

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

LETÍCIA CRUZ DE ALMEIDA

**PARTICIPAÇÃO DOS CANAIS *TRANSIENT RECEPTOR POTENTIAL VANILLOID*
TYPE 1 (TRPV1) DE ASTRÓCITOS HIPOTALÂMICOS NO CONTROLE CENTRAL
DO BALANÇO DE ÁGUA E SÓDIO**

ALFENAS/MG

2023

LETÍCIA CRUZ DE ALMEIDA

PARTICIPAÇÃO DOS CANAIS *TRANSIENT RECEPTOR POTENTIAL VANILLOID TYPE 1* (TRPV1) DE ASTRÓCITOS HIPOTALÂMICOS NO CONTROLE CENTRAL DO BALANÇO DE ÁGUA E SÓDIO

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em ciências pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Neurociências e comportamento.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Silvia Graciela Ruginsk Leitão

ALFENAS/MG

2023

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central

Almeida, Leticia Cruz De .

Participação dos canais transient receptor potencial vanilloid type 1 (TRPV1) de astrócitos hipotalâmicos no controle central do balanço de água e sódio / Leticia Cruz De Almeida. - Alfenas, MG, 2023.

36 f. : il. -

Orientador(a): Silvia Graciela Ruginsk Leitão.

Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Saúde) -
Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2023.

Bibliografia.

1. Lactato. 2. Cálcio. 3. Osmolalidade. 4. GFAP. 5. Capsazepina . I.
Leitão, Silvia Graciela Ruginsk , orient. II. Título.

LETÍCIA CRUZ DE ALMEIDA

PARTICIPAÇÃO DOS CANAIS TRANSIENT RECEPTOR POTENTIAL VANILLOID TYPE
1 (TRPV1) DE ASTRÓCITOS HIPOTÁLÂMICOS NO CONTROLE CENTRAL DO
BALANÇO DE ÁGUA E SÓDIO

O(A) Presidente da banca examinadora abaixo assina a aprovação da Dissertação/Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Biociências Aplicadas à Saúde

Aprovada em: 12 de dezembro de 2023.

Profa. Dra. Silvia Graciela Ruginsk Leitão

Presidente da Banca Examinadora

Instituição: Universidade federal de Alfenas

UNIFAL-MG

Prof. Dr. Prof. Dr. Renato Rizo Ventura

Instituição: Universidade federal de Alfenas

UNIFAL-MG

Prof. Dr. Wesley Fernandes Fonseca

Instituição: Universidade Estadual de Minas Gerais

UEMG



Documento assinado eletronicamente por **Silvia Graciela Ruginsk Leitão**, Presidente, em 12/12/2023, às 16:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1149022** e o código CRC **25EDF3E9**.

AGRADECIMENTOS

É com profunda gratidão que dedico este momento para expressar meu reconhecimento a todas as pessoas que contribuíram para a conclusão desta significativa etapa em meu desenvolvimento pessoal, o mestrado. Estou plenamente ciente de que, sem o apoio, incentivo e compreensão de cada um de vocês, esta notável conquista não teria se concretizado. Permitam-me, dessa maneira, expressar meus agradecimentos especiais:

A Deus, meu fundamento inabalável, minha fortaleza, que me assiste diariamente.

A minha família pelo apoio incondicional ao longo desta jornada acadêmica. Em particular, quero estender meus agradecimentos à minha mãe, Wanderly, cujo incentivo foi uma fonte constante de motivação. Mesmo diante das adversidades, ela trabalhou incansavelmente na colheita de café, enfrentando condições desafiadoras, e encorajou seus cinco filhos a dedicarem-se aos estudos. Lamento que minhas irmãs mais velhas tenham, infelizmente, interrompido sua trajetória educacional para auxiliar nas responsabilidades domésticas, demonstrando um sacrifício notável.

Ao meu pai, Paulo Sérgio, por ser um homem trabalhador e por sempre proporcionar o melhor que estava ao seu alcance para nossa família. Este título de mestrado é dedicado a vocês, Aline, Elen, Tiago, Paulo Felipe, Mãe e Pai, como um testemunho do apoio inestimável que recebi. A conquista deste marco acadêmico é, sem dúvida, uma homenagem à força e à união de nossa família. Mais uma vez, agradeço por serem fontes constantes de inspiração em minha jornada.

Agradeço imensamente à minha orientadora Silvia Graciela Ruginsk Leitão, por persistir ao meu lado diante dos desafios. Sua orientação sábia e encorajadora desempenharam um papel fundamental na realização deste mestrado. Sou profundamente grata pelo privilégio de contar sua notável experiência e dedicação ao longo de todo este percurso acadêmico.

À toda equipe do laboratório de fisiologia, e em especial a Marina e Natália, expresso minha sincera gratidão pelo auxílio prestado durante os procedimentos.

À toda equipe do laboratório de bioquímica, em especial a Marília, Jéssica, Milton, Camila e Poliana, expresso minha profunda gratidão. Vocês constituem uma equipe extraordinária, e agradeço sinceramente por terem estado ao meu lado ao longo destes anos. A acolhida que me proporcionaram permanecerá marcada em

minha memória para o resto da vida. Muito obrigada.

Ao meu noivo Abner, que prestou suporte técnico e emocional, obrigada por tudo, meu amor.

A secretária do Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Saúde, Adriana Pereira, pela assistência prestada em todas as questões burocráticas e desenvolvimento acadêmico.

Expresso meu sincero agradecimento aos professores Josie, Marcelo, Graciela e Marisa Lonta pela valiosa contribuição oferecida durante as disciplinas ministradas. Suas aulas foram fontes de inspiração e enriqueceram significativamente meu percurso acadêmico.

A todas as pessoas que me apoiaram, mesmo permanecendo distantes geograficamente, expresso meu sincero agradecimento a Raissa, Laya, Nycoli, Elenice e Alice. Seja através de palavras encorajadoras, gestos de amizade ou simplesmente por estar presente em pensamento, saibam que cada gesto de apoio fez a diferença e foi verdadeiramente apreciado.

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

Por fim, agradeço a toda à banca examinadora, pela contribuição e discussão do projeto desenvolvido.

“O seu primeiro estado parecerá pequeno comparado com a grandeza do seu último estado”.

(Jó 8:7)

RESUMO

O Sistema Nervoso Central é composto por neurônios e células gliais, sendo os astrócitos essenciais na neurotransmissão. Este estudo investigou os efeitos das variações da osmolalidade do líquido extracelular (LEC) nos parâmetros da função astrocítica. Utilizando um modelo *in vitro* de cultura primária de astrócitos derivados do hipotálamo médio-basal de ratos neonatos, as células foram pré-incubadas por 30 minutos com meio de cultura convencional, com ou sem Capsazepina. Posteriormente, foram estimuladas por 2 horas com meios Hank de diferentes osmolalidades (230, 290 ou 350 mOsm/Kg H₂O). Foi analisada a viabilidade celular e a área celular, esta última estimada pela quantificação da expressão da proteína ácida fibrilar glial (GFAP). A liberação *in vitro* de lactato, as concentrações intracelulares de cálcio (Ca²⁺) e a quantificação da proteína total foram determinadas por meio de reações colorimétricas, realizada com o meio de incubação ou com lisados celulares obtidos após 1 ou 2h de estimulação. Os resultados foram avaliados por ANOVA de duas vias, com pós-teste de Sidak. A viabilidade celular permaneceu inalterada diante de variações de osmolalidade ou tratamento com Caps. A expressão de GFAP foi reduzida no grupo incubado com a solução Hank de 230 mOsm/Kg H₂O, sendo que o tratamento com Caps reverteu essa resposta ($p < 0,05$). A liberação de lactato não foi alterada após exposição a alterações na osmolalidade do LEC. Entretanto, a incubação com Caps aumentou significativamente as concentrações de lactato no meio após 2h de estimulação ($p < 0,001$), independentemente da osmolalidade do LEC. Na osmolalidade mais baixa (230 mOsm/Kg H₂O), o tratamento com Caps também aumentou a liberação de lactato após 1h de estimulação ($p < 0,01$). Não foram encontradas alterações relevantes nas concentrações intracelulares totais de Ca²⁺ em astrócitos incubados por 2 h sob diferentes osmolalidades do LEC. O tratamento com Caps, por sua vez, reduziu esse parâmetro apenas no grupo incubado com a solução Hank de 290 mOsm/Kg H₂O ($p < 0,01$). O bloqueio dos canais TRPV1 afeta a expressão de GFAP e a liberação de lactato, especialmente em condições hipotônicas. Contudo, o equilíbrio de Ca²⁺ não é significativamente impactado pelo antagonismo ao canal TRPV1 durante desafios osmóticos, exceto em condições isotônicas.

