade é determinada majoritariamente pela concentração de cloreto de sódio (NaCl), o constituinte mais abundante do compartimento extracelular (líquido extracelular, LEC). Nos vertebrados, a osmolalidade do LEC é mantida pelo balanço entre o ganho e a perda de água e NaCl: o ganho se dá pela ingestão direta ou juntamente com alimentos, enquanto que a principal forma de perda se dá pela excreção urinária, uma vez que, em condições fisiológicas, as perdas insensíveis via transpiração, umidificação do ar inspirado e por via fecal são praticamente desprezíveis (Figura 1).

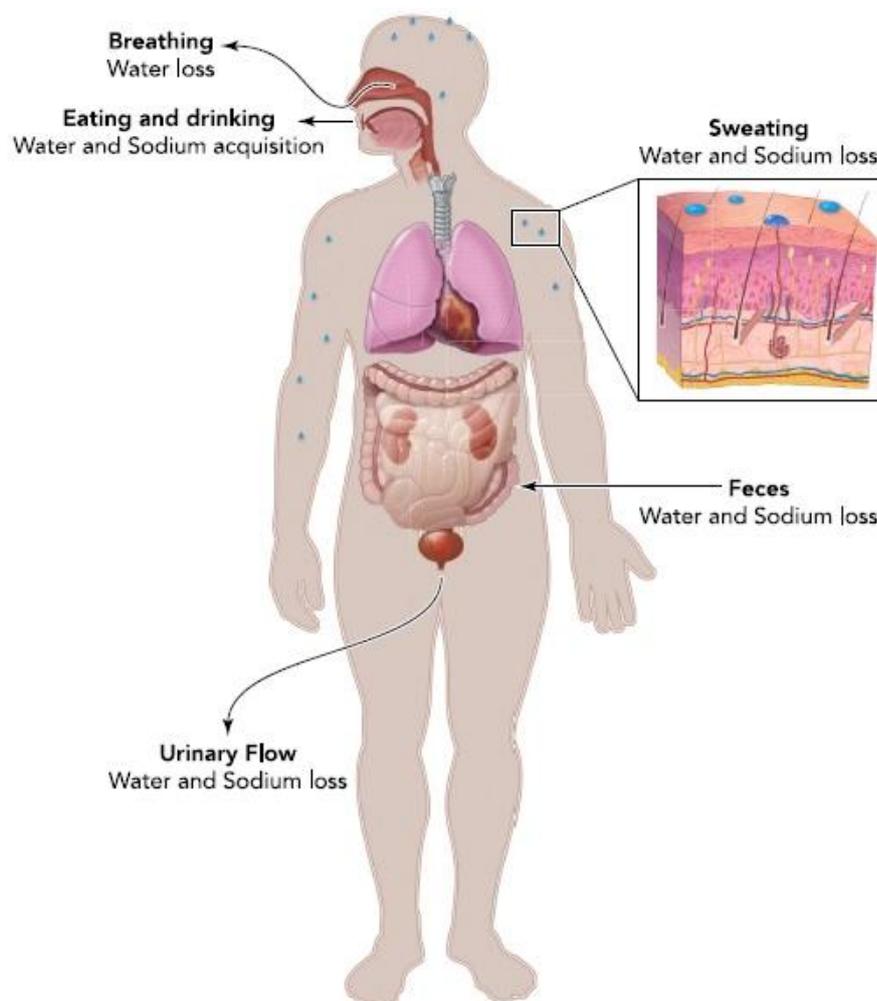


Figura 1 - Principais vias corporais de ganho e perda de água e NaCl.
Fonte: RUGINSK et al., 2015.

Assim, uma elevação da osmolalidade do LEC desencadeia a desidratação celular e leva ao desenvolvimento do comportamento homeostático de sede, definido como a necessidade ou desejo de beber água (ANTUNES-RODRIGUES et al., 2004). O aumento da osmolalidade também ativa sensores específicos, promovendo a liberação de Arginina Vasopressina (AVP), um neuro-hormônio que poupa água em nível renal (VERNEY, 1947). Andersson (1953), considerado o pioneiro nos estudos envolvendo os chamados osmorreceptores, acreditava que este tipo de sensor fosse, na verdade, um canal de sódio (Na^+), localizado periféricamente no trato gastrointestinal e, centralmente, em regiões da chamada lâmina terminal, áreas desprovidas de barreira hematoencefálica. Estes sensores estariam envolvidos no controle apetitivo de Na^+ , assim como no controle da excreção deste íon em resposta às mudanças em suas concentrações no LEC.

Acreditava-se, à época, que os neurônios seriam as principais células responsáveis por detectar centralmente as alterações na osmolalidade do LEC. De fato, a presença de neurônios osmossensíveis foi detectada em algumas regiões do sistema nervoso central (SNC) que possuem a barreira hematoencefálica mais permissiva, como é o caso do órgão vasculoso da lâmina terminal (OVLT), tendo sido confirmada a presença de sódio-receptores do tipo $\text{Na}(x)$ em neurônios desta região (ANTUNES-RODRIGUES et al., 2004). Mais recentemente, foi também demonstrado que neurônios presentes nesta região transduzem a hipertonicidade via ativação de canais seletivos para cátions, chamados canais *transient receptor potential vanilloid 1* (TRPV1) (CIURA; BOURQUE, 2006; CIURA; LIEDTKE; BOURQUE, 2011).

Além disso, estudos desenvolvidos por Noda (2007) mostraram que células gliais isoladas do órgão subfornical (SFO), uma região também desprovida de barreira hematoencefálica, são sensíveis a concentrações aumentadas de sódio. Além disso, esse autor observou que sensores do tipo $\text{Na}(x)$ estão presentes em astrócitos do SFO. Também foi demonstrado que a resposta neuronal à hipertonicidade do LEC é abolida se os astrócitos são inibidos, sugerindo que estas células participem ativamente da transdução do sinal osmótico (YUAN et al., 2010).

Diante de tais evidências, o presente estudo pretendeu avaliar o resultado do bloqueio da ação de canais iônicos específicos sobre a transdução do sinal osmótico em astrócitos hipotalâmicos isolados.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Composição do sistema nervoso central

O SNC é composto por dois grupos celulares: neurônios e neuroglia, ou células da glia. Os primeiros, mais conhecidos e estudados, são suas unidades morfofuncionais fundamentais, sendo os únicos capazes de produzir sinais bioelétricos. O termo glia provém do grego, e significa “cola”, fato que remete a estudos antigos que consideravam que essas células tinham como única função a agregação e sustentação entre neurônios. Atualmente, estudos apontam para funções mais complexas e fundamentais destas células (ARAQUE; NAVARRETE, 2010).

A neuroglia é um conjunto de células não neurais, os gliócitos, que, além da função estrutural (sustentação mecânica), orientam o posicionamento dos neurônios recém-gerados, controlam o metabolismo neuronal, assim como sua nutrição e a transmissão sináptica, além de apresentarem função imunitária. Estas células trocam sinais com os neurônios, aceleram a propagação dos impulsos nervosos, regulam o fluxo sanguíneo local em função da atividade neural (ação hemodinâmica), participam da seleção de substâncias que se movimentam entre o sangue e o tecido nervoso, e podem atuar como células-tronco em algumas regiões, tanto na fase de desenvolvimento como no indivíduo adulto. Uma função dos gliócitos particularmente relacionada ao presente estudo é a propriedade destas células de captar do LEC aminoácidos excitatórios, como o glutamato (ARAQUE; NAVARRETE, 2010).

Os gliócitos são tão numerosos quanto os neurônios, porém apresentam características morfológicas distintas. O corpo celular dos gliócitos é menor que dos neurônios, seu núcleo ocupa grande espaço, e não apresentam axônios. Do seu corpo saem inúmeros prolongamentos que se enovelam e se ramificam nas proximidades, que podem se conectar a neurônios, a outros gliócitos ou até mesmo a capilares sanguíneos. Tais células também podem influenciar diretamente a sinalização química nas sinapses, alterando a área de cobertura ao redor destas, isolando-as ou expondo-as aos constituintes do LEC. Dessa forma, os gliócitos participam da regulação de nutrientes e da concentração de íons. Vale lembrar que os prolongamentos de certos gliócitos (células de Schwann) se enrolam em volta das fibras

nervosas e formam a bainha de mielina fora do SNC (dentro o SNC, tal função é feita por células da glia chamadas oligodendrócitos). Já outros, possuem a função de proteção contra agentes agressores, absorção de partes dos neurônios que sofrem degeneração e preparo para a regeneração de fibras nervosas em casos de lesões, representando o sistema imunitário presente no sistema nervoso (ARAQUE; NAVARRETE, 2010).

A neuroglia é dividida em dois grupos celulares de acordo com as dimensões dos corpos celulares: macroglia e microglia, sendo o primeiro composto pelos oligodendrócitos, NG2 (células recém-descobertas, com uma nomenclatura ainda não consolidada) e os astrócitos, objetos do presente estudo. A macroglia tem origem embrionária comum ao neurônio, ou neuroectodérmica. A microglia, por sua vez, é formada por um conjunto homogêneo de células de origem mesodérmica, sendo representada pelos microgliócitos e apresentando como função a resposta imunitária (fagocitose e apresentação de antígenos). Os oligodendrócitos têm função de mielinização durante o desenvolvimento, regeneração axônica e propagação do impulso nervoso em alta velocidade. As células NG2 funcionam como células-tronco durante o desenvolvimento e controlam o brotamento axônico nos nodos de Ranvier (LENT, 2002). Já os astrócitos, apresentam um número maior de funções, conforme demonstra a Quadro 1, apresentada a seguir.

Quadro 1 – Funções dos diferentes tipos celulares gliais

Tipo	Celular	Funções
Macroglia	Astrócitos	Hiperemia funcional (regulação neurodependente do fluxo sanguíneo local)
		Formação e manutenção da barreira hematoencefálica
		Célula-tronco durante e após o desenvolvimento
		Orientação do crescimento axônico durante o desenvolvimento
		Promoção de sinaptogênese durante e após o desenvolvimento
		Migração radial de neurônio durante o desenvolvimento
Microglia	Microgliócito	Modulação da transmissão sináptica (comunicação glioneuronal bidirecional)
		Recaptação de glutamato, proteção antiexcitotóxica
		Proliferação (gliose) reativa
		Mobilização de outros gliócitos durante inflamação e/ou trauma
		Sincronização neuronal via junções comunicantes
Glia Periférica	Célula de Schwann	Modulação da secreção de hormônios pela neuro-hipófise
		Mielinização durante o desenvolvimento
		Regeneração axônica
Macroglia	Oligodendrócito	Propagação do impulso nervoso em alta velocidade
		Regeneração axônica
Macroglia	Célula NG2	Células-tronco durante o desenvolvimento
		Controle do brotamento axônico nos nodos de Ranvier

Fonte: Baseado em LENT, R. (2002), pp 100.

2.2 Os astrócitos e suas funções

Os astrócitos recebem este nome devido à forma semelhante a uma estrela. São, em particular, as células da glia mais numerosas no SNC de mamíferos, em uma proporção de 10:1 em relação aos neurônios (BONDAN et al., 2003). Possuem numerosos prolongamentos que se ramificam e formam uma densa arborização. Tais prolongamentos ocupam o espaço entre os neurônios, envolvem os nodos de Ranvier e as sinapses, envelopam os capilares sanguíneos e revestem a parede interna dos ventrículos e das meninges. Os astrócitos são conhecidos por desempenharem relevantes papéis em diversos processos do desenvolvimento e da fisiologia do SNC. Eles modulam a secreção de hormônios pela neuro-hipófise, mobilizam as outras células da glia durante um período de inflamação ou de um trauma, recapturam o glutamato como forma de proteção antiexcitotóxica, modulam a transmissão sináptica por meio de uma comunicação glioneural bidirecional, participam da proliferação reativa e da sincronização neural por meio de *gap junctions* (junções comunicantes), atuam na formação e a manutenção da barreira hematoencefálica, assim como na sobrevivência neuronal e na diferenciação, na orientação neuronal e na sinaptogênese (ARAQUE; NAVARRETE, 2010).

Além de sua ampla rede de funções, os astrócitos expressam uma proteína exclusiva, a *Glial Fibrillary Acidic Protein* (GFAP), que se caracteriza como a principal proteína do citoesqueleto após o nascimento (BONDAN et al., 2003). Estudos mostram que a expressão de GFAP, assim como a morfologia e o crescimento de astrócitos podem ser alterados em resposta a determinadas condições. Como o GFAP compõe o citoesqueleto astrocítico, alterações na sua expressão normalmente indicam retração ou expansão dos processos celulares, com implicações diretas sobre o microambiente sináptico.

2.3 A importância dos astrócitos na rede neurônio-glia: a sinapse tripartite

Um conceito emergente é o de que astrócitos constituam o terceiro elemento em uma sinapse, em adição aos já estudados terminais neuronais pré- e pós-sinápticos. Desta forma, acredita-se que a neuroglia participe do processamento de informações complexas, em abandono à hipótese de que os astrócitos sejam somente elementos passivos e de suporte estrutural (PEREA; NAVARRETE; ARAQUE, 2009; ARAQUE; NAVARRETE, 2010).

Diferentemente dos neurônios, os astrócitos não geram potenciais de ação e sim correntes intracelulares de cálcio (Ca^{2+}), as quais possuem grande capacidade de sinalização. Em suma, a sinalização celular de astrócitos baseia-se na variação de concentração Ca^{2+} no citosol e não por mudanças no potencial elétrico transmembrana. Tais correntes surgem espontaneamente ou são provocadas por alguma alteração da atividade neural, espalhando-se por todo o citoplasma astrocítico e induzindo a liberação de gliotransmissores como a taurina (GRIMALDI; FAVIT; ALKON, 1999; ARAQUE; NAVARRETE, 2010).