Palavras-chave: lactato; cálcio; osmolalidade; GFAP; capsazepina.

ABSTRACT

The Central Nervous System is composed of neurons and glial cells, with astrocytes being essential in neurotransmission. This study investigated the effects of variations in extracellular fluid osmolality (ECF) on astrocytic function parameters. Using an in vitro model of primary culture of astrocytes derived from the medio-basal hypothalamus of neonatal rats, cells were pre-incubated for 30 minutes with conventional culture medium, with or without Capsazepine. Subsequently, they were stimulated for 2 hours with Hank's solutions of different osmolalities (230, 290, or 350 mOsm/kg H₂O). Cell viability and cell area were analyzed, with the latter estimated by quantifying the expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP). In vitro lactate release, intracellular calcium (Ca²⁺) concentrations, and total protein quantification were determined through colorimetric reactions, performed with the incubation medium or with cell lysates obtained after 1 or 2 hours of stimulation. Results were evaluated by two-way ANOVA, with Sidak's post-test. Cell viability remained unchanged in the face of osmolality variations or Caps treatment. GFAP expression was reduced in the group incubated with Hank's solution of 230 mOsm/kg H₂O, and Caps treatment reversed this response ($p < 0.05$). Lactate release was not altered after exposure to changes in ECF osmolality. However, Caps incubation significantly increased lactate concentrations in the medium after 2 hours of stimulation ($p < 0.001$), regardless of ECF osmolality. At the lower osmolality (230 mOsm/kg H₂O), Caps treatment also increased lactate release after 1 hour of stimulation ($p < 0.01$). No relevant changes were found in total intracellular Ca²⁺ concentrations in astrocytes incubated for 2 hours under different ECF osmolalities. Caps treatment, however, reduced this parameter only in the group incubated with Hank's solution of 290 mOsm/kg H₂O ($p < 0.01$). TRPV1 channel blockade affects GFAP expression and lactate release, especially under hypotonic conditions. However, Ca²⁺ balance is not significantly impacted by TRPV1 channel antagonism during osmotic challenges, except under isotonic conditions.

Keywords: lactate; calcium; osmolality; GFAP; capsazepine.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANG II	Angiotensina ii
AVP	Vasopressina
CA ²⁺	Íons de cálcio
EAATS	Aminoácidos excitatórios
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
(L-GLU)	Glutamato
GQ-GPCRS	Receptores acoplados à proteína Gq
GS	Glutamina sintetase
LEC	Líquido extracelular
LIC	Líquido intracelular
MCTS	Família de monocarboxilatos
MNPO	Núcleo pré-óptico mediano
NA ⁺	Íons sódio
OVLT	Órgão vasculoso da lâmina terminal
PVN	Núcleo paraventricular do hipotálamo
SFO	Órgão subfornical
SNC	Sistema nervoso central
SON	Núcleo supraóptico
SRAA	Renina-angiotensina-aldosterona
TRPV1	Receptor de potencial transiente vanilóide 1

SUMÁRIO

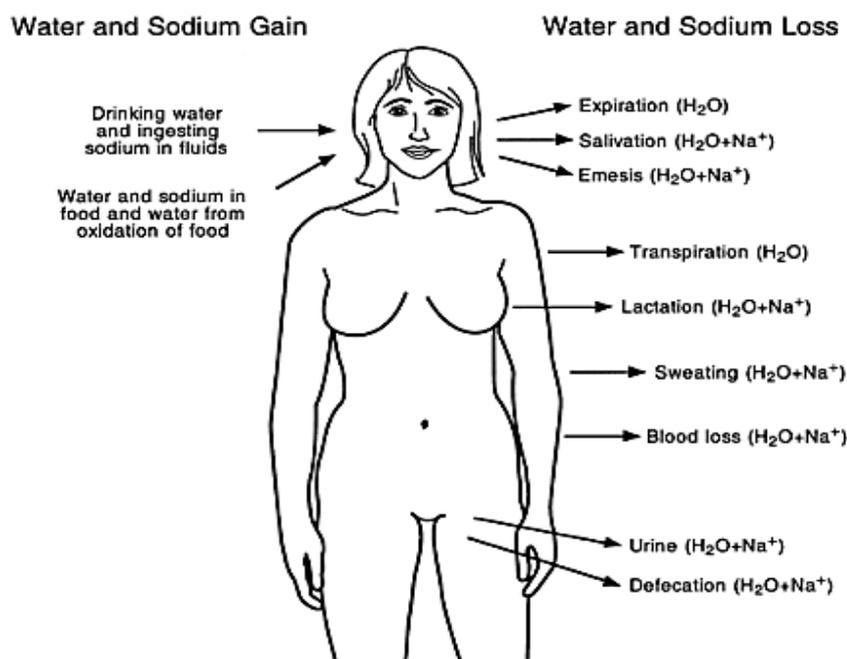
1	INTRODUÇÃO	11
1.1	OBJETIVOS.....	13
2	METODOLOGIA.....	14
2.1	ANIMAIS.....	14
2.3	PRÉ-INCUBAÇÃO E ESTIMULAÇÃO.....	15
2.4	ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR.....	16
2.5	IMUNOFLUORESCÊNCIA PARA GFAP.....	17
2.6	DOSAGENS DE CÁLCIO E LACTATO.....	17
3	RESULTADOS.....	19
3.1	VIABILIDADE CELULAR.....	19
3.2	EXPRESSÃO DE GFAP.....	20
3.3	LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE LACTATO.....	21
3.4	CONCENTRAÇÕES INTRACELULARES DE CÁLCIO.....	22
4	DISCUSSÃO	24
4.1	VIABILIDADE CELULAR.....	24
4.2	EXPRESSÃO DE GFAP.....	25
4.3	LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE LACTATO.....	26
4.4	CONCENTRAÇÕES INTRACELULARES DE CÁLCIO.....	27
	REFERÊNCIAS.....	31
	ANEXO A	35

1 INTRODUÇÃO

A água é um solvente polar, essencial para todas as funções do corpo humano. Cerca de 55% a 75% da massa corporal é composta por água e há variações de acordo com a idade, sexo, quantidade de gordura corporal, entre outros fatores. O teor de água de um organismo é separado em dois grandes compartimentos líquidos, intracelular e o extracelular, sendo este último é subdividido nos meios intersticial e intravascular. O líquido intracelular (LIC) difere do extracelular devido a sua composição e ao seu maior volume. O LIC contém grandes quantidades de íon potássio, magnésio e fosfato, enquanto o líquido extracelular (LEC) contém grandes quantidades de íon sódio (Na^+), além de nutrientes necessários para manter a viabilidade celular (VERBALIS, 2003). O sódio é o soluto mais abundante do meio extracelular e o principal responsável pela manutenção do gradiente osmótico, possibilitando a movimentação da água através dos diferentes compartimentos (COZZOLINO *et al.*, 2012).