2.4 Os astrócitos e o glutamato

Além de participar de vias metabólicas intracelulares, o glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do SNC. Os neurônios dos núcleos paraventricular (NPV) e supraóptico (NSO) do hipotálamo, envolvidos na produção de hormônios que controlam a excreção renal de água e eletrólitos, recebem uma densa inervação glutamatérgica, que corresponde a aproximadamente um quarto do total de contatos sinápticos estabelecidos por estes neurônios (VAN DEN POL; WUARIN; DUDEK, 1990).

Sabe-se que o glutamato é liberado a partir dos terminais pré-sinápticos e, após absorção pelo astrócito, sobre metabolização através de duas vias: 1) aminação à glutamina pela enzima glutamina sintetase (GS, específica em células gliais e dependente de ATP); ou 2) conversão a α -cetoglutarato através da desaminação por glutamato desidrogenase ou por transaminação de uma das transaminases. Dessa forma, a conversão de glutamato em glutamina pela GS constitui um dos principais processos de armazenamento intracelular de glutamato, ocorrendo principalmente em astrócitos. Uma vez formada no astrócito, a glutamina pode se difundir para o espaço extracelular, ser recaptada pelos neurônios e novamente convertida a glutamato pelo processo inverso, mediado pela glutaminase. As principais funções deste processo, chamado de ciclo glutamato-glutamina, são limitar o tempo de ação do glutamato liberado para a fenda sináptica e redirecionar o glutamato para vias metabólicas intracelulares. Já foi demonstrado que alterações de volume induzidas nos astrócitos alteram o ciclo glutamato-glutamina nestas células, mais uma vez sugerindo que a

osmolalidade do LEC afeta diretamente a função astrocítica (DANBOLT, 2001; HYZINSKI-GARCIA et al, 2011; HAYASHI, 2018).

Os astrócitos contêm dois principais transportadores de glutamato, o GLAST (*Glutamate Aspartate Transporter*) e o GLT-1 (*Glutamate Transporter type 1*), que desempenham um papel fundamental no *clearance* extracelular deste neurotransmissor na fenda sináptica em condições fisiológicas e também patológicas. Estudos de Boudaba e colaboradores (2003) realizados a partir de fatias do NSO de ratos submetidos à privação hídrica (desenvolvendo uma desidratação crônica) demonstraram uma diminuição na expressão de GLT-1 astrogliais nestes animais, culminando em um aumento nos níveis extracelulares de glutamato. Essas evidências sugerem que os transportadores de glutamato astrogliais possam estar envolvidos no controle da ativação neuronal induzida pela hiperosmolalidade. Além disso, estes transportadores estão envolvidos na prevenção da morte neuronal excitotóxica, um processo associado com a maioria das doenças neurodegenerativas (KARKI et al., 2014).

2.5 Possíveis mecanismos relacionados à transdução do sinal osmótico em astrócitos

2.5.1 Canais de cálcio tipo-L (LTCCs)

A entrada de Ca^{2+} nos astrócitos é regulada por canais operados por tensão (VOCCs – sigla para *voltage-operated Ca^{2+} channels*), que estão presentes na membrana plasmática. Os VOCCs são a principal rota para o fornecimento de Ca^{2+} ao citoplasma da maioria das células excitáveis e também em astrócitos, que não são células capazes de gerar potenciais de ação (CHELI et al., 2016).

Os VOCCs são divididos em dois grupos: os canais operados por alta tensão (L, P/Q, R e N) e os canais ativados por baixa tensão (tipo T) (AKOPIAN et al, 1996; MACVICAR, 1984; OH, 1997; PURO et al., 1996). Os canais de Ca^{2+} tipo-L (LTCCs – sigla para *L-type calcium channels*) são expressos em células da glia, mais especificamente nos astrócitos. O aumento de sua atividade está relacionado ao aumento de marcadores de patologias

características do envelhecimento, como, por exemplo, a Doença de Alzheimer (DASCHIL et al., 2015).

Os LTCCs são compostos por uma subunidade α_1 ($Ca_v1.1$, $Ca_v1.2$, $Ca_v1.3$ ou $Ca_v1.4$) e subunidades acessórias $\alpha_2\delta$ e β (ARIKKATH; CAMPBELL, 2003; CATTERALL, 2000; STRIESSNIG et al., 2006). As subunidades α_1 formam o poro do canal e contêm o sensor de tensão, além de exibirem sítios para ação farmacológica. Já as subunidades acessórias regulam a expressão na membrana e as propriedades de abertura/fechamento destes canais (STEPHENS; MOCHIDA, 2013). Em neurônios, tais canais constituem um mecanismo importante para a entrada de Ca^{2+} e para outras funções celulares relacionadas à transcrição de genes, excitabilidade e plasticidade sináptica (GREEN; SMITH; LAFERLA, 2007; SANTOS; PIERROT; OCTAVE, 2010).

Em experimentos realizados por Daschil e colaboradores (2015), com a finalidade de se elucidar aspectos da Doença de Alzheimer, o uso de inibidores de canais de cálcio tipo-L (nimodipina, nicardipina, nifedipina e isradipina, individualmente) a uma concentração de 10 μ M, determinou aumento da angiogênese em fatias cerebrais provenientes de ratos com 12 semanas de vida.

Já os estudos de Cheli e colaboradores (2016) mostram que os LTCCs, mais especificamente os formados pela subunidade $Ca_v1.2$, uma vez inibidos, previnem a proliferação e/ou ativação de astrócitos. Este mesmo estudo, ainda, demonstrou que inibidores de VOCCs tipo-L (verapamil e nifedipina, ambos em uma concentração de 5 μ M) reduzem drasticamente o número de astrócitos ativados *in vitro*, bem como sua hipertrofia e proliferação (astrogliose) em resposta a uma série de fatores, tais como lipopolissacarídeo, aumento extracelular de potássio (K^+) e de glutamato. Novamente, apesar do claro envolvimento dos LTCCs na função astrocítica em geral, nenhum estudo demonstrou a participação destes canais na sinalização osmótica.

2.5.2 Receptor de Potencial Transitório Vaniloide 1 (TRPV1)

A superfamília de canais iônicos receptores de potencial transitório (TRP, sigla de *transient receptor potential*) possui uma subfamília vaniloide (TRPV), conhecida desde 1997 após a descoberta do receptor ligante de capsaicina, o TRPV1 (LIEDTKE, 2006).

Estudos já investigaram o envolvimento do gene *trpv1* na transdução do sinal osmótico em neurônios do OVLT. Mediante a estimulação hipertônica a partir da adição de manitol no meio extracelular, neurônios provenientes de camundongos do tipo selvagem mostraram aumentos reversíveis na taxa de disparos. Por outro lado, nos neurônios obtidos de animais *knockout* para TRPV1, tais respostas não foram observadas (CIURA; BOURQUE, 2006). Esses dados indicam que os neurônios do OVLT apresentam uma capacidade osmossensível intrínseca, sendo a presença do gene *trpv1* essencial para a transdução do sinal osmótico. Este mesmo trabalho mostrou que, ao contrário da clara função exercida pelo canal TRPV1, o canal TRPV4 não é essencial à função de transdução osmótica nos neurônios do OVLT.

Um estudo de Huang e colaboradores (2010) confirmou por *Western Blotting* e imunofluorescência a expressão de canais TRPV1 em astrócitos cultivados *in situ*, utilizando com sucesso o fármaco Capsazepina para bloquear a atividade do canal em questão. De acordo com artigo publicado por Nam e colaboradores (2015), a ativação dos canais TRPV1 astrocíticos levam à ativação de um sistema neuroprotetor endógeno *in vivo*, o qual foi considerado um novo alvo terapêutico para a doença de Parkinson, visto que tal receptor é altamente expresso nos neurônios sensoriais, estando, assim, envolvido na percepção da dor (GUNTORPE; SZALLASI, 2008; GULER et al., 2012). Porém, o envolvimento do TRPV1 astroglial na mediação das respostas ao desafio osmótico ainda não foi determinado.

2.5.3 Canais catiônicos inativados por estiramento (SIC)

De acordo com Oliet e Bourque (1994), canais iônicos cuja probabilidade de abertura possa ser alterada por mudanças na tensão da membrana representam candidatos ideais como mecanotransdutores moleculares. Tais alterações podem estar relacionadas com a pressão da pipeta utilizada no experimento ou com a osmolalidade. Dessa forma, canais ativados por estiramento (*stretch-activated channels* - SAC) são definidos como aqueles em que a

probabilidade de entrada do íon aumenta como uma função positiva do tracionamento da membrana. Já os canais catiônicos inativados por estiramento (*stretch-inactivated cationic channels* – SIC), encontrados nas células neurosecretoras magnocelulares (*magnocellular neurosecretory cells* - MNCs), apresentam inibição da atividade conforme aumento ou diminuição na pressão da pipeta (OLIET; BOURQUE, 1996; BOURQUE; OLIET, 1997). Um diagrama representativo dos efeitos da osmolalidade sobre a dinâmica de abertura e fechamento dos canais SIC é mostrado na Figura 2.

Experimentos que avaliaram a permeação de íons através de canais SIC demonstraram que o cátion de lantanídeo trivalente (Gadolínio, Gd^{3+}), diminui a duração da abertura de canais individuais. Em relação às respostas de correntes macroscópicas para estimulação osmótica, quanto maior a concentração de Gd^{3+} (μM) maior a inibição provocada, apresentando inibição significativa a partir de 10 μM (25% de inibição) até 1000 μM (100% de inibição), e uma inibição de 50% reversível a uma concentração de aproximadamente 30 μM (OLIET; BOURQUE, 1996).

No que diz respeito à transdução do sinal osmótico em neurônios, respostas despolarizantes e provocadas por estímulos hipertônicos são bastante atenuadas pela presença de Gd^{3+} no meio extracelular. A uma concentração de 100 μM , o Gd^{3+} diminuiu a probabilidade de abertura para menos de 25% dos valores observados na situação basal (OLIET; BOURQUE, 1996). Estudos também reportaram que aumentos na condutância de membrana induzidos pela hiperosmolalidade podem ser revertidos pela aplicação de Gd^{3+} em uma concentração de 300 μM (CIURA; BOURQUE, 2006). Porém, novamente, a exemplo do descrito para outros canais iônicos, inexistem na literatura relatos sobre a participação desta via na transdução do sinal osmótico em astrócitos.

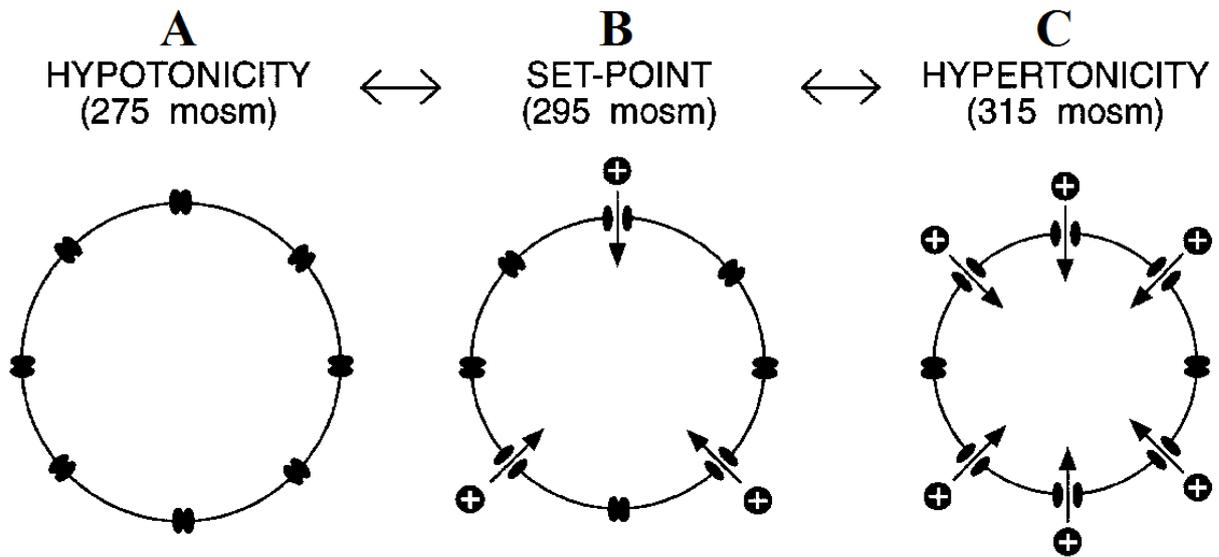


Figura 2 - Desenho representativo do controle da abertura/fechamento dos SIC pela osmolalidade. (A) Estimulação Hipotônica: provoca aumento do volume celular, inibe atividade do canal e hiperpolariza a membrana. (B) Condição osmótica basal. (C) Estimulação Hipertônica: provoca redução do tamanho celular, há ativação de um número maior de canais resultando em um influxo maior de carga e consequente despolarização da membrana.

Fonte: adaptado de BOURQUE; OLIET, 1997.

3 JUSTIFICATIVA

Estudos anteriores realizados em nosso laboratório demonstraram que os astrócitos reduzem significativamente a expressão de GFAP (área celular) e a expressão do transportador de glutamato GLAST em resposta à hiperosmolalidade do LEC. Esses resultados indicam que a transdução do sinal osmótico em astrócitos não é um mero evento passivo, mas sim um estímulo capaz de induzir respostas específicas e com alto impacto na sinalização adjacente, uma vez que a redução da cobertura neuronal pelos astrócitos e a diminuição da captação de glutamato podem resultar em aumento da sinalização em determinadas sinapses. Assim, considerando o conhecido envolvimento de alguns canais iônicos na transdução do sinal osmótico em neurônios (TRPV1 e SIC), bem como a existência de canais especificamente relacionados com a função geral dos astrócitos (LTCC), pretendemos elucidar a participação destas vias na transdução do sinal osmótico nestas células. Para tanto, submetemos astrócitos hipotalâmicos a tratamentos com bloqueadores de canais iônicos, seguidos por mudanças na osmolalidade do meio de incubação. Avaliamos nestas células a viabilidade celular, a expressão de GFAP (uma medida indireta das adaptações morfológicas) e a captação de aspartato (uma medida funcional destes efeitos sobre o ciclo de glutamato, o principal neurotransmissor excitatório do SNC).