A funcionalidade de um organismo depende, essencialmente, da homeostase dos líquidos corporais, ou seja, do balanço entre a conservação e a eliminação de solvente (água) e eletrólitos, particularmente sódio. O ganho de água e sódio se dá pela ingestão direta ou juntamente com alimentos, enquanto a perda ocorre, entre outras formas, por meio da sudorese, respiração e por excreção urinária, sendo essa última via a quantitativamente mais significativa (DELPIRE, 2018), como demonstrado na Figura 1.

Figura 1 – Esquema demonstrando as entradas de água e sódio à esquerda, e as vias de perda à direita. Para manter a homeostase da água (entrada = saída), uma quantidade equivalente de água precisa ser consumida por meio de alimentos e bebidas.



Fonte: Johnson (2007).

Para evitar a desidratação e suas consequências fisiológicas e comportamentais, sistemas neurais e hormonais controlam a função dos órgãos excretores, a fim de manter as concentrações de água e solutos relativamente constantes (MECAWI *et al.*, 2015). Mudanças na osmolalidade plasmática são corrigidas por alterações no balanço de água, enquanto mudanças no volume circulatório são corrigidas por adaptações no balanço de sódio. Na presença de aumento da osmolalidade, sensores centrais estimulam a liberação do hormônio antidiurético ou arginina vasopressina (AVP) a partir da neuro-hipófise. A AVP atua nos rins, promovendo a reabsorção de água (WOTUS *et al.*, 2003). Além disso, uma pequena elevação de 1 a 2% da osmolalidade do LEC desencadeia o sinal homeostático mais importante para influenciar a sensação de sede, que complementa a função renal de conservação do solvente (LEIB *et al.*, 2016).

A reposição de água em quantidades necessárias para restabelecer a osmolalidade do LEC pode não ser suficiente para repor o volume deste compartimento em caso de déficit. Assim, o restabelecimento do volume circulatório

conta não somente com o auxílio das ações renais da AVP, mas também do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA). Um de seus componentes é o hormônio angiotensina II (ANG II) que, em nível periférico, tem ação vasoconstritora (assim como a AVP) e, em nível central, tem ação dipsogênica (estímulo à sede) e natriorexigênica (estímulo ao consumo de sódio). Além do mais, a ANG II estimula a liberação de aldosterona, que induz a reabsorção de sódio nos segmentos finais no néfron. Juntas, essas ações determinam uma reposição não só de água, mas também de sódio, visando o restabelecimento do volume circulatório (FORMENTI; COLOMBARI, 2000).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

O objetivo geral do presente foi avaliar a participação de astrócitos nas respostas homeostáticas induzidas por alterações da osmolalidade do LEC.

1.1.2 Objetivos específicos

Foram avaliados, em cultura celular primária de astrócitos hipotalâmicos, os efeitos da variação da osmolalidade do meio de incubação e da pré-incubação com um antagonista dos canais TRPV1 (Capsazepina, 30 μ M) sobre:

- a) A viabilidade celular;
- b) A morfologia celular;
- c) As concentrações plasmáticas de Ca^{2+} ;
- d) A liberação *in vitro* de lactato.

2 METODOLOGIA

2.1 ANIMAIS

Para a realização dos experimentos, foram utilizados 30 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 dose letal de anestésico inalatório (isoflurano 4%) e o HMB foi dissecado e mantido em meio livre de Ca^{2+} até o momento do processamento, descrito a seguir.

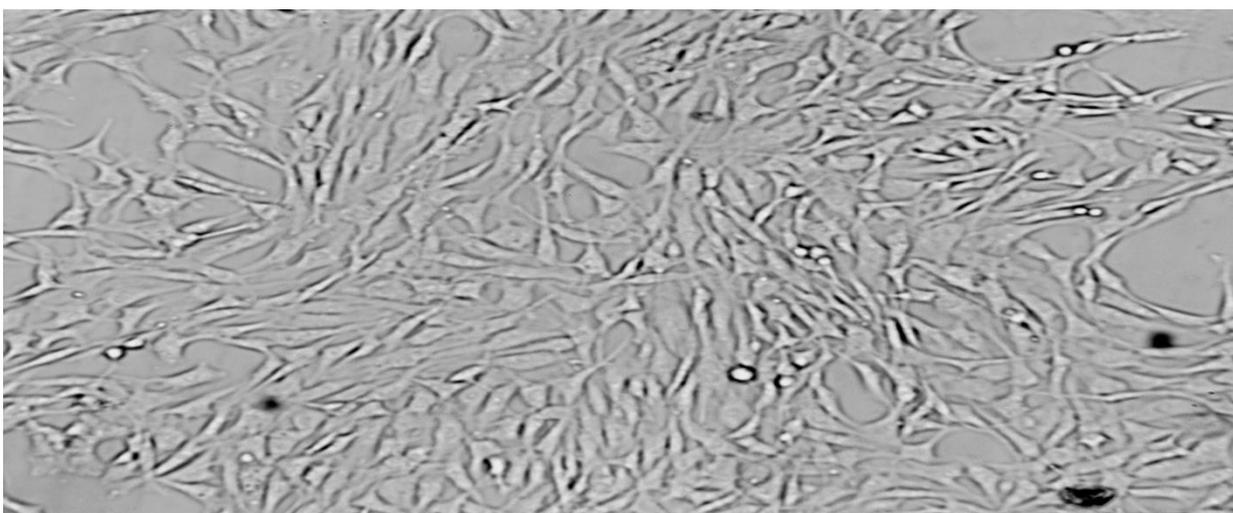
Todos os procedimentos foram realizados no período compreendido entre 7h00 e 12h00 e conduzidos em acordo ao “*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*” (NIH Publicação Nº 85-23, revisado 1996) e aos princípios éticos da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL; acessado de <http://www.cobea.org.br> em 26/11/2013). O presente projeto foi apresentado e aprovado como emenda ao protocolo 04/2021 do CEUA-UNIFAL/MG, sob responsabilidade da Profa. Marília Gabriella Alves Goulart Pereira (ANEXO A).

2.2 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. 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 ou 96 poços (1 x 10⁴ células/poço) (Figura 3).

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 10 dias, com confluência aproximada de 80%. Os astrócitos apresentam-se classicamente em formato estrelado. 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 (2023).

2.3 PRÉ-INCUBAÇÃO E ESTIMULAÇÃO

No dia do experimento, o meio de cultura foi substituído por meio fresco contendo ou não Capsazepina (Caps, 30 μ M, antagonista dos canais TRPV1). As placas de cultura foram mantidas nesta solução a 37° C por 30 minutos, sendo em seguida submetidas à estimulação com soluções Hank de diferentes osmolalidades (mOsm/Kg H₂O): 230 (correspondente a um meio hipotônico), 290 (correspondente a um meio isotônico) ou 350 (correspondente a um meio hipertônico). As placas de cultura foram mantidas nestas soluções a 37° C por tempo dependente do protocolo experimental. Desta forma, foram originados os seguintes grupos experimentais (Tabela 1):

Tabela 1 – Grupos experimentais

Grupo experimental	Pré-incubação (30 min)	Estimulação (total de 2h)
1		Hank 230
2	Meio de cultura	Hank 290
3		Hank 350
4		Hank 230
5	Meio de cultura + Capsazepina	Hank 290
6		Hank 350

Fonte: Da autora (2023).