4 OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS

O presente trabalho pretendeu investigar a participação de canais iônicos na transdução do sinal osmótico em astrócitos hipotalâmicos em cultura.

Especificamente, pretendeu-se avaliar, em astrócitos hipotalâmicos cultivados em condições basais e em condições de aumento das concentrações extracelulares de sódio, na presença ou ausência de bloqueadores dos canais LTCC, TRPV1 e SIC:

- a) a viabilidade celular;
- b) a expressão de GFAP;
- c) a captação de aspartato triciado.

5 METODOLOGIA

5.1 Animais

Para a realização dos experimentos, foram utilizados 41 ratos Wistar, machos, neonatos, nascidos a partir de matrizes obtidas do Biotério da Universidade Federal de Alfenas-MG. Entre dois e quatro dias após o nascimento, os filhotes foram separados e submetidos ao procedimento para remoção do hipotálamo médio basal (HMB). Para tanto, eles foram rapidamente eutanasiados por decapitação e o HMB foi dissecado e mantido em meio livre de Ca^{2+} até o momento do processamento, descrito a seguir.

Todos os procedimentos foram realizados no período compreendido entre 7h00 e 12h00 e conduzidos em acordo ao “*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*” (NIH Publicação Nº 85-23, revisado 1996) e aos princípios éticos da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL; acessado de <<http://www.cobea.org.br>> em 26/11/2013). Todos os protocolos foram submetidos à avaliação em Comitê de Ética em Pesquisa Animal (Processo nº 585/2014, Anexo).

5.2 Cultura Primária de astrócitos hipotalâmicos

A cultura primária de astrócitos foi realizada a partir do HMB fresco coletado de ratos neonatos (2 a 4 dias de vida), utilizando-se como limites anatômicos o quiasma óptico (anteriormente), os corpos mamilares (posteriormente), o “tuber cinereum” (lateramente) e o topo do terceiro ventrículo (verticalmente). As amostras de tecido foram então dissociadas com tripsina 0,05% e as células foram cultivadas em solução de DMEM (Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium – High Glucose, Sigma[®], código D5648) contendo soro fetal bovino (10%) e 1% de solução de penicilina (10,000 IU/ml)-streptomicina (10,000 µg/ml) (PS; Mediatech) por um período de 7 a 15 dias (Figura 3). Em seguida, as células foram submetidas à agitação (200 rpm) por um período de 2h a 37°C, a fim de separar os

oligodendrócitos, neurônios e microglia dos astrócitos. As células em suspensão foram desprezadas e as células aderidas ao frasco (astrócitos) foram novamente tripsinizadas e cultivadas em placas de 12 poços (para posterior imunofluorescência, 1×10^4 células/poço) contendo lamínulas pré-tratadas com poli-D-lisina (Sigma[®]), em placas de 6 poços (para posterior captação de aspartato triciado, com 1×10^5 células/poço) ou em placa de 96 poços (para o ensaio de viabilidade celular, 1×10^4 células/poço). Os protocolos experimentais foram realizados quando a confluência do meio foi atingida, o que ocorreu em um período entre 3 e 4 dias após a tripsinização.

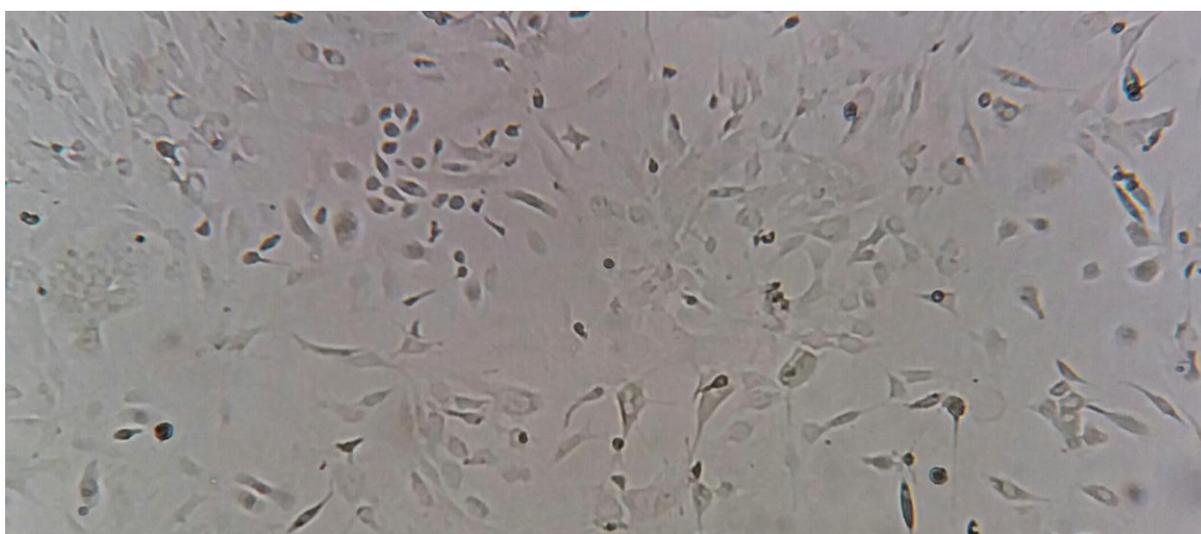


Figura 3 - Fotomicrografia representando cultura de células após crescimento por 7 dias, com confluência aproximada de 80%. As células menores e de formato arredondado representam células da microglia, enquanto que as células maiores e mais alongadas ou em formato estrelado representam astrócitos. Os neurônios costumam morrer naturalmente dentro de alguns dias porque precisam de meio enriquecido com outros fatores para sua sobrevivência. Aumento de 20x.

Fonte: da autora.

5.3 Pré-incubação

No dia do experimento, o meio de cultura convencional foi retirado e a cada poço foi adicionado um volume variável de solução de DMEM Base (300 mOsm/kg H₂O, 109 mM de NaCl, pH 7.4) contendo ou não os bloqueadores específicos dos canais iônicos. As doses utilizadas no presente estudo foram escolhidas com base no valor médio encontrado na

literatura para uso *in vitro* (CHELI et al., 2016; AGRAWAL et al., 2000; PIEROZAN et al., 2015; OLIET; BOURQUE, 1996; HUANG et al., 2010). O Verapamil, a Capsazepina e o Gadolínio foram utilizados, respectivamente, nas doses de 10 μM , 30 μM e 100 μM . Para tanto, foram preparadas soluções *stock* nas quais cada bloqueador foi diluído em álcool etílico absoluto. As placas de cultura foram, então, mantidas nas respectivas soluções a 37° C por 30 minutos, sendo em seguida submetidas à estimulação, descrita a seguir.

5.4 Incubação com DMEM Base ou DMEM Hipertônico

Após os 30 minutos de pré-incubação, o DMEM Base contendo ou não a droga bloqueadora foi mantido em alguns poços; nos demais poços, tal meio foi substituído por DMEM contendo aumento no teor de sódio (DMEM Hipertônico; 360 mOsm/kg H₂O, 132 mM de NaCl, pH 7.4) contendo os inibidores específicos, conforme grupos experimentais apresentados na Quadro 2. As placas de cultura foram, então, mantidas nestas soluções a 37° C por tempo dependente do protocolo experimental, conforme descrito a seguir:

Quadro 2 – Grupos experimentais

Grupos experimentais	Pré-incubação (30 min)	Incubação (30 min para captação de aspartato e 2h para demais protocolos)
1	DMEM Base	DMEM Base
2	DMEM Base	DMEM Base + bloqueador de canais iônicos
3	DMEM Base	DMEM Hipertônico
4	DMEM Base + bloqueador de canais iônicos	DMEM Hipertônico + bloqueador de canais iônicos

Fonte: da autora

5.5 Ensaio de viabilidade celular pelo método de MTT

Para se avaliar a viabilidade celular após a exposição aos diferentes tratamentos, os astrócitos hipotalâmicos foram cultivados em placa 96 poços (1×10^4 células/poço), conforme descrito anteriormente, e submetidos ao período de pré-incubação por 30 minutos e estimulação por 2h, uma vez que este é o maior tempo utilizado nos experimentos deste projeto (tempo necessário para induzir modificações na expressão proteica), o qual poderia, efetivamente, acusar danos na linhagem celular em questão. O presente ensaio foi baseado na metabolização do brometo de tetrazólio (MTT, 5mg/mL, Sigma[®]), realizada somente por células metabolicamente viáveis, as quais reduzem o MTT a sal de formazan, que é insolúvel e apresenta coloração roxa. Para que esta reação aconteça, é necessária a atividade de uma enzima mitocondrial (da cadeia respiratória). Assim, o formazan solubilizado em DMSO (Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo) pode ser quantificado espectrofotometricamente (540 nm) e possui correlação direta com o número de células viáveis. Para este ensaio, foi realizado um controle positivo para a morte celular (incubação pelo mesmo período de tempo com DMSO 50%, que tem função detergente sobre membranas lipídicas).

5.6 Imunofluorescência para GFAP

Os astrócitos crescidos sobre lamínulas pré-tratadas com poli-D-lisina e submetidos aos procedimentos de pré-incubação e estimulação descritos anteriormente, foram inicialmente fixados com metanol puro por 3 minutos. Em seguida, os poços foram incubados com Normal Donkey Serum 10% em PBS (0,01M, Triton 0,1%, NaN_3 0,04%) por 1 hora. Após esse período as células foram incubadas (*overnight*) com o anticorpo primário anti-GFAP (rabbit, 1:1.000, Cell Signaling Technology[®]). Após período de incubação com os anticorpos primários, as células foram lavadas (3x) em PBS (0,01M) e na sequência foi realizada a incubação com o anticorpo secundário Cy3 donkey anti-rabbit (1:250, Jackson ImmunoResearch[®]) por um período de 2 horas. Após incubação com os anticorpos secundários, as células foram lavadas (3x) com PBS (0,01M) e contracoradas com o marcador nuclear DAPI (*stock* 15 mM, 1:25000) por 2 minutos. Em seguida, as lamínulas contendo as células foram novamente lavadas e fixadas com meio de montagem (Fluormount[®]) sobre uma lâmina para visualização em microscópio e captura das imagens. As imagens foram

adquiridas com o mesmo nível de exposição em todos os grupos. A quantificação do sinal fluorescente foi realizada por meio do software Image J[®], delimitando-se como parâmetros os valores HSB encontrados em cada ensaio para a situação controle. Foram utilizadas escalas de 50 e 60 μm . Os resultados foram expressos em área celular (μm^2), normalizada pela situação basal (%).

5.7 Ensaio de captação de aspartato triciado (³H-triciado)

Após os 15 minutos iniciais do período de estimulação, um volume de 10 μL (0,1 μCi) de ³H-triciado (concentração final: 8,85 nM, 11,3 Ci / mmol, PerkinElmer[®]) foi adicionado a cada poço, permanecendo nos mesmos por 15 minutos adicionais (totalizando 30 minutos de estimulação). Após este período, 500 μL do meio foi recuperado em frascos contendo 2 mL de fluido de cintilação (ScintSafe Econo, Fisher Scientific[®]). As células aderidas foram lisadas com 2 mL de água deionizada a 4°C (durante 2 min) e 500 μL foram recolhidos em frascos contendo líquido de cintilação na mesma proporção. Devido à adsorção do aspartato às superfícies plásticas, a leitura do sinal radioativo de um poço vazio (sem células) foi considerada para subtração do valor obtido para cada amostra. As amostras do meio de incubação e do lisado celular foram submetidas a contagem de radiação β (TriCarb 2900TR, PerkinElmer[®]). Os resultados foram expressos como a porcentagem em relação à situação controle (DMEM base sem adição de fármacos).

O procedimento em questão foi feito no Laboratório de Neuroendocrinologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP (FMRP-USP), o qual possui local apropriado com licença para uso e manuseio de componentes radioativos (CNEN-12767/AP-0155).

5.8 Análise Estatística

Os resultados foram expressos em médias \pm erro padrão da média (EPM). A análise foi realizada por meio do teste de variância (ANOVA) de uma via (para o protocolo experimental

para MTT) ou de duas vias, para os demais protocolos experimentais, seguido do pós-teste de Sidak. Utilizou-se como variáveis a tonicidade do meio e o tratamento farmacológico, e o nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$).

6 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

Abaixo se encontram sumarizadas as linhas temporais dos procedimentos executados em cada um dos protocolos experimentais.