2.4 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR

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.

O ensaio de viabilidade celular é 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 morte celular (incubação pelo mesmo período de tempo com DMSO 50%, que tem função detergente sobre membranas lipídicas).

2.5 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 três minutos. Em seguida, os poços foram lavados em PBS (3x) e incubados com Normal Donkey Serum 10% em PBS (0,01M, Triton 0,1%, NaN₃ 0,04%) por 1 hora. Após esse período foi retirado o (NDS) e as células foram lavadas em PBS (3x) e as células foram incubadas (*overnight*) com o anticorpo primário anti-GFAP (rabbit, 1:1.000, Cell Signaling Technology®).

Após período de incubação com o anticorpo primário, as células foram lavadas (3x) em PBS (0,01M) e na sequência foi realizada a incubação com o anticorpo secundário Alexa488® donkey anti-rabbit (1:250, Jackson ImmunoResearch) por um período de duas horas. Após incubação com o anticorpo secundário, as células foram lavadas (3x) com PBS (0,01M) e contracoradas com o marcador nuclear DAPI (*stock* 15 mM, 1:25000) por dois 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. Os resultados foram expressos em área de marcação para GFAP (μm²).

2.6 DOSAGENS DE CÁLCIO E LACTATO

Ambas as concentrações de lactato no meio de incubação e de Ca²⁺ intracelular foram estimadas por métodos enzimáticos colorimétricos (Labtest e Interkit, respectivamente). Para tanto, as células foram cultivadas em placas de 96 poços e submetidas aos 30 minutos de pré-tratamento com Caps, conforme descrito anteriormente. Em seguida, as células foram estimuladas por um período total de 2h com as soluções Hank de diferentes omolalidades.

Para as dosagens de lactato, amostras do meio de incubação foram obtidas após 1 ou 2h de incubação. Para a dosagem de Ca^{2+} intracelular, ao final do período de 2h, as células foram coletadas após tripsinização.

Para os ensaios colorimétricos, foi realizada uma mini-reação em placa de 96 poços, mantendo-se a proporção de reagentes sugerida pelos fabricantes. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 550 nm (para lactato) ou 650 nm (para Ca^{2+}). O valor de absorvância das amostras desconhecidas foi corrigido pela absorvância do padrão. Em seguida, todos os resultados foram corrigidos pelos valores de proteína total, que foi estimada a partir do homogenato de células pelo método de Bradford.

2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

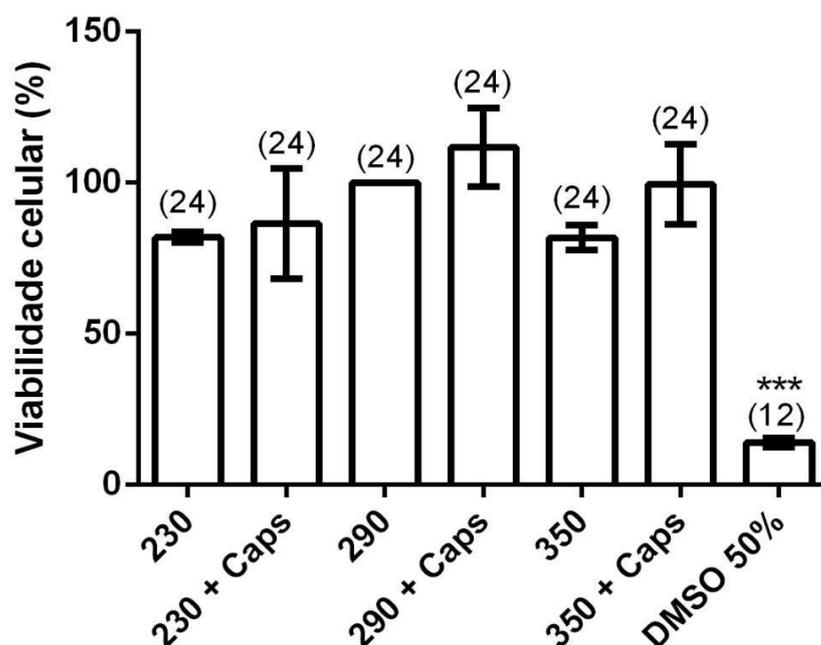
Os resultados foram expressos em médias \pm erro padrão da média (EPM). A análise foi realizada por meio do teste de variância (ANOVA) de uma ou duas vias, seguido do pós-teste de Sidak. O nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$).

3 RESULTADOS

3.1 VIABILIDADE CELULAR

O ensaio de MTT tem a finalidade de testar a eventual citotoxicidade induzida por um determinado composto ou tratamento no metabolismo celular. A Figura 4, apresentada a seguir, mostra os efeitos da incubação com os diferentes tratamentos sobre a porcentagem de células viáveis, normalizada pela situação experimental controle (Hank 290 mOsm/Kg H₂O sem tratamento). Como pode ser observado, houve uma redução significativa da viabilidade no grupo incubado com DMSO 50%, quando comparado ao grupo controle ($100 \pm 0,00$ versus $14,04 \pm 1,48$ %, $p < 0,001$). Os demais grupos submetidos não apresentaram alterações significativas neste parâmetro.

Figura 4 – Efeitos da incubação com meios Hank de diferentes osmolalidades (mOsm/Kg H₂O), contendo ou não tratamento com Capsazepina (Caps, 30 μ M), sobre a viabilidade celular (%).



Fonte: Da autora (2023).

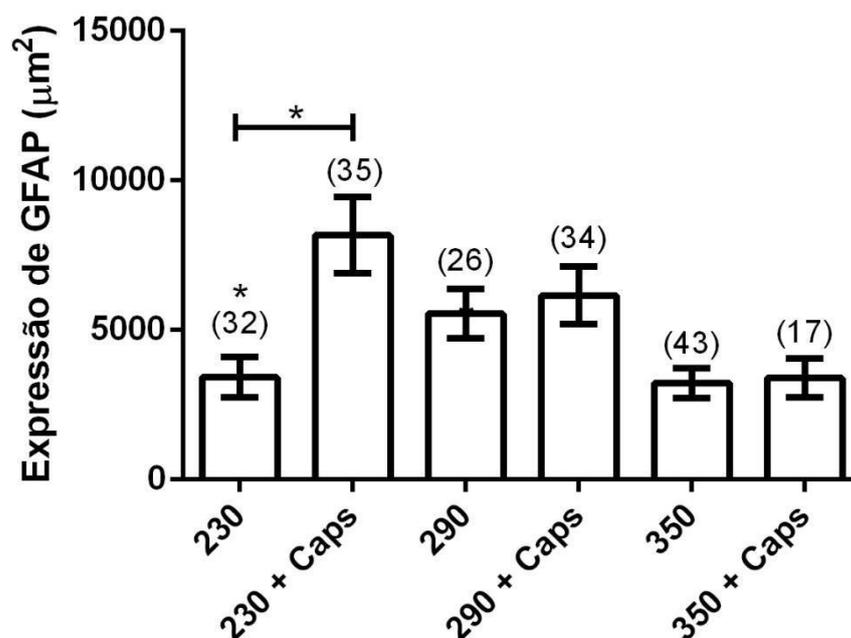
Legenda: Resultados expressos em médias \pm erro padrão da média (EPM) e analisados por meio do teste de variância de duas vias (Two-Way ANOVA). A viabilidade foi normalizada pelos valores encontrados no grupo incubado com solução Hank 290 mOsm/Kg H₂O. *** $p < 0,001$.