6.1 Efeitos do bloqueio de canais iônicos específicos e da hiperosmolalidade sobre a viabilidade de astrócitos hipotalâmicos

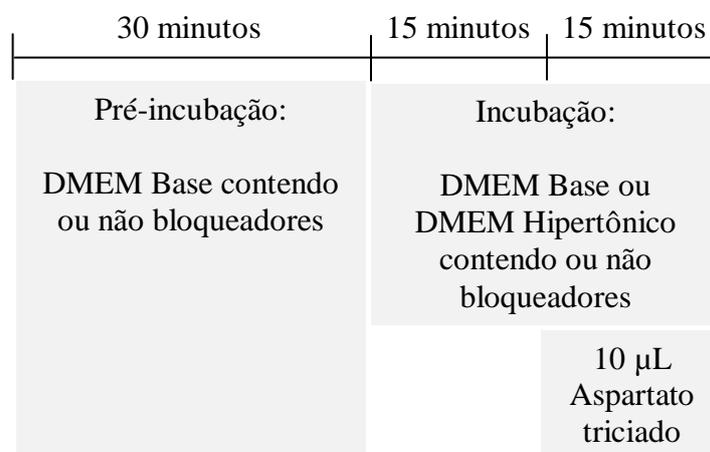
30 minutos	2 horas	4 horas	30 minutos
Pré-incubação: DMEM Base contendo ou não bloqueadores	Incubação: DMEM Base ou DMEM Hipertônico contendo ou não bloqueadores	Incubação: MTT (5 mg/mL)	Solubilização: DMSO

6.2 Efeitos do bloqueio de canais iônicos específicos e da hiperosmolalidade sobre a expressão de GFAP em astrócitos hipotalâmicos

30 minutos	2 horas
Pré-incubação: DMEM Base contendo ou não bloqueadores	Incubação: DMEM Base ou DMEM Hipertônico contendo ou não bloqueadores

6.3 Efeitos do bloqueio de canais iônicos específicos sobre a captação de aspartato triciado

Os experimentos referentes a este protocolo experimental foram realizados no Laboratório de Neuroendocrinologia da FMRP (USP – Ribeirão Preto), com o qual a supervisora deste trabalho mantém colaboração de pesquisa.



7 RESULTADOS

7.1 Viabilidade celular

O ensaio de MTT é um protocolo bastante utilizado para a análise da viabilidade celular. A Figura 4 mostra os efeitos da incubação com os diferentes tratamentos sobre o número de células viáveis, normalizado pela situação controle (DMEM base). Como pode ser observado, houve uma redução significativa da viabilidade no grupo incubado com DMSO 50% quando comparado ao grupo controle (DMEM Base) ($100 \pm 3,9$ versus $12,3 \pm 0,3$ %, $p < 0,001$). Um aumento significativo na viabilidade celular foi observado em ambos os grupos tratados com Capsazepina na comparação com o controle (Capsazepina: $100 \pm 3,9$ versus $137,2 \pm 3,5$ %, $p < 0,001$; Capsazepina + DMEM Hipertônico: $100 \pm 3,9$ versus $127,2 \pm 3$ %, $p < 0,001$). Não foram observadas alterações significativas na viabilidade celular em resposta aos demais tratamentos.

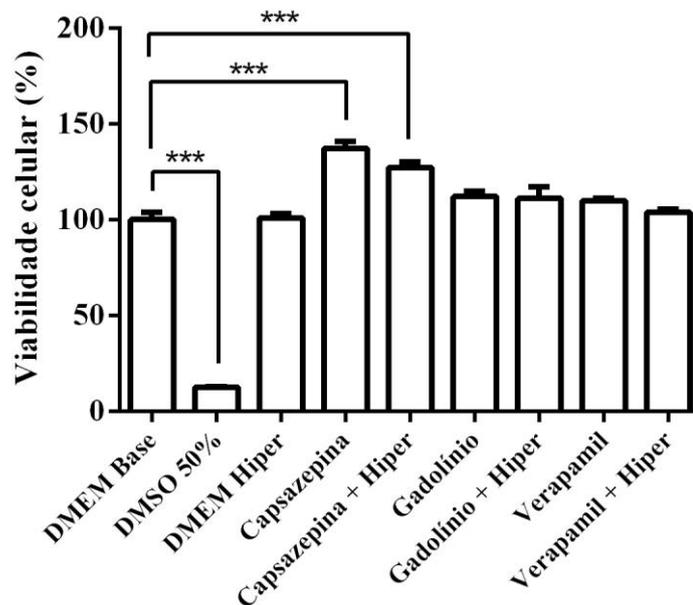


Figura 4 - Viabilidade celular avaliada pelo ensaio de MTT em resposta aos diferentes tratamentos. Resultados expressos em médias \pm erro padrão da média (EPM) e analisados por meio do teste de variância de uma via (ANOVA). *** $p < 0,001$. N = 5 a 10 poços por grupo experimental. Verapamil: 10 μ M. Capsazepina: 30 μ M. Gadolínio: 100 μ M. DMEM Base: 300 mOsm/kg H₂O, 109 mM de NaCl. DMEM Hipertônico: 360 mOsm/kg H₂O, 132 mM de NaCl.

Fonte: da autora.

7.2 Expressão de GFAP

Considerando que os astrócitos geram correntes intracelulares de Ca^{2+} como forma de sinalização, foi utilizado para nossos experimentos o fármaco Verapamil, que inibe os LTCCs, responsáveis por esta corrente iônica. A Figura 5 mostra que a incubação com o meio DMEM hipertônico reduziu significativamente a expressão de GFAP em astrócitos hipotalâmicos ($100,00 \pm 17,3$ versus $57,5 \pm 4,1$ %, $p < 0,05$). Um efeito semelhante de redução da expressão de GFAP foi observado em condições basais em resposta à incubação com Verapamil ($100,00 \pm 17,3$ versus $61,4 \pm 6,8$ %, $p < 0,001$). Não houve diferença estatística entre os grupos tratado e não tratado com Verapamil submetidos à incubação com DMEM hipertônico. Fotomicrografias representativas das diversas condições experimentais são apresentadas na Figura 6.

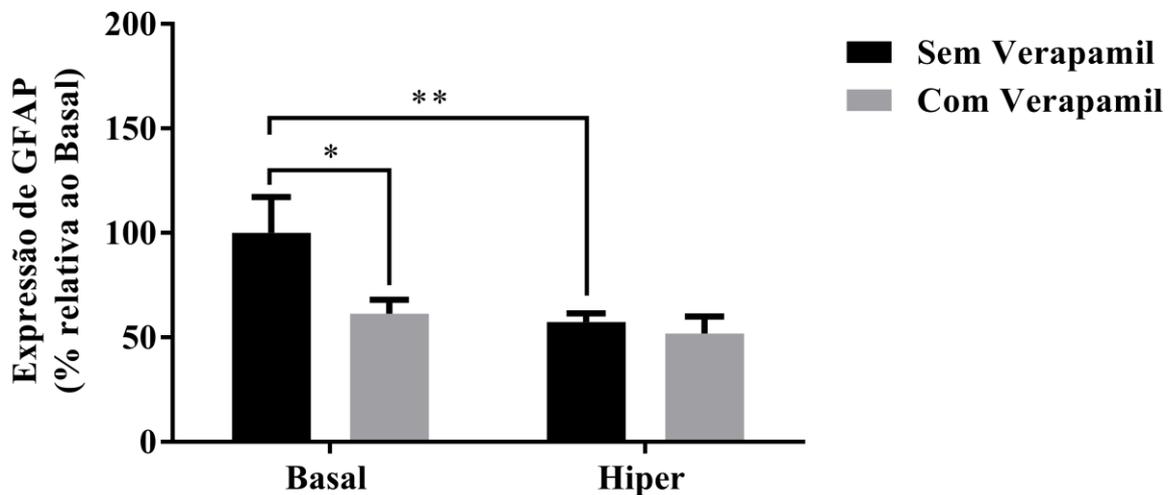


Figura 5 - Efeitos da incubação com meio hipertônico contendo ou não Verapamil (10 μM) sobre a expressão de GFAP em astrócitos hipotalâmicos. Resultados expressos em porcentagem relativa ao grupo Basal sem Verapamil, como médias \pm erro padrão da média (EPM) e analisados por meio do teste de variância de duas vias, com pós-teste de Sidak. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$. N = 16 a 36 células por grupo experimental.

Fonte: da autora.

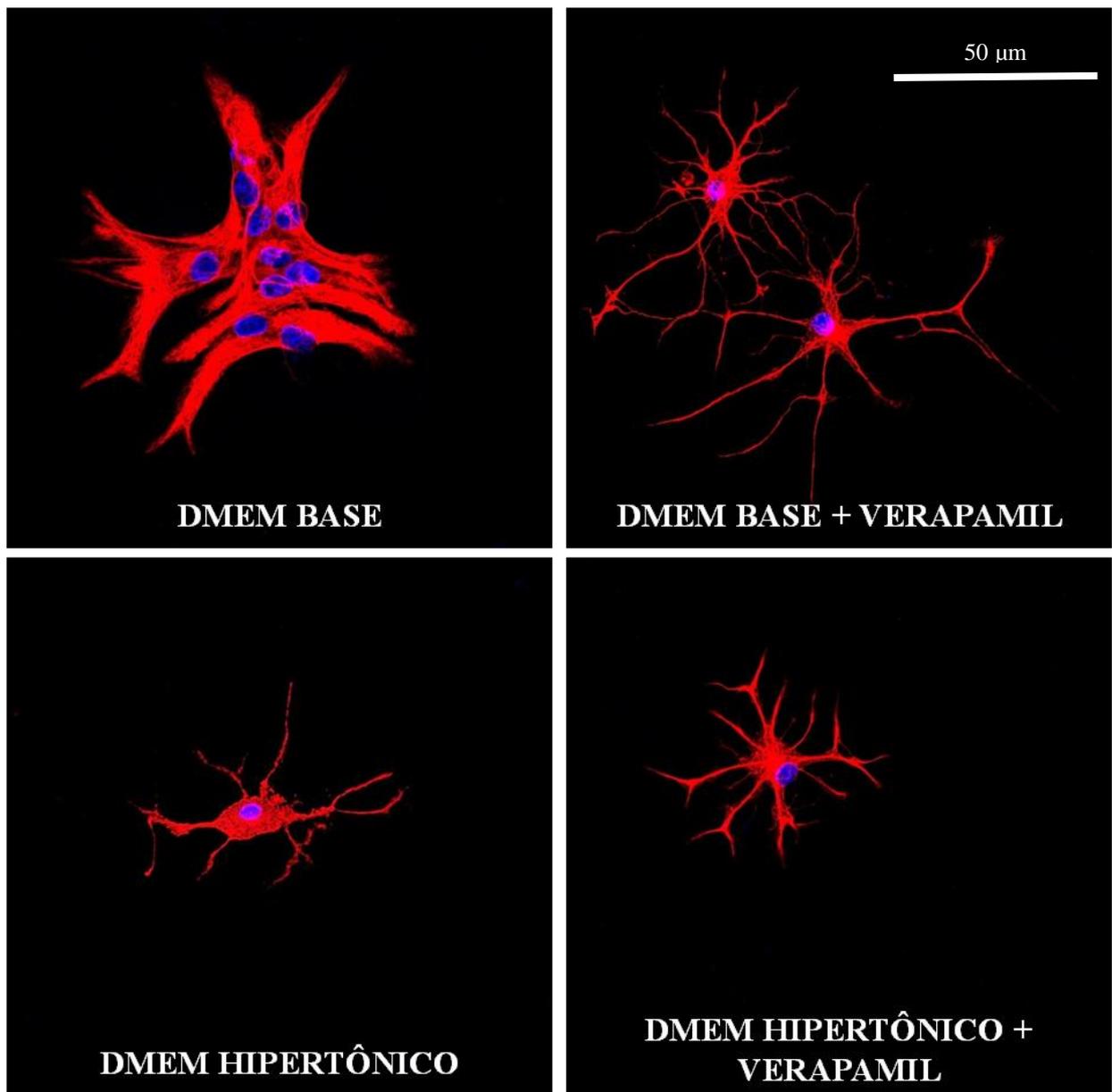


Figura 6 - Painel representativo das alterações na expressão de GFAP (1:1000, vermelho) nas diversas condições experimentais. Os núcleos foram contracolorados com DAPI (1:12500) As fotomicrografias foram obtidas em Microscópio Confocal Nikon C2 em aumento de 60x com óleo de imersão.

Fonte: da autora.

A Figura 7 mostra que a incubação com DMEM hipertônico reduziu significativamente a expressão de GFAP em astrócitos hipotalâmicos ($108,8 \pm 10$ versus $66,4 \pm 5,4$ %, $p < 0,05$), corroborando com os resultados obtidos no ensaio anterior. A Capsazepina é considerada um antagonista competitivo da Capsaicina, o principal ligante dos receptores-canalais TRPV1. A incubação com Capsazepina reverteu significativamente os efeitos do meio

hipertônico sobre a expressão de GFAP ($66,4 \pm 5,4$ versus $133 \pm 12,7$ %, $p < 0,001$). Não houve diferença estatística entre os grupos tratado e não tratado com Capsazepina em condições basais. Fotomicrografias representativas das diversas condições experimentais são apresentadas na Figura 8.

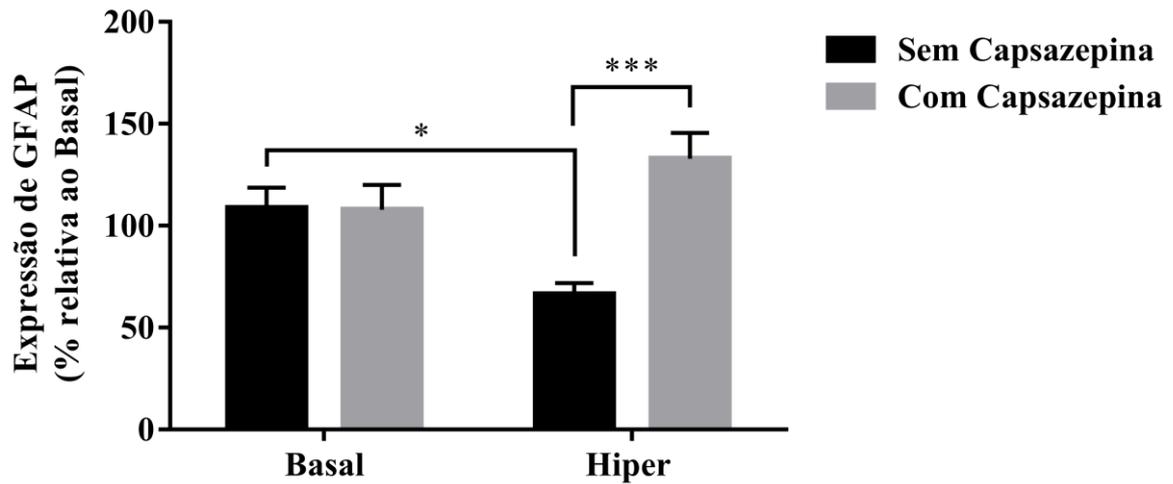


Figura 7 - Efeitos da incubação com meio hipertônico contendo ou não Capsazepina ($30 \mu\text{M}$) sobre a expressão de GFAP em astrócitos hipotalâmicos. Resultados expressos em porcentagem relativa ao grupo Basal sem Capsazepina, como médias \pm erro padrão da média (EPM) e analisados por meio do teste de variância de duas vias, com pós-teste de Sidak. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$. N = 10 a 22 células por grupo experimental.