3.2 EXPRESSÃO DE GFAP

A proteína ácida fibrilar glial (GFAP) é utilizada como marcador de células gliais, como astrócitos e células ependimárias, uma vez que só é expressa pelo citoesqueleto das mesmas. Dessa forma, nosso trabalho avaliou qualitativamente e quantitativamente a expressão de GFAP como um indicador das alterações estruturais e morfológicas sofridas pelos astrócitos em resposta aos diferentes tratamentos.

A Figura 5, apresentada abaixo, mostra que a incubação com o meio Hank de 230 mOsm/Kg H₂O reduziu a expressão de GFAP em relação ao grupo controle ($5547 \pm 829,5$ % *versus* $3425 \pm 686,2$ μm^2 , $p < 0,05$). Ainda, foi observado que no grupo submetido à incubação com Hank 230 mOsm/Kg H₂O, o pré-tratamento com Caps reverteu a redução na expressão de GFAP, restabelecendo os valores de expressão para níveis basais ($3425 \pm 686,2$ *versus* 8174 ± 1269 μm^2 , $p < 0,05$).

Figura 5 – Efeitos da incubação com meios Hank de diferentes osmolalidades (mOsm/Kg H₂O), contendo ou não tratamento com Capsazepina (Caps, 30 μM), sobre a expressão de GFAP (μm^2) em astrócitos hipotalâmicos.

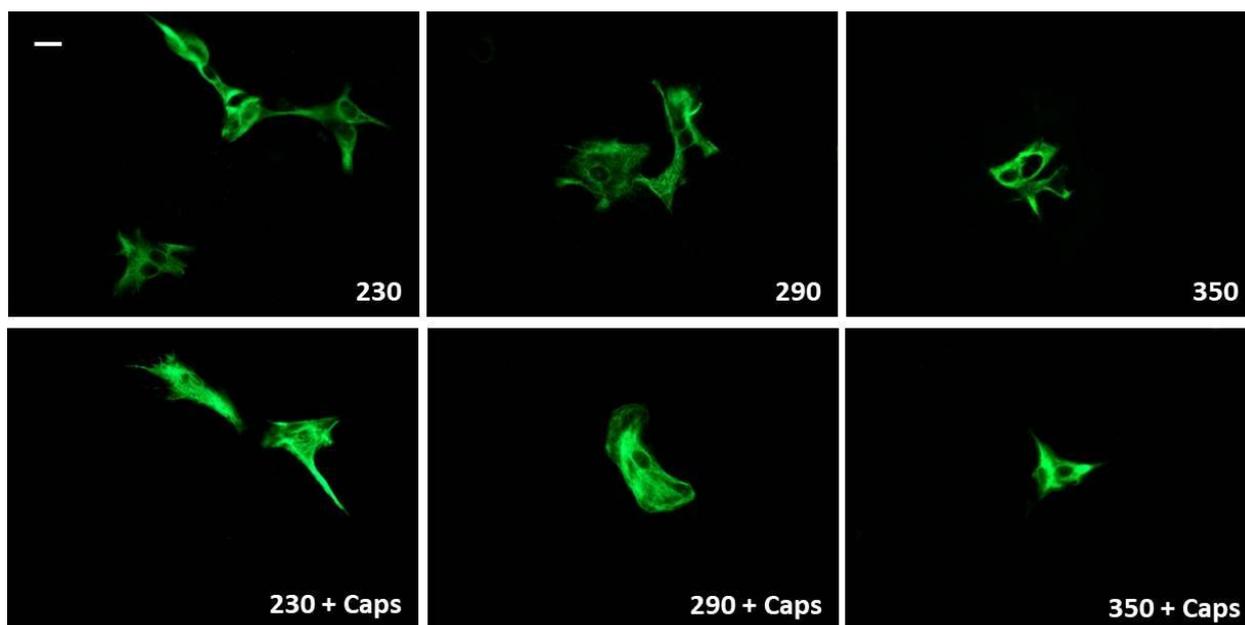


Fonte: Da autora (2023).

Legenda: Resultados expressos em médias \pm erro padrão da média (EPM) e analisados por meio do teste de variância de duas vias (Two-Way ANOVA). * $p < 0,05$.

As imagens representativas dos efeitos dos tratamentos nas diferentes condições experimentais são mostradas na Figura 6.

Figura 6 – Efeitos da incubação com meios Hank de diferentes osmolalidades (mOsm/Kg H₂O), contendo ou não tratamento com Capsazepina (Caps, 30 μM), sobre a expressão de GFAP em astrócitos hipotalâmicos. Imagens representativas das diferentes condições experimentais. Escala: 20 μm.



Fonte: Da autora (2023).

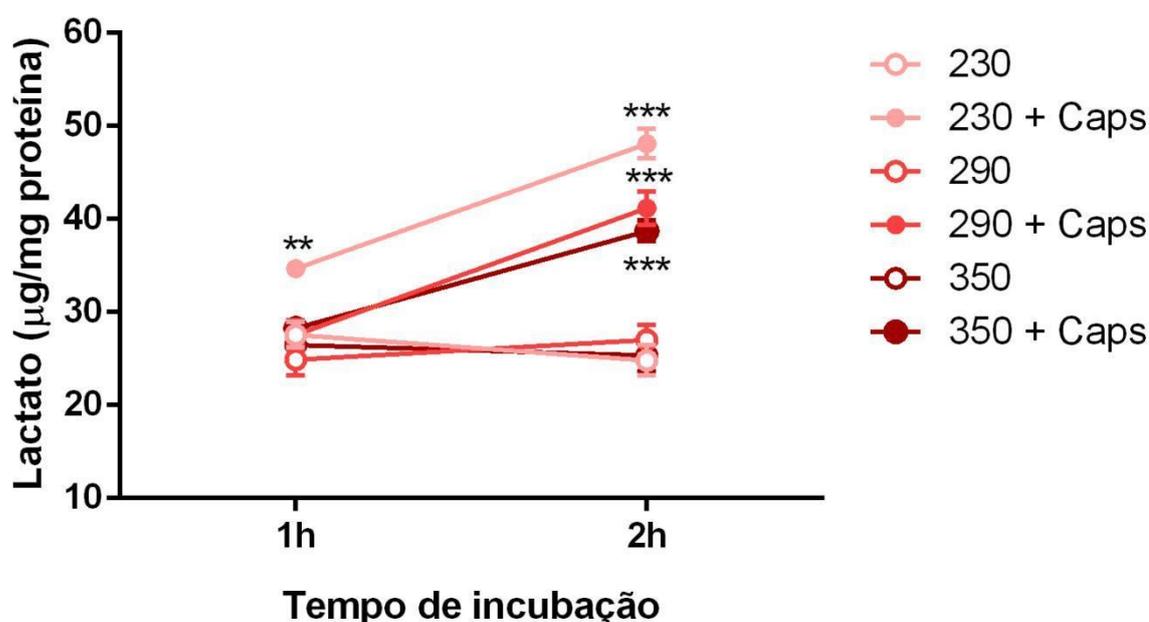
3.3 LIBERAÇÃO *IN VITRO* DE LACTATO

O lactato é não somente um importante substrato energético para o SNC, como também um mensageiro na comunicação entre astrócitos e neurônios. O presente trabalho mostra na Figura 7 que, considerando o tempo de incubação de 1h, o grupo submetido à incubação com Hank 230 mOsm/Kg H₂O e tratado com Caps apresentou aumento da quantidade de lactato liberado para o meio de incubação, em comparação a seu respectivo grupo controle (230 mOsm/Kg H₂O não tratado) ($34,70 \pm 0,94$ versus $27,56 \pm 1,37$ μg/mg proteína, $p < 0,01$).