Fonte: da autora.

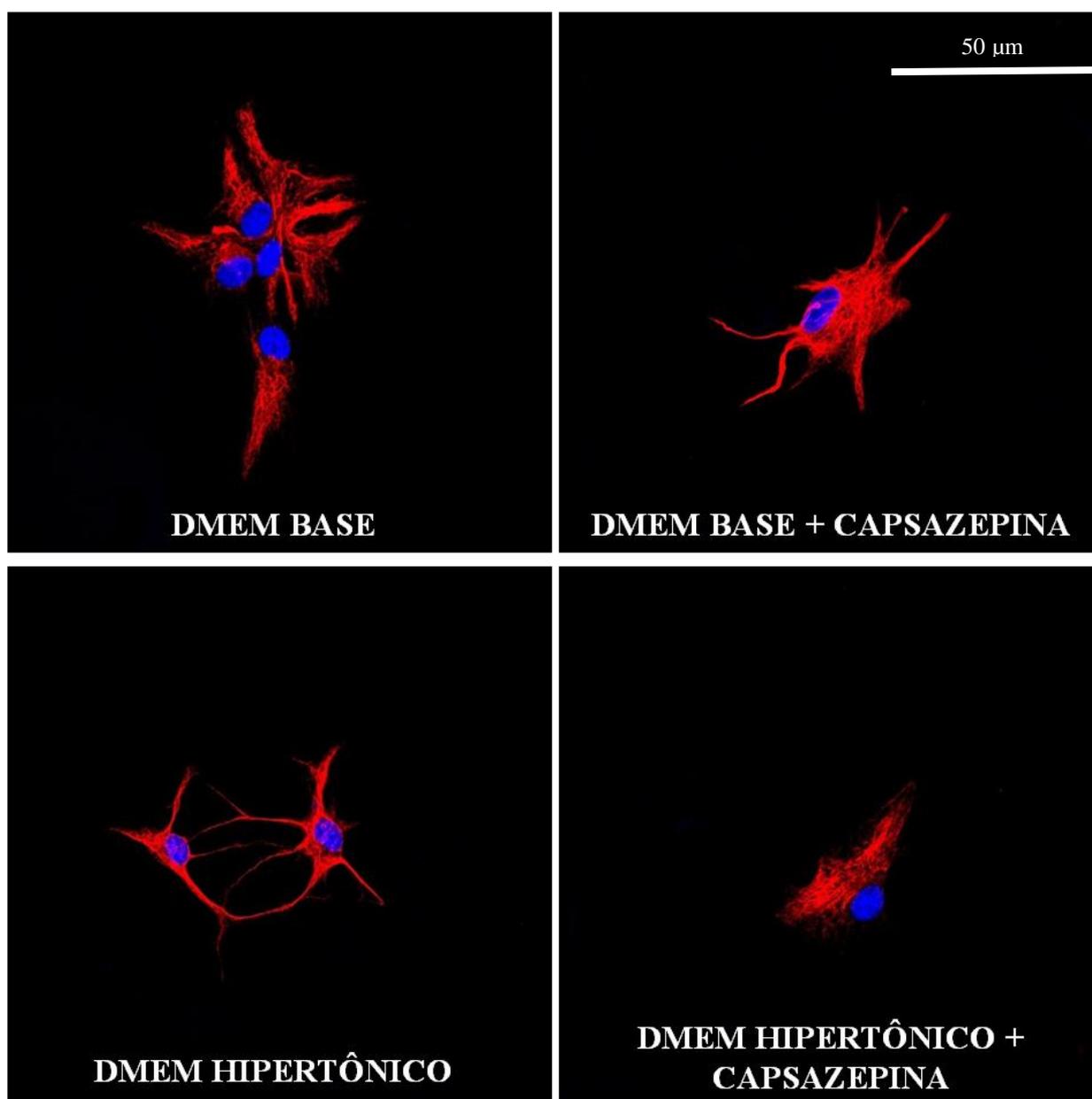


Figura 8 - Painel representativo das alterações na expressão de GFAP (1:1000, vermelho) nas diversas condições experimentais. Os núcleos foram contracolorados com DAPI (1:12500) As fotomicrografias foram obtidas em Microscópio Confocal Nikon C2 em aumento de 60x com óleo de imersão.

Fonte: da autora.

A análise quantitativa dos efeitos do Gadolínio, um bloqueador dos canais SIC, sobre a morfologia celular, apresentou resultados bastante peculiares. A Figura 9 mostra que a incubação com Gadolínio aumentou a expressão de GFAP em condições hipertônicas quando comparado com as condições basais ($65,4 \pm 6,0$ versus $503,5 \pm 96,5$ %, $p < 0,001$). Outro aumento significativo foi observado no grupo tratado com Gadolínio comparado ao grupo

não tratado, ambos submetidos à incubação com DMEM hipertônico ($61,3 \pm 4,8$ versus $503,5 \pm 96,5$ %, $p < 0,001$). Embora o gráfico aponte algumas outras tendências de efeito, o teste estatístico não apontou diferença entre os grupos tratado e não tratado com Gadolínio submetidos à incubação em condições basais, tampouco na comparação entre o grupo Basal e DMEM hipertônico.

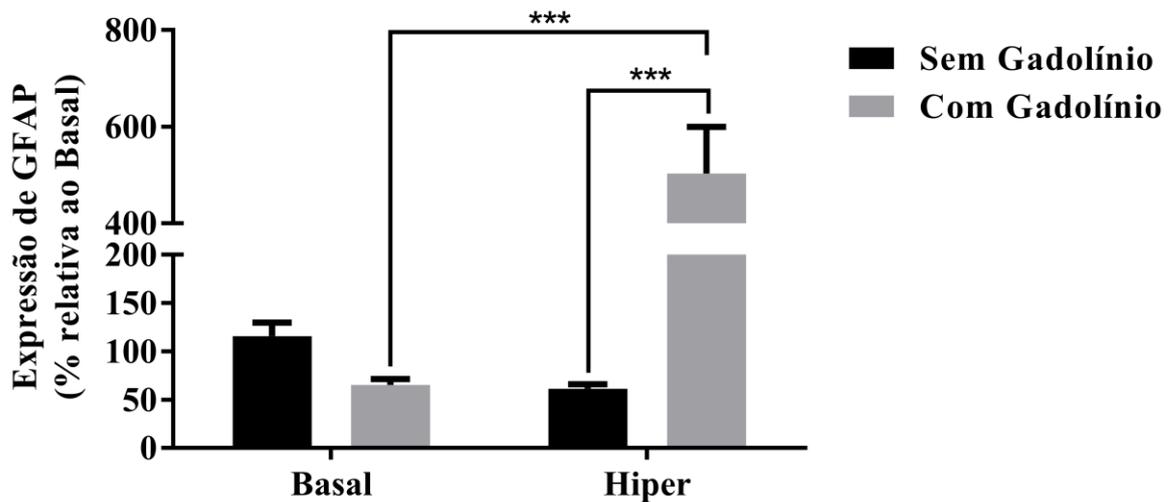


Figura 9 - Efeitos da incubação com meio hipertônico contendo ou não Gadolínio ($100 \mu\text{M}$) sobre a expressão de GFAP em astrócitos hipotalâmicos. Resultados expressos em porcentagem relativa ao grupo Basal sem Gadolínio, como médias \pm erro padrão da média (EPM) e analisados por meio do teste de variância de duas vias, com pós-teste de Sidak. *** $p < 0,001$. N = 6 a 15 células por grupo experimental.

Fonte: da autora.

Apesar de ser nítido, no gráfico apresentado pela Figura 9, o efeito da incubação com Gadolínio em reduzir a expressão de GFAP sob condições basais, este efeito só se torna estatisticamente relevante se analisarmos os dados utilizando o teste t, na comparação entre os grupos basal com e sem Gadolínio ($p < 0,01$), não sendo a diferença apontada pelo teste ANOVA de duas vias.

O mesmo acontece para a comparação entre os grupos basal e hipertônico sem tratamento. Como já foi demonstrado nos ensaios anteriores, é relevante o efeito do DMEM hipertônico em reduzir a expressão de GFAP, sendo, neste experimento, este efeito apenas evidente, também, realizando-se a comparação por teste t entre estes grupos ($p < 0,01$), diferença esta que novamente não é apontada pelo teste ANOVA de duas vias.

Como discutido adiante, o efeito aberrante observado sobre a expressão de GFAP no grupo Gadolínio + DMEM hipertônico pode ter mascarado estatisticamente efeitos de menor magnitude como as comparações destacadas acima, uma vez que o teste ANOVA de duas vias, mais apropriado para uso neste caso, considera a variância de todos os grupos.

As fotomicrografias representativas das diversas condições experimentais são apresentadas na Figura 10.

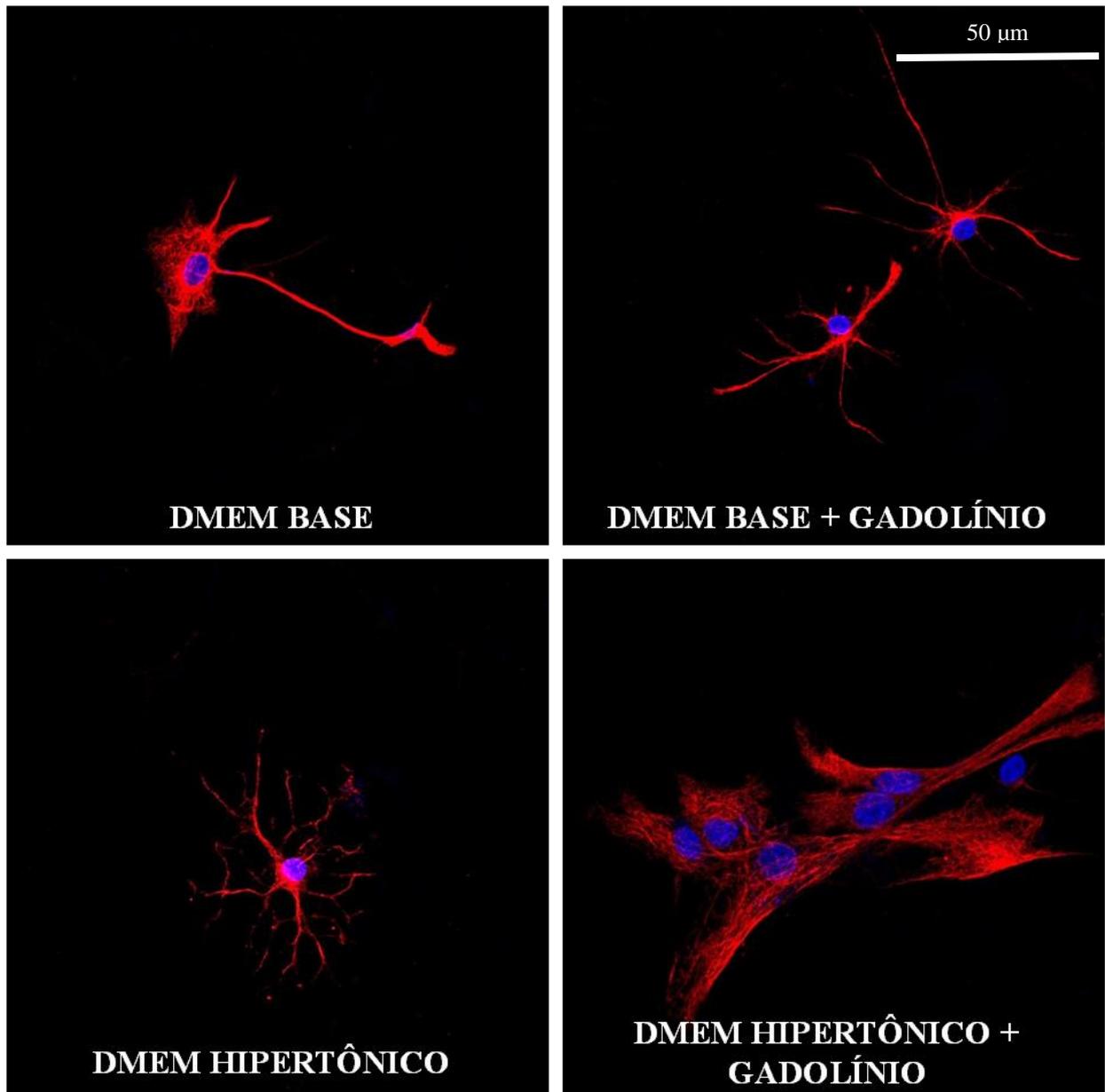


Figura 10 - Painel representativo das alterações na expressão de GFAP (1:1000, vermelho) nas diversas condições experimentais. Os núcleos foram contracolorados com DAPI (1:12500) As fotomicrografias foram obtidas em Microscópio Confocal Nikon C2 em aumento de 60x com óleo de imersão.
Fonte: da autora.

7.3 Captação de aspartato triado

Como já mencionado, a sinalização glutamatérgica tem uma grande importância nas sinapses estabelecidas no hipotálamo. Dessa forma, avaliamos o aspecto funcional da participação dos astrócitos neste processo, mensurando a atividade dos transportadores de glutamato astrocíticos nas diversas condições experimentais, por meio do monitoramento do transporte de aspartato marcado radioativamente.