No tempo de 2h, todos os grupos tratados com Caps apresentaram aumento da liberação de lactato em relação aos seus respectivos controles não tratados (Meio Hank 230 mOsm/Kg H₂O: $48,12 \pm 1,62$ versus $24,81 \pm 1,62$ μg/mg proteína, $p < 0,001$; Meio Hank 290 mOsm/Kg H₂O: $41,16 \pm 1,79$ versus $27,04 \pm 1,55$ μg/mg proteína, $p < 0,001$; Meio Hank 350 mOsm/Kg H₂O: $38,71 \pm 1,12$ versus $25,36 \pm 1,72$

$\mu\text{g}/\text{mg}$ proteína, $p < 0,001$). No entanto, não foram observadas alterações significativas, em nenhum dos tempos analisados, quando os grupos não tratados (Meios Hank 230, 290 e 350 $\text{mOsm}/\text{Kg H}_2\text{O}$) foram comparados entre si.

Figura 7 – Efeitos da incubação com meios Hank de diferentes osmolalidades ($\text{mOsm}/\text{Kg H}_2\text{O}$), contendo ou não tratamento com Capsazepina (Caps, $30 \mu\text{M}$), sobre a liberação in vitro de lactato ($\mu\text{g}/\text{mg}$ proteína).



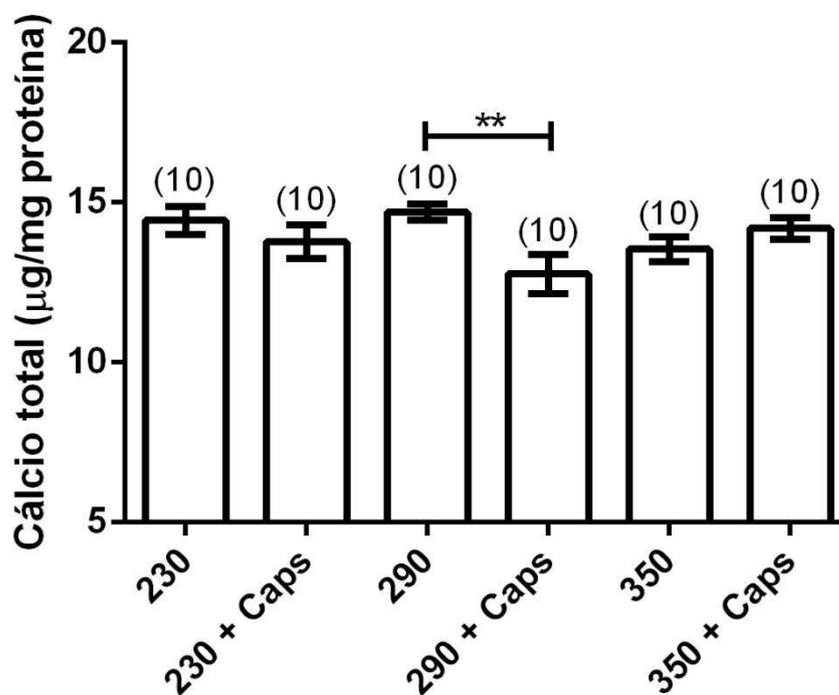
Fonte: Da autora (2023).

Legenda: Resultados expressos em médias \pm erro padrão da média (EPM) e analisados por meio do teste de variância de duas vias (Two-Way ANOVA). $N = 10/\text{grupo experimental}$. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

3.4 CONCENTRAÇÕES INTRACELULARES DE CÁLCIO

A complexa interação entre canais iônicos, receptores de neurotransmissores e mecanismos de liberação intracelular determina o padrão de sinalização de Ca^{2+} nos astrócitos hipotalâmicos. Além disso, o Ca^{2+} regula a liberação de substâncias neuroativas e participa de vários processos metabólicos astrogliais, sendo considerado um marcador da atividade destas células. De acordo com a Figura 8, somente houve diferença estatística na comparação entre o grupo 290 + Caps e seu respectivo grupo controle não tratado ($14,70 \pm 0,25$ versus $12,76 \pm 0,60 \mu\text{g}/\text{mg}$ proteína, $p < 0,01$).

Figura 8 – Efeitos da incubação com meios Hank de diferentes osmolalidades (mOsm/Kg H₂O), contendo ou não tratamento com Capsazepina (Caps, 30 μM), sobre as concentrações intracelulares de Ca²⁺ (μg/mg proteína).



Fonte: Da autora (2023).

Legenda: Resultados expressos em médias ± erro padrão da média (EPM) e analisados por meio do teste de variância de duas vias (Two-Way ANOVA). ** p<0,01.

4 DISCUSSÃO

A constituição do SNC se dá basicamente por neurônios e células da glia, entre elas os astrócitos, os quais desempenham funções essenciais para a neurotransmissão. As células gliais também participam da formação da barreira hematoencefálica (BHE), sendo um dos três isolantes do SNC. Diante desta importância, a partir do final da década de 90, a transmissão sináptica ficou conhecida como “sinapse tripartite”, considerando-se como elementos não somente os terminais neuronais pré e pós-sinápticos, mas também os processos gliais (ARAQUE *et al.*, 1999).

É importante ressaltar que as células gliais não são células excitáveis como os neurônios, nos quais um sinal químico é capaz de ser codificado em um sinal elétrico e, subsequentemente, ser traduzido em outro sinal químico (Vesce; Bezzi; Volterra, 2001). Diante destas importantes diferenças, o presente estudo avaliou a participação de astrócitos nas respostas homeostáticas induzidas por alterações da osmolalidade do LEC, investigando, para tanto, a função de um canal iônico (TRPV1) sabidamente envolvido nas respostas neuronais frente a estes desafios.

O TRPV1 é um canal catiônico inespecífico, não-seletivo, com maior afinidade pelo Ca^{2+} . Sua ativação se dá por meio de uma variedade de estímulos físicos, químicos e biológicos (Barrantes *et al.*, 2016). Seu principal agonista é a Capsaicina, uma substância de caráter químico pungente, presente em algumas variedades de pimentas (Liu; Simon, 1996). Em nosso estudo, utilizamos a Capsazepina (Caps), um antagonista específico do receptor TRPV1, de forma a avaliar a participação deste receptor nas respostas fisiológicas observadas.

4.1 VIABILIDADE CELULAR

Inicialmente, fizemos a avaliação da viabilidade celular pelo ensaio de MTT, de forma a caracterizar o efeito potencialmente tóxico dos meios de diferentes osmolalidades, bem como da própria Caps, sobre a função astrocítica. Segundo Stepanenko e Dmitrenko (2015) perturbações metabólicas celulares e estresse oxidativo podem afetar significativamente a viabilidade celular avaliada pelo MTT. No presente estudo, nenhum dos grupos experimentais mostrou alterações estatisticamente relevantes na porcentagem de células viáveis, exceto o grupo

DMSO 50%, que apresentou uma viabilidade média de 14%, o que já era esperado tendo o efeito deste composto como um detergente de membranas, levando à lise celular (controle positivo para morte celular).