A Figura 11, apresentada a seguir, mostra que a captação de ^3H -aspartato reduziu significativamente nos astrócitos incubados com DMEM hipertônico ($100,0 \pm 9,1$ versus $66,6 \pm 1,8$ %, $p < 0,01$). A pré-incubação com Verapamil não alterou a resposta de captação de ^3H -aspartato, seja em condições basais ou de hiperosmolalidade.

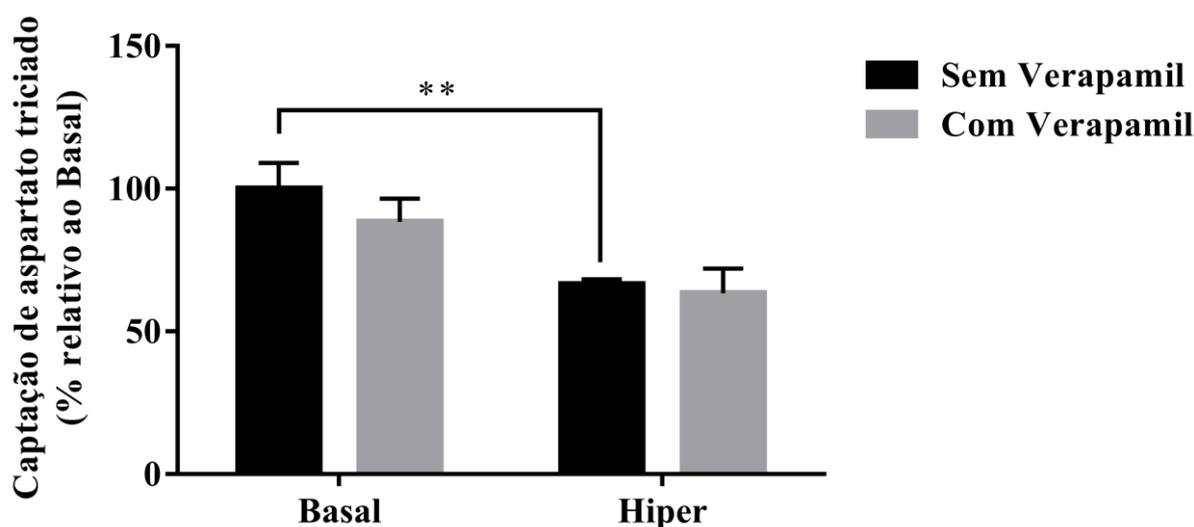


Figura 11 - Efeitos da incubação com meio DMEM hipertônico contendo ou não Verapamil ($10 \mu\text{M}$) sobre a captação de aspartato triciado em astrócitos hipotalâmicos. Resultados expressos em porcentagem relativa ao grupo Basal sem Verapamil, como médias \pm erro padrão da média (EPM) e analisados por meio do teste de variância de duas vias, com pós-teste de Sidak. $**p < 0,01$. $N = 5$ por grupo experimental.

Fonte: da autora.

A Figura 12, apresentada a seguir, mostra o mesmo tipo de avaliação para o ensaio usando Capsazepina, que atua sobre os receptores TRPV1. Como podemos observar, a resposta de redução do transporte de aspartato observada nos astrócitos submetidos à incubação com DMEM hipertônico não foi modificada pela incubação com Capsazepina ($100,0 \pm 8,0$ versus $73,1 \pm 5,0$ %, $p < 0,05$ para o grupo sem Capsazepina; $81,6 \pm 9,0$ versus $54,7 \pm 4,6$ %, $p < 0,05$ para o grupo com Capsazepina).

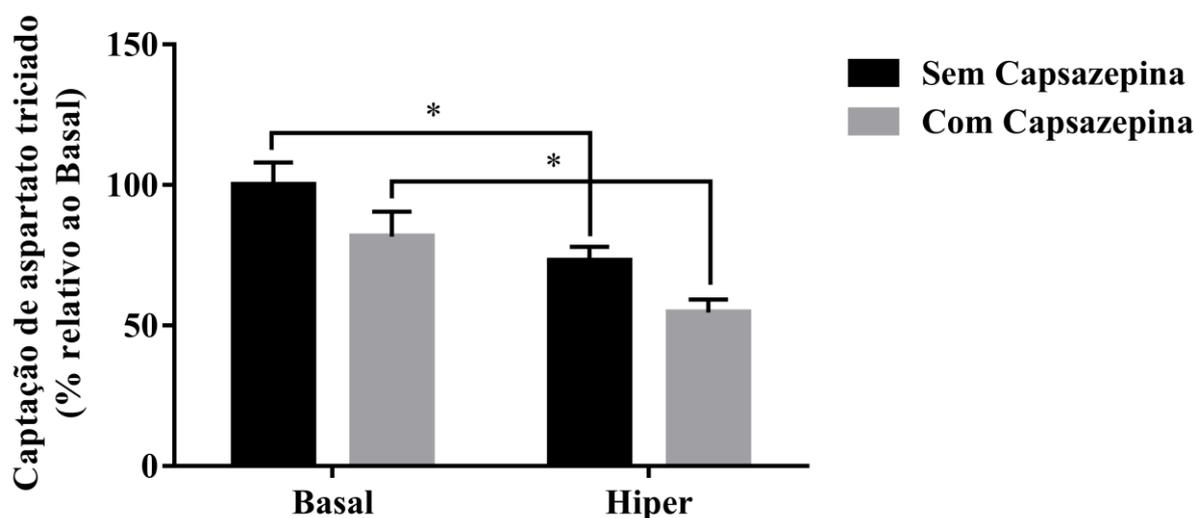


Figura 12 - Efeitos da incubação com meio DMEM hipertônico contendo ou não Capsazepina (30 μ M) sobre a captação de aspartato triciado em astrócitos hipotalâmicos. Resultados expressos em porcentagem relativa ao grupo Basal sem Capsazepina, como médias \pm erro padrão da média (EPM) e analisados por meio do teste de variância de duas vias, com pós-teste de Sidak. * $p < 0,05$. N = 5 por grupo experimental.

Fonte: da autora.

A Figura 13, apresentada a seguir, mostra, mais uma vez, o mesmo tipo de avaliação, agora para o ensaio usando Gadolínio, que atua sobre os receptores SIC. Como podemos observar, houve aumento significativo da captação de aspartato triciado no grupo DMEM hipertônico com Gadolínio, quando comparado com o grupo DMEM hipertônico sem Gadolínio (105,4 \pm 2,4 *versus* 93,3 \pm 1,8 %, $p < 0,05$). De forma inversa, pode-se observar redução significativa da captação de aspartato triciado no grupo DMEM hipertônico sem Gadolínio quando comparado ao DMEM basal sem Gadolínio (93,3 \pm 1,8 *versus* 101,8 \pm 2,3 %, $p < 0,05$). Não houve diferenças significativas entre os grupos DMEM basal sem Gadolínio *versus* DMEM basal com Gadolínio.

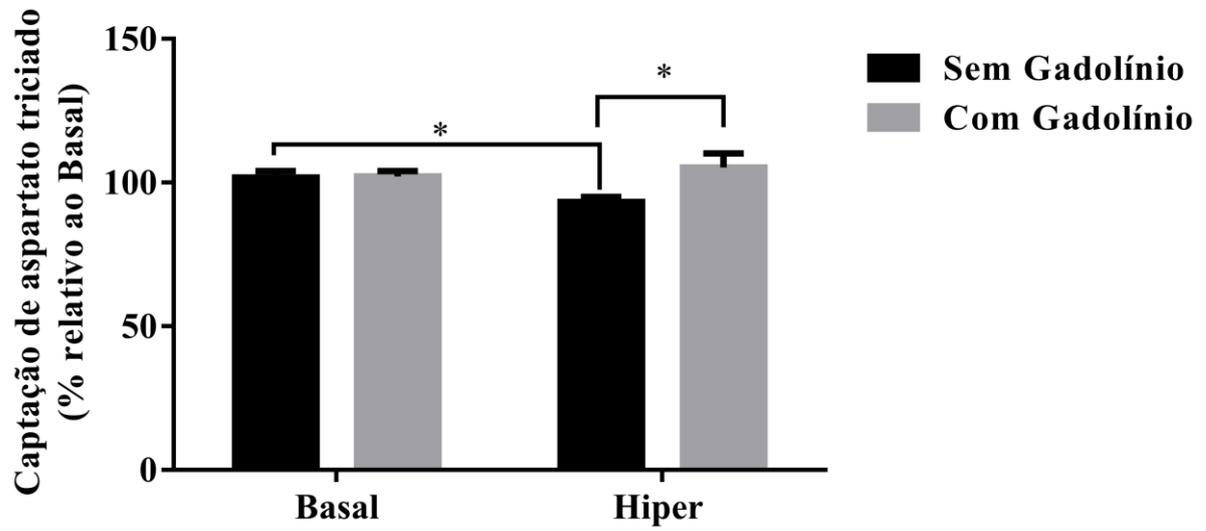


Figura 13 - Efeitos da incubação com meio DMEM hipertônico contendo ou não Gadolínio (100 μ M) sobre a captação de aspartato triciado em astrócitos hipotalâmicos. Resultados expressos em porcentagem relativa ao grupo Basal sem Gadolínio, como médias \pm erro padrão da média (EPM) e analisados por meio do teste de variância de duas vias, com pós-teste de Sidak. * $p < 0,05$. N = 3 a 4 por grupo experimental.

Fonte: da autora.

8 DISCUSSÃO

No SNC, os canais TRPV1, SIC e LTCC são expressos tanto em neurônios como astrócitos, participando da sinalização em condições fisiológicas e patológicas. Porém, conforme argumentado na parte introdutória deste trabalho, os estudos investigando a participação destes canais têm se concentrado em sua participação na função neuronal. Assim, o presente estudo teve como objetivo geral investigar a participação destes canais iônicos na transdução do sinal osmótico em astrócitos a partir da avaliação da viabilidade celular, avaliação indireta da morfologia celular por meio da análise da GFAP, bem como por meio da avaliação da dinâmica dos transportadores de glutamato astrocíticos (ensaio de captação de ^3H -aspartato).

Para tanto, utilizamos as principais ferramentas farmacológicas disponíveis na literatura para diminuir a atividade *in vitro* destes canais. A Capsazepina foi descrita no início da década de 90 como um antagonista competitivo da Capsaicina (DICKENSON; DRAY, 1991), ligando-se ao poro do canal TRPV1 e bloqueando seus quatro monômeros (HELLMICH; GAUDET, 2014). A Capsaicina (8-metil-N-vanilil-6-nonenamida), por sua vez, se trata de um composto presente em algumas variedades de pimenta, atuando em neurônios nociceptivos para abrir canais de cátions seletivos, permitindo a entrada de Na^+ e Ca^{2+} e a saída de K^+ . Estes efeitos resultam em uma corrente resultante de entrada que despolariza os neurônios (BEVAN et al., 1992). De acordo com Naziroğlu (2015), além da Capsazepina, a Resiniferatoxina também pode ser usada para diminuir a atividade dos canais TRPV1.

Já o Gadolínio se mostrou um bloqueador eficaz, não somente de SIC, mas também de determinados canais ativados por estiramento (SAC) (ELINDER; ÅRHEM, 1994). De acordo com Franco, Winegar e Lansman (1991), os SIC são permeáveis tanto para cátions monovalentes quanto por cátions divalentes. Desse modo, cátions de lantanídeos, tal como o Gadolínio, apresentavam-se úteis no estudo de sítios de ligação de Ca^{2+} , uma vez que possuem raios semelhantes e dinâmica similar de interação com o poro do canal. Os canais cujas atividades são modificadas por variações na tensão da membrana têm um papel bastante relevante na hiperosmolalidade, situação em que as células tendem a perder água para o meio extracelular.

Por sua vez, o antagonista de LTCCs (Verapamil), tem utilização muito ampla em casos de doenças cardiovasculares, sendo conhecido por diminuir taquicardia e fibrilação. Seu uso juntamente com o pinacidil, que promove a abertura de canais de K^+ sensíveis ao ATP, diminui a concentração extracelular de K^+ assim como o pH extracelular no quadro de isquemia aguda do miocárdio (WATANABE; GETTES, 2018). Além do mais, os LTCCs possuem papel importante na formação do potencial de ação cardíaco e na contração cardíaca, sendo o Verapamil utilizado para reduzir a frequência cardíaca (YONEKURA et al., 2018). Curiosamente, apesar de ser um canal tipicamente presente em células excitáveis, o LTCC constitui a principal via de sinalização iônica em astrócitos, células que não geram potenciais de ação. Porém, as chamadas “ondas de cálcio”, geradas a partir da abertura dos LTCCs astrocíticos, estão relacionadas a praticamente toda função intracelular nestas células.

8.1 Viabilidade celular

De maneira surpreendente, observamos em nosso ensaio de MTT um aumento significativo na viabilidade celular em resposta à incubação com Capsazepina, seja em condições basais ou juntamente com o DMEM hipertônico, como demonstrado na Figura 4. Por outro lado, não houve alteração na viabilidade celular nos poços tratados com as demais combinações entre as drogas Verapamil e Gadolínio, assim como no grupo experimental incubado com DMEM Hipertônico.

A primeira explicação plausível para tal resposta seria que, na verdade, a Capsazepina teria evitado em algum grau a morte celular, que é um processo natural quando se substituiu completamente o meio de incubação, como na transição das condições basais para os meios de pré-tratamento. Desse modo, apesar do ensaio de MTT ser uma técnica amplamente utilizada para avaliar a viabilidade celular assim como a toxicidade a determinadas substâncias, Stepanenko e Dmitrenko (2015) mostraram que a metabolização do MTT pode ser afetada por diversas condições, tais como endocitose/exocitose e alterações metabólicas, energéticas e na atividade de oxirredutases, entre outras. Além do mais, os autores ponderam que resultados aumentados de viabilidade celular podem estar correlacionados a uma

reprogramação adaptativa mitocondrial e metabólica das células que foram submetidas a um estresse proveniente do uso das soluções de tratamento.

Estes mesmos autores ressaltam, ainda, que nem todas as linhagens celulares podem responder da mesma forma ao MTT, necessitando de tempos diferentes de incubação para a estimativa da viabilidade celular e outros parâmetros experimentais. Os autores citam, por exemplo, a relação dos resultados de MTT com os níveis de glicose utilizados no meio de incubação, uma vez que o MTT mostrou ser dependente de transportadores de glicose presentes na membrana plasmática. Em nosso estudo, usamos um meio de cultura considerado com alto teor de glicose (4,5 g/L), porém se esta fosse a causa dos resultados inesperados observados, deveríamos ter obtido este efeito em todos os grupos experimentais (tratados com Verapamil e Gadolínio), não somente naqueles tratados com Capsazepina.

Da mesma forma, van Tonder, Joubert e Cromarty (2015) também observaram relação entre a concentração de glicose no meio de cultura e alterações na viabilidade celular dadas pelo MTT. Além do mais, estes mesmos autores compararam, para fins de avaliação da viabilidade celular, a eficiência do MTT com o método de absorção de vermelho neutro, ensaio de redução de resazurina e ensaio de sulforrodamina B, sendo este último o ensaio de preferência no *National Cancer Institute* (NCI) nos Estados Unidos (2015). Tais ensaios mostraram menor variabilidade dos parâmetros do que o ensaio de MTT, o qual apresentou menor precisão na detecção de alterações no número de células, não sendo considerado o melhor ensaio para a variabilidade celular. No entanto, o MTT foi o teste escolhido por estar dentro das condições experimentais do laboratório.

8.2 Expressão de GFAP

Assim como no presente estudo, diversos autores já utilizaram a análise quantitativa da imunofluorescência para avaliar os efeitos de seus tratamentos sobre a expressão de GFAP em astrócitos em cultura (COOKSON; PENTREATH, 1994; GOMES; PAULIN; MOURA NETO, 1999; BARRETO et al., 2006). De acordo com Brahmachari e colaboradores (2006), a proteína GFAP está envolvida no controle da forma e movimento dos astrócitos, o que tem importantes implicações para o microambiente sináptico. Há indícios de que a retração dos

processos astrocíticos facilite a neurotransmissão, uma vez que libera fisicamente o espaço extracelular para a difusão do neurotransmissor liberado para a fenda. Além do mais, muitas proteínas de membrana, como transportadores, estão ancoradas nos filamentos de GFAP, de forma que o deslocamento destes pode provocar efeitos diretos sobre a internalização ou reciclagem de componentes proteicos.

Pode-se observar que a morfologia dos astrócitos, apresentada nas imagens, correlacionou-se de maneira direta com a análise quantitativa da marcação para GFAP. Quando incubados em DMEM Hipertônico (com $\Delta \sim 60$ mOsm/Kg H₂O em relação ao DMEM Base), os astrócitos diminuíram sua área celular, o que esteve relacionado a uma diminuição da área de marcação para GFAP. Já foi demonstrado que alterações na marcação para GFAP também estão associadas com mudanças no padrão de sinalização nestas células (BARRETO et al., 2006). Uma vez que, diferentemente de neurônios, os astrócitos não produzem potenciais de ação, especula-se que mudanças no ambiente extracelular sejam particularmente importantes para induzir respostas intracelulares adaptativas. Ainda de acordo com Gamrani e colaboradores (2011), a proteína GFAP, por fazer parte do citoesqueleto destas células, pode ser utilizada como indicadora da plasticidade astrocítica em resposta a diversas condições fisiológicas e patológicas.

Em presença do bloqueador de LTCC (Verapamil), pode-se observar uma redução significativa da expressão do GFAP em condições basais, que também foi mantida em presença de DMEM hipertônico. Tal fato demonstra o papel crucial dos LTCCs na atividade astrocítica, inclusive na mediação de outras funções que não aquelas relacionadas ao estímulo hipertônico. Segundo Cheli e colaboradores (2016), os níveis de Ca²⁺ intracelular são extremamente importantes para diversas funções homeostáticas nos astrócitos, tais como proliferação e migração. Parnis e colaboradores (2013) também descreveram a importância da sinalização de Ca²⁺, não somente para as funções astrocíticas, mas também para a interação astrócito-neuronal. A elevação das concentrações de Ca²⁺ em astrócitos pode ainda resultar na liberação de transmissores, entre eles o glutamato, o qual vai agir nos terminais pré e pós-sinápticos, modulando a atividade sináptica (AGULHON et al., 2008).

Por outro lado, os resultados referentes ao ensaio com Capsazepina indicam que o bloqueio de TRPV1 parece não influenciar a morfologia celular em condições basais. No entanto, quando em condições extracelulares elevadas de sódio, o bloqueio de TRPV1 foi capaz de modificar significativamente a expressão de GFAP, demonstrando, assim, o

importante papel do TRPV1 na mediação das adaptações morfológicas dos astrócitos submetidos ao estímulo hipertônico. Uma vez observado que a incubação dos astrócitos em meio hipertônico foi capaz de reduzir a expressão de GFAP, e que este fato se relaciona diretamente com a redução da cobertura sináptica, pode-se inferir que a utilização da Capsazepina bloqueando o TRPV1 foi capaz de reverter os efeitos de redução da área celular induzidos pelo meio hipertônico. O papel, não somente do TRPV1, mas também de outros canais iônicos da mesma família, na transdução do sinal em resposta a estímulos osmóticos já foi descrito em 2006, por Liedtke, o qual traz duas hipóteses de vias de ativação via sinal osmótico para os canais em questão: 1) uma via indireta, na qual os canais TRPV são ativados por cascatas de sinalização provenientes de receptores acoplados a proteína G, ativados por mudanças de tonicidade do meio; 2) uma via direta, na qual os canais TRPV encontram-se no topo da cascata de sinalização, sendo diretamente estimulados por mudanças na tonicidade. No entanto, inexistem na literatura trabalhos que comprovem por qual mecanismo de sinalização (direto ou indireto) ocorre a transdução do sinal osmótico.

Por fim, a incubação com Gadolínio, bloqueador do SIC, parece não influenciar a morfologia astrocítica em condições basais, segundo análise realizada pelo teste ANOVA de duas vias. No entanto, ao utilizar o teste t para comparação entre os grupos basal com e sem Gadolínio, pode-se perceber uma diminuição estatisticamente relevante na expressão de GFAP no grupo basal com Gadolínio comparado ao grupo controle. De maneira surpreendente, a incubação com Gadolínio, simultaneamente ao estímulo hipertônico, aumentou em mais de 5 vezes a área celular. Esse resultado é inédito na literatura e sugere que a inibição de canais iônicos provocada pelo Gadolínio tenha um papel fundamental na função astrocítica, resultando em um efeito quase que aberrante sobre a morfologia celular. Entretanto, apesar do presente estudo ter por objetivo investigar a ação desse cátion de lantanídeo trivalente somente sobre os canais catiônicos inativados por estiramento (SIC), sabe-se, como já mencionado anteriormente nesta discussão, que tal composto é capaz de bloquear também os canais ativados por estiramento (SAC), assim como canais de Ca^{2+} e de K^+ (ELINDER; ÅRHEM, 1994). Desse modo, não há como dizer se tal efeito aberrante foi provocado única e exclusivamente pelo bloqueio de SIC, ou pelo bloqueio deste juntamente ao bloqueio de SAC, canais de Ca^{2+} e de K^+ . A intensidade do efeito, inclusive, mascarou estatisticamente (quando utilizado o teste ANOVA de duas vias) o efeito da incubação com o meio hipertônico em reduzir a expressão de GFAP. Tal efeito, já observados nos

experimentos anteriores, pode ser comprovado, mais uma vez, utilizando-se o teste t para comparação entre os grupos DMEM basal sem Gadolínio *versus* DMEM hipertônico sem Gadolínio.

8.3 Captação de aspartato triciado

Já foi amplamente demonstrado na literatura que os astrócitos possuem dois transportadores de glutamato, o GLAST e o GLT-1. Ambos desempenham papel fundamental em prevenir a morte neuronal excitotóxica, fato este relacionado com a maioria das doenças neurodegenerativas (KARKI et al., 2014). Fisiologicamente, eles estão relacionados ao *clearance* deste neurotransmissor na fenda sináptica, o que tem reflexos diretos sobre o grau de ativação dos neurônios adjacentes.

Neste contexto, uma das drogas utilizadas no tratamento de doenças neurodegenerativas relacionadas ao balanço alterado de glutamato, o Raloxifene, modula diretamente a expressão e a função dos transportadores de glutamato em astrócitos. Experimentos realizados em cultura primária de astrócitos provenientes de ratos mostram que a incubação com Raloxifene aumentou significativamente a captação de glutamato por estas células, o que implica em menor disponibilidade extracelular deste neurotransmissor (KARKI et al., 2014). Esses dados confirmam a importante participação dos astrócitos no ciclo glutamato-glutamina dentro do SNC.

De modo indireto, o presente estudo pretendeu avaliar o balanço glutamatérgico por meio da análise da captação de ^3H -aspartato, o qual constituiu um dos precursores de glutamato e utiliza o mesmo conjunto de transportadores astrocíticos que o glutamato. Na verdade, os transportadores de glutamato são chamados de transportadores de aminoácidos excitatórios, visto que o próprio aspartato pode exercer função de neurotransmissão. Observamos em nossos resultados que, quando em meio com aumento no teor de NaCl (modelo *in vitro* da desidratação), há uma redução na captação de ^3H -aspartato, que por sua vez indica uma redução na atividade conjunta dos transportadores. Essa resposta resultaria, indiretamente, em aumento da disponibilidade de glutamato no LEC, acarretando maior

ativação dos neurônios e ativação do comportamento de busca por água/sede, de forma que a osmolalidade seja reestabelecida.

A participação dos transportadores gliais GLT-1 e GLAST no mecanismo de *clearance* de glutamato já foi demonstrada no modelo experimental de insuficiência cardíaca, caracterizado por concentrações plasmáticas elevadas de AVP, assim como as induzidas pela desidratação celular (POTAPENKO et al., 2012). Estes autores demonstraram que ocorre uma mudança importante na expressão destes dois transportadores em astrócitos do NSO neste modelo experimental, o que poderia agir como um mecanismo compensatório para preservar um nível adequado de recaptação de glutamato em face da atividade aferente glutamatérgica aumentada que se verifica sobre os neurônios magnocelulares nesta situação experimental.

Em nosso estudo, a incubação com Verapamil não alterou significativamente a captação de ^3H -aspartato, seja em condições basais ou em resposta à incubação com DMEM hipertônico. Isso leva a crer que os LTCCs não desempenham função primordial na atividade dos transportadores GLAST e GLT-1. Contudo, a revisão feita por Agulhon e colaboradores (2008) mostra que o balanço de Ca^{2+} também pode ser mediado por receptores acoplados à proteína G (GPCRs - *G protein-coupled receptors*), que estão ligados a uma série de cascatas de sinalização intracelular. Assim, de acordo com a hipótese de que o estímulo hipertônico influencie o transporte de glutamato por astrócitos, podemos afirmar que possivelmente este efeito não seria mediado pelos LTCCs.

Além disso, observamos que a incubação com Capsazepina não alterou significativamente a captação de aspartato, ou seja, o efeito de redução na atividade dos transportadores induzido pelo DMEM hipertônico foi mantido mediante o bloqueio dos canais TRPV1, sugerindo que, a exemplo do observado para os canais LTCCs, os canais TRPV1 não participem de maneira direta do ciclo de glutamato em astrócitos. Neste caso, diferentemente do que ocorreu para os LTCCs, o bloqueio do TRPV1 reverteu os efeitos da hipertonicidade sobre a morfologia celular. Em conjunto, esses dados contrastam com a hipótese relatada na literatura de que alterações na expressão de GFAP se correlacionariam de maneira direta com o número de transportadores de glutamato expressos pela membrana, uma vez que o GLAST aparentemente se ancora nos filamentos de GFAP (SULLIVAN et al., 2007).

Por fim, podemos observar que a incubação com Gadolínio, a exemplo da incubação com Verapamil, não foi capaz de alterar significativamente a captação de aspartato triciado em condições basais. Em condições exclusivamente hipertônicas ocorreu, como já observado

em experimentos anteriores, uma redução significativa na captação do aspartato triciado, mostrando, mais uma vez, a importância da transdução do sinal osmótico no transporte de glutamato. No entanto, a incubação com Gadolínio foi capaz de reverter os efeitos de redução da captação de aspartato triciado induzidos pelo meio hipertônico. Novamente, a exemplo dos resultados obtidos com a análise da expressão de GFAP, não se pode atribuir esse efeito somente à inibição dos SIC, porém esses dados reforçam as evidências de Sullivan e colaboradores (2007) já mencionadas, uma vez que relaciona a dinâmica de expressão da proteína GFAP com o ancoramento dos transportadores de glutamato na membrana.

9 CONCLUSÃO

Em conjunto, os resultados aqui expostos revelam que os astrócitos em cultura respondem, de forma direta, à estimulação osmótica, alterando a morfologia (por meio do rearranjo do citoesqueleto e alteração da expressão de GFAP) e possivelmente o balanço de glutamato (por meio da redução da captação de aspartato triciado). Esses dados reforçam a participação dos astrócitos como um terceiro elemento sináptico. Assim, podemos traçar a hipótese de que, em condições de hiperosmolalidade, os astrócitos se retraem para facilitar a neurotransmissão, além de possivelmente reduzir a captação de glutamato, favorecendo a permanência deste neurotransmissor na fenda e aumentando sua probabilidade de interação com a membrana pós-sináptica ativando, assim, os neurônios e a sede e/ou comportamento de busca pela água.