Ressalta-se que, além das mudanças de concentração de metabólitos, íons ou fármacos, o tempo de exposição a tais alterações é de fundamental importância para determinar a sobrevivência das células. Além do mais, nem sempre uma maior exposição determina menor viabilidade: Svilar *et al.* (2012) demonstraram que o tratamento realizado em curto prazo já foi suficiente para induzir despolarização e perda de massa mitocondrial, com geração de estresse oxidativo nas linhagens celulares estudadas.

No presente estudo, a combinação dos tratamentos com o tempo de experimento de 2 horas e 30 minutos não afetou a viabilidade celular. Portanto, por meio deste teste, demonstramos que os meios de estimulação osmótica (solução Hank), a concentração utilizada de Caps, bem como o tempo total de experimento foram considerados seguros para a viabilidade celular.

4.2 EXPRESSÃO DE GFAP

No presente estudo, a quantificação da expressão de GFAP foi utilizada como parâmetro quantitativo e qualitativo para a análise dos efeitos dos diferentes tratamentos sobre o remodelamento dos astrócitos. Embora alguns autores argumentem que a estimativa de área (em duas dimensões) não necessariamente se correlacione com o volume celular (três dimensões), o qual, de fato, é a variável monitorada, estudos anteriores de nosso grupo demonstraram que a expressão de GFAP analisada pela técnica de imunofluorescência é sim compatível com a avaliação da expressão desta proteína por *Western blotting*, e mais, correlaciona-se também de maneira previsível com a capacitância de membrana em resposta à estimulação osmótica (Souza *et al.*, 2020).

Assim, foi verificado que tanto os grupos estimulados com soluções Hank a 230 e 350 mOsm/Kg H₂O apresentaram uma redução bastante significativa na expressão de GFAP (em média de 40%), porém somente no grupo Hank hipotônico os dados atingiram relevância estatística.

Gamrani *et al.* (2011) demonstraram redução na imunorreatividade para GFAP no hipotálamo de animais desidratados. Ademais, Souza *et al.* (2020) também

demonstraram redução da expressão de GFAP em astrócitos expostos à hipertonidade. Analisando-se o efeito da hiperosmolalidade (350 mOsm/Kg H₂O) sobre o volume de uma célula qualquer, pode-se supor que qualquer célula reduziria seu volume em um meio hipertônico, pois a mesma tenderia a perder água para o ambiente. Porém, em neurônios e astrócitos, essa não é uma resposta que altera somente o equilíbrio osmótico da célula, mas está atrelada a uma série de eventos eletrofisiológicos e de metabolismo celular que culminam com a ativação de respostas comportamentais (como a sede) e secreção de hormônios, como o ADH, responsável pela recuperação renal de água.

Pelo raciocínio inverso, uma célula qualquer exposta a um meio hipotônico (230 mOsm/Kg H₂O) tenderia a ganhar água do ambiente, aumentando seu volume celular. Porém, foi observado que os astrócitos fazem exatamente o contrário, e reduzem a área celular, tal qual como se estivessem expostos ao meio hipertônico. Esse efeito é inédito na literatura e mais uma vez aponta para respostas altamente específicas e seletivas nesse tipo celular. Ademais, o bloqueio dos canais TRPV1 com Caps reverteu totalmente o efeito induzido pelo meio hipotônico, restabelecendo a expressão de GFAP para valores basais. Em conjunto, esses dados demonstram a importância destes canais para o equilíbrio osmótico em astrócitos.

4.3 LIBERAÇÃO IN VITRO DE LACTATO

O lactato desempenha um papel chave no suporte metabólico dos neurônios no SNC, sendo transportado para dentro destas células e pelos astrócitos por meio de transportadores MCTs. Em nosso estudo, de maneira semelhante ao que ocorreu com a expressão de GFAP, somente observamos alterações significativas na liberação de lactato com 1h de estimulação no grupo incubado com solução Hank a 230 mOsm/Kg H₂O e tratado com Caps.

Em modelos de doenças neurodegenerativas já foi reportada redução na expressão de MCT1 (Domènech-Estévez *et al.*, 2015), o que pode resultar em maior ou menor disponibilidade extracelular deste metabólito, a depender de qual célula ele resulta. Em patologias, o lactato demonstrou ter um efeito protetor do axônio, reforçando a importância da interação neurônio-gliã. Nesse sentido, Vasconcelos (2016) relatou que as células de Schwann que foram crescidas em meio rico em

lactato exibiram um aumento no nível dos genes Krox20/EGR2 e P0, ambos reguladores de mielina.

No entanto, a função do lactato parece transcender sua participação na homeostase energética do SNC, sendo apontado, também, como uma importante molécula sinalizadora. Em relação ao balanço Na^+ , sua participação ainda é incerta, mas parece estar relacionada ao maior trabalho energético de bombas que realizam o transporte ativo deste íon para fora da célula em condições de hiperosmolalidade. Nesse sentido, Costa (2020) demonstrou que a liberação de lactato no SFO de ratos foi aumentada pela estimulação com Na^+ a 170mM (meio hipertônico) em modelo *ex vivo*, contrastando dos achados do presente estudo. Isso porque os presentes resultados indicam que a incubação com os meios Hank de diferentes osmolalidades não foi capaz de alterar a liberação de lactato para o meio, somente mediante bloqueio dos canais TRPV1 pela Caps. Segundo (MATSUDA *et al.*, 2017) o lactato em meio extracelular, atuaria ativando os interneurônios GABAérgicos da via inibitória da ingestão de água e sódio.

4.4 CONCENTRAÇÕES INTRACELULARES DE CÁLCIO

O Ca^{2+} é uma molécula sinalizadora intracelular de extrema importância, tanto para células excitáveis, como neurônios e fibras musculares, quanto para células não excitáveis, como os astrócitos. Este íon determina a liberação de substâncias neuroativas e controla vários processos metabólicos astrogliais, por isso o controle de suas concentrações intracelulares é extremamente rígido.

O acesso do Ca^{2+} ao meio intracelular pode se dar por meio de diferentes canais iônicos, dentre eles o canal de Ca^{2+} do tipo L e os canais TRPV1, objeto de estudo do presente trabalho. Após determinada quantidade de íons adentrar o astrócito (faísca de Ca^{2+}), ocorre oscilação e propagação das ondas de Ca^{2+} internas. Isso porque as faíscas iniciais levam à liberação adicional de Ca^{2+} pelo retículo endoplasmático. De certa forma, este é um evento que antecede a ativação da maioria das funções nestas células, sendo as ondas de Ca^{2+} , portanto, um indicador importante da atividade astrocítica.

Em contraste, a pesquisa executada por Gallagher *et al.* (2023) aprofundaram-se na análise da propagação de ondas intracelulares de íons cálcio (Ca^{2+}), conferindo uma visão mais abrangente sobre as interações entre astrócitos. A

colaboração funcional entre os receptores P2Y1 e P2Y2 surgiu como um elemento crucial para a propagação efetiva dessas ondas nos astrócitos espinhais, destacando as complexas interações entre diversos subtipos de receptores. A disfunção na sinalização de íons de Ca^{2+} em astrócitos emerge como um fator determinante em diversas condições patológicas, tais como distúrbios neurológicos, epilepsia e lesões cerebrais.