Concluimos ainda que os LTCCs desempenham um papel importante na expressão de GFAP, preferencialmente em condições basais ou não relacionadas ao estímulo osmótico. Por outro lado, os canais TRPV1 e, principalmente, o SIC/SAC, parecem desempenhar papéis fundamentais nos rearranjos estruturais observados nos astrócitos em resposta ao estímulo hipertônico. Contudo, os LTCCs e os TRPV1 parecem não mediar as mudanças ocorridas no transporte de glutamato em presença de hiperomolalidade no meio de incubação, ao contrário dos SIC/SAC, que parecem estar intimamente relacionados à atividade dos transportadores GLAST e GLT-1.

REFERÊNCIAS

AGRAWAL, S. K.; NASHMI, R.; FEHLINGS, M. G. Role of L- and N-type calcium channels in the pathophysiology of traumatic spinal cord white matter injury. **Neuroscience**, v. 99, n. 1, p. 179-188, 2000.

AGULHON, C. et al. What is the role of astrocyte calcium in neurophysiology? **Neuron**, v. 59, n. 6, p. 932-946, 2008.

AKOPIAN, G. et al. Identified glial cells in the early postnatal mouse hippocampus display different types of Ca²⁺ currents. **Glia**, v.17, n. 3, p. 181–194, 1996.

ANDERSSON, B. The effect of injections of hypertonic NaCl-solutions into different parts of the hypothalamus of goats. **Acta Physiol Scand**, v. 28, n. 2-3, p. 188-201, 1953.

ANTUNES-RODRIGUES, J. et al. Neuroendocrine control of body fluid metabolism. **Physiol Rev.**, v. 84, n. 1, p. 169-208, 2004. Review.

ARAQUE, A.; NAVARRETE, M. Glial cells in neuronal network function. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 365, n. 1551, p. 2375-2381, 2010. Review.

ARIKKATH, J.; CAMPBELL, K. P. Auxiliary subunits: essential components of the voltage-gated calcium channel complex. **Curr. Opin. Neurobiol**, v. 13, n. 3, p. 298-307, 2003. Review.

BARRETO, R. A. et al. The pyrrolizidine alkaloid monocrotaline, extracted from *Crotalaria retusa*, interferes on cellular growth, alters GFAP expression and induces morphological changes on astrocyte primary cultures. **Rev. Bras. Saúde**, v. 7, n. 2, p. 112-127, 2006.

BEVAN, S. et al. Capsazepine: a competitive antagonist of the sensory neurone excitant capsaicin. **British Journal of Pharmacology**, v. 107, n. 2, p. 544-552, 1992.

BONDAN, E. F. et al. Investigation into the astrocytic immunoreactivity to GFAP and vimentin in the brainstem of Wistar rats submitted to the ethidium bromide gliotoxic model. **Arq Neuropsiquiatr.**, v. 61, n. 3A, p. 642-649, 2003.

BOUDABA, C. et al. Increased tonic activation of presynaptic metabotropic glutamate receptors in the rat supraoptic nucleus following chronic dehydration. **J Physiol.**, v. 551, n. Pt 3, p. 815-823, 2003.

BOURQUE, C. W.; OLIET, S. H. Osmoreceptors in the central nervous system. **Annu Rev Physiol.**, v. 59, p 601-619, 1997. Review.

CATTERALL, W. A. Structure and regulation of voltage-gated Ca^{2+} channels. **Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.**, v. 16, p. 521-555, 2000. Review.

CHELI, V. T. et al. L-type voltage-operated calcium channels contribute to astrocyte activation In vitro. **Glia**, v. 64, n. 8, p. 1396-1415, 2016.

CIURA, S., BOURQUE, C. W. Transient receptor potential vanilloid 1 is required for intrinsic osmoreception in organum vasculosum lamina terminalis neurons and for normal thirst responses to systemic hyperosmolality. **J Neurosci**, v. 26, n. 35, p. 9069-9075, 2006.

CIURA, S.; LIEDTKE, W.; BOURQUE, C. W. Hypertonicity sensing in organum vasculosum lamina terminalis neurons: a mechanical process involving TRPV1 but not TRPV4. **J Neurosci**, v. 31, n. 41, p. 14669-14676, 2011.

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

DANBOLT, N. C. Glutamate uptake. **Prog Neurobiol.**, v. 61, n. 1, p 1-105. 2001. Review.

DASCHIL, N. et al. L-type calcium channel blockers and substance P induce angiogenesis of cortical vessels associated with beta-amyloid plaques in an Alzheimer mouse model. **Neurobiol Aging**, v. 36, n. 3, p. 1333-1341, 2015.

DICKENSON, A. H.; DRAY, A. Selective antagonism of capsaicin by capsazepine: evidence for a spinal receptor site in capsaicin-induced antinociception. **Br J Pharmacol**, v. 104, n. 4, p. 1045-1049, 1991.

ELINDER, F.; ÅRHEM, P. Effects of gadolinium on ion channels in the myelinated axon of *Xenopus laevis*: four sites of action. **Biophys J**, v. 67, n. 1, p. 71-83, 1994.

FRANCO, A. Jr.; WINEGAR, B. D.; LANSMAN, J. B. Open channel block by gadolinium ion of the stretch-inactivated ion channel in mdx myotubes. **Biophys J**, v. 59, n. 6, p. 1164-1170, 1991.

GAMRANI, H. et al. Cellular plasticity in the supraoptic and paraventricular nuclei after prolonged dehydration in the desert rodent *Meriones shawi*: Vasopressin and GFAP immunohistochemical study. **Brain Res**, v. 1375, p. 85-92, 2011.

GOMES, F. C.; PAULIN, D.; MOURA NETO, V. Glial fibrillary acidic protein (GFAP): modulation by growth factors and its implication in astrocyte differentiation. **Braz J Med Biol Res**, v. 32, n. 5, p. 619-631, 1999. Review.

GREEN, K. N.; SMITH, I. F.; LAFERLA, F. M. Role of calcium in the pathogenesis of Alzheimer's disease and transgenic models. **Subcell Biochem**, v. 45, p. 507-521, 2007.

GRIMALDI, M.; FAVIT, A.; ALKON, D. L. cAMP-induced cytoskeleton rearrangement increases calcium transients through the enhancement of capacitative calcium entry. **J Biol Chem**, v. 274, n. 47, p. 33557-33564, 1999.

GULER, A. D. et al. Transient activation of specific neurons in mice by selective expression of the capsaicin receptor. **Nat Commun**, v. 3, p. 746, 2012.

GUNTHORPE, M. J.; SZALLASI, A. Peripheral TRPV1 receptors as targets for drug development: new molecules and mechanisms. **Curr Pharm Des**, v. 14, n. 1, p. 32-41, 2008. Review.

HAYASHI, M. K. Structure-function relationship of transporters in the glutamate-glutamine cycle of the central nervous system. **Int J Mol Sci**, v. 19, n. 4, p 1-18. 2018. Review.

HELLMICH, U. A.; GAUDET, R. Structural biology of TRP channels. **Handb Exp Pharmacol**, v. 223, p. 963-990, 2014. Review.

HUANG, C. et al. Existence and distinction of acid-evoked currents in rat astrocytes. **Glia**, v. 58, n. 12, p. 1415-1424, 2010.

HYZINSKI-GARCÍA, M. C. et al. Hypo-osmotic swelling modifies glutamate-glutamine cycle in the cerebral cortex and in astrocyte cultures. **J Neurochem**, v. 118, n. 1, p. 140-152, 2011.

KARKI, P. et al. Astrocyte-derived growth factors and estrogen neuroprotection: Role of transforming growth factor- α in estrogen-induced upregulation of glutamate transporters in astrocytes. **Mol Cell Endocrinol**, v. 389, n. 1-2, p. 58-64, 2014. Review.

LENT, R. **Cem bilhões de neurônios? Conceitos fundamentais de neurociência**. 2. ed. Atheneu, 2002. p. 73-110.

LIEDTKE, W. Transient receptor potential vanilloid channels functioning in transduction of osmotic stimuli. **J Endocrinol**, v. 191, n. 3, p. 515-523, 2006. Review.

MACVICAR, B. A. Voltage-dependent calcium channels in glial cells. **Science**, v. 226, n. 4680, p. 1345-1347, 1984.

NAM, J. H. et al. TRPV1 on astrocytes rescues nigral dopamine neurons in Parkinson's disease via CNTF. **Brain**, v. 138, n. Pt 12, p. 3610-3622, 2015.

NAZIROGLU, M. TRPV1 Channel: A Potential Drug Target for Treating Epilepsy. **Curr Neuropharmacol**, v. 13, n. 2, p. 239-247, 2015. Review.

NODA, M. Hydromineral neuroendocrinology: mechanism of sensing sodium levels in the mammalian brain. **Exp Physiol**, v. 92, n. 3, p. 513-522, 2007.

OH, Y. Ion channels in neuroglial cells. **Kaohsiung J Med Sci**, v. 13, n. 1, p. 1-9, 1997. Review.

OLIET, S. H.; BOURQUE, C. W. Gadolinium uncouples mechanical detection and osmoreceptor potential in supraoptic neurons. **Neuron**, v. 16, n. 1, p. 175-181, 1996.

PARNIS, J. et al. Mitochondrial exchanger NCLX plays a major role in the intracellular Ca^{2+} signaling, gliotransmission, and proliferation of astrocytes. **J Neurosci**, v. 33, n. 17, p. 7206-7219, 2013.

PEREA, G.; NAVARRETE, M.; ARAQUE, A. Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. **Trends Neurosci**, v. 32, n. 8, p. 421-431, 2009.

PIEROZAN, P. et al. Quinolinic acid induces disrupts cytoskeletal homeostasis in striatal neurons. Protective role of astrocyte-neuron interaction. **J Neurosci Res**, v. 92, n. 2, p. 268-284, 2015.

POTAPENKO, E. S. et al. Altered astrocyte glutamate transporter regulation of hypothalamic neurosecretor neurons in heart failure rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 303, n. 3, p. R291-300, 2012.

PURO, D. G. et al. Characterization of an L-type calcium channel expressed by human retinal Müller (glial) cells. **Brain Res Mol Brain Res**, v. 37, n. 1-2, p. 41-48, 1996.

RUGINSK, S. G. et al. Gaseous modulators in the control of the hypothalamic neurohypophyseal system. **Physiology (Bethesda)**, v. 30, n. 2, p. 127-138, 2015. Review.

SANTOS, S. F.; PIERROT, N.; OCTAVE, J. N. Network excitability dysfunction in Alzheimer's disease: insights from in vitro and in vivo models. **Rev. Neurosci**, v. 21, n. 3, p. 153-171, 2010. Review.

STEPANENKO, A. A.; DMITRENKO, V. V. Pitfalls of the MTT assay: Direct and off-target effects of inhibitors can result in over/underestimation of cell viability. **Gene**, v. 574, n. 2, p. 193-203, 2015.

STEPHENS, G., MOCHIDA, S. (Eds.), **Modulation of Presynaptic Calcium Channels**. Springer Science, Business Media Dordrecht, 2013. p. 29, 60.

STRIESSNIG, J. et al. Role of voltage-gated L-type Ca²⁺ channel isoforms for brain function. **Biochem. Soc. Trans**, v. 34, n. Pt 5, p. 903-909, 2006.

SULLIVAN, S. M.; et al. Cytoskeletal anchoring of GLAST determines susceptibility to brain damage: an identified role for GFAP. **J Biol Chem**, v. 282, n. 40, p. 29414-29423, 2007.

VAN DEN POL, A. N.; WUARIN, J. P.; DUDEK, F. E. Glutamate, the dominant excitatory transmitter in neuroendocrine regulation. **Science**, v. 250, n. 4985, p. 1276-1278, 1990.

VAN TONDER, A.; JOUBERT, A. M.; CROMARTY, A. D. Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. **BMC Res Notes**, v. 8, p. 47, 2015.

VERNEY, E. B. The antidiuretic hormone and the factors which determine its release. **Proc Soc Lond B Biol**, v. 135, n. 878, p. 25-105, 1947.

WATANABE, I.; GETTERS, L. S. Effects of Verapamil and Pinacidil on Extracellular K(+), pH, and the Incidence of Ventricular Fibrillation during 60 Minutes of Ischemia. **Int Heart J**, v. 59, n. 3, p. 589-595, 2018.

YONEKURA, M. et al. Medaka as a model for ECG analysis and the effect of verapamil. **J Pharmacol Sci**, v. 137, n. 1, p. 55-60, 2018.

YUAN, H. et al. Acute hyperosmotic stimulus-induced Fos expression in neurons depends on activation of astrocytes in the supraoptic nucleus of rats. **J Neurosci Res**, v. 88, n. 6, p. 1364-1373, 2010.

ANEXO – Parecer Consubstanciado do CEUA/UNIFAL

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas . UNIFAL-MG
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 714 . Alfenas/MG . CEP 37130-000
Fone: (35) 3299-1000 . Fax: (35) 3299-1063



Alfenas, 08 de setembro de 2014.

Profª. Silvia Graciela Ruginsk Leitão

Prezada Professora;

O projeto sob sua coordenação, registro nº 585/2014, intitulado “Efeito da hiperosmolalidade e da estimulação peptidérgica na sinalização glutamatérgica em astrócitos hipotalâmicos *in vitro*” está em conformidade com os princípios éticos exigidos na experimentação animal, tendo sido apreciado e aprovado por essa Comissão.

Por ser verdade, firmo o presente.

Prof Dr Carlos Giovani de Oliveira Nascimento
Presidente da CEUA – Unifal-MG