As investigações conduzidas por Wellman *et al.* (2018) também revelaram informações importantes sobre a sinalização astrogliar de íons cálcio (Ca^{2+}) e seu impacto na força sináptica em situações fisiopatológicas. No uso do modelo de epileptogênese, não houve diferenças em termos de conectividade ou características pós-sinápticas entre as situações experimentais examinadas. Este resultado demonstrou a importância crucial da sinalização astrogliar na regulação da eficácia sináptica e sugere que alterações minuciosamente ajustadas nesta via podem desempenhar um papel importante nos casos fisiopatológicos estudados.

Conforme as pesquisas conduzidas por Chelli *et al.* (2016), os níveis intracelulares de íons Ca^{2+} desempenham um papel crucial em diversas funções homeostáticas nos astrócitos, como a proliferação e migração celular, bem como na complexa interação astrócito-neuronal (PARNIS *et al.*, 2013). O aumento nas quantidades de íons Ca^{2+} dentro dos astrócitos também pode provocar a liberação de neurotransmissores, como o glutamato, cujo efeito se propaga nos terminais pré e pós-sinápticos, influenciando, dessa forma, a atividade sináptica (AGULHON *et al.*, 2008).

Em nosso estudo, apenas conseguimos observar o efeito do tratamento com Caps em reduzir as concentrações intracelulares de Ca^{2+} sob condições de isotonicidade. Esse resultado demonstra que, em condições de normalidade, uma porção significativa do Ca^{2+} intracelular vem da abertura de canais TRPV1. Contudo, este efeito esteve ausente nos demais grupos experimentais (230 e 350 mOsm/Kg H_2O), indicando que outros canais podem estar ativos nesta situação, ou que a dinâmica de entrada foi alterada, de forma que a janela temporal da presente avaliação (2h) não permitiu a visualização de determinado efeito. Isso porque as ondas de Ca^{2+} são eventos extremamente rápidos, desconhecendo-se a contribuição desta entrada em condições que o estímulo é mantido por longos períodos.

Assim, uma limitação metodológica do presente estudo foi ter feito somente a avaliação “end-point” das concentrações de Ca^{2+} , ou seja, apenas ao final de 2h de

experimentação. Isso porque a determinação das concentrações iônicas a partir do lisado exige a coleta das células, o que só pode ser feito ao final do período. Uma alternativa para estudos futuros poderia ser o uso de sondas fluorescentes, como a Fura-2 AM, que permitem a visualização ao microscópio, em tempo real, da dinâmica de movimentação do Ca^{2+} .

5 CONCLUSÃO

Os resultados demonstraram que os meios de estimulação osmótica (soluções Hank), a concentração utilizada de Caps, bem como o tempo total de exposição, foram considerados seguros para a continuidade dos experimentos, sem efeito significativo sobre a viabilidade celular. Em conjunto, os resultados obtidos indicam que a expressão de GFAP (indicador de mudanças morfológicas) e a liberação de lactato são significativamente afetadas pelo bloqueio dos canais TRPV1, particularmente em condições hipotônicas. Por outro lado, o balanço de Ca^{2+} parece não ser impactado de maneira significativa pelo antagonismo ao canal TRPV1 durante desafios osmóticos, apenas em condição fisiológica (isotonicidade). Estes resultados contribuem para o melhor entendimento do funcionamento dos astrócitos, fornecendo uma base para futuras investigações no campo da neurociência.

REFERÊNCIAS

- AGARWAL, Amit *et al.* Opening of the mitochondrial permeability transition pore induces microdomain calcium transients in astrocyte processes. **Neuron**, [s. l.], v. 93, n. 3, p. 587–605, 2017.
- AGULHON, C. Petravicz *et al.* Qual é o papel do cálcio dos astrócitos na neurofisiologia? **Neurônio**, São Paulo, v. 59, n. 6, p. 932–46, 2008.
- NICOLA, J. Allen; BEM, A. Barres. Signaling between glia and neurons: focus on synaptic plasticity. **Current Opin Neurobiol**, USA, v. 15, n. 5, p. 542–8, 2005.
- ARAQUE, A. *et al.* Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. **Trends Neurosci.**, [s. l.], v. 22, n. 5, p. 208–15. 1999.
- BALDASSO, Elisa *et al.* Efeitos hemodinâmicos e metabólicos da infusão de vasopressina em crianças com choque. **Jornal De Pediatria**, [s. l.], v. 83, n. 5, p. 137–145, 2007.
- BOUDABA C, Szabo K. *et al.* Mapeamento fisiológico de entradas inibitórias locais para o hipotálamo para ventricular núcleo. **J Neurosci.**, Oxford, v. 16, p. 7151–7160, 1996.
- BOURQUE, Charles W. Central mechanisms of osmosensation and systemic osmoregulation. **Nat Rev Neurosci.**, London, v. 7, p. 519–31, 2008.
- CARNEIRO, L.; PELLERIN, L. MCTS e regulação do peso. **Obes Ver.**, [s. l.], v. 16, p. 55–66, 2015.
- CHELI, Verônica. T. *et al.* L-type voltage-operated calcium channels contribute to astrocyte activation *In vitro*. **Glia**, [s. l.], v. 64, n. 8, p. 1396–1415, 2016.
- CIURA, Sorana; CHARLES, W. Bourque. 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.**, Oxford, v. 26, n. 35, p. 9069–9075, 2006.
- CIURA, Sorana; CHARLES, W. Bourque. Hypertonicity sensing in organum vasculosum lamina terminalis neurons: a mechanical process involving trpv1 but not trpv4. **J Neurosci.**, Oxford, v. 12, n. 31, p. 14669–76, 2011.
- COSTA, Francineide Fernandes. **Interação central entre óxido nítrico, lactato e as células da glia na modulação comportamental de ingestão de água e sódio em ratos**. 2020. 82 p. Dissertação (Ciências Fisiológicas). Universidade Federal Da Paraíba - UFPB, 2020.
- COZZOLINO, Silvia M. Franciscato. **Biodisponibilidade De Nutrientes**. 4. ed. Barueri, Sp: Manole, 2012.

DELPIRE, Eric; KENNETH, B. Gagnon. "Water homeostasis and cell volume maintenance and regulation." **Current Topics In Membranes**, [s. l.], v. 81, p. 3–52, 2018.

DOMÈNECH-ESTÉVEZ, E, Baloui H. *et al.* Distribution of monocarboxylate transporters in the peripheral nervous system suggests putative roles in lactate shuttling and myelination. **J Neurosci.**, Oxford, v. 35, n. 10, p. 4151–6, 2015.

GAMRANI, H. *et al.* Plasticidade celular nos núcleos supraóptico e paraventricular após desidratação prolongada no roedor do deserto meriones shawi: estudo imunohistoquímico de vasopressina e GFAP. **Pesquisa do Cérebro**, São Paulo, v. 1375, p. 85–92, 2011.

GOMES, Ana P. *et al.* Declining Nad (+) induces a pseudohypoxic state disrupting nuclear-mitochondrial communication during aging. **Cell**, [s. l.], v. 55, n. 7, p. 1624–38, 2013.

HABER, Michael *et al.* Dinâmica cooperativa de astrócitos e espinha dendrítica nas sinapses excitatórias do hipocampo. **The Journal of Neuroscience**, Oxford, v. 26, n. 35, p. 8881–91, 2006.

DINGLEDINE, R.; HASSEL, B. Glutamato e receptores de glutamato. **Neuroquímica Básica**, São Paulo, v. 15, p. 342–366, 2012

HUANG, Chao *et al.* Existence and distinction of acid-evoked currents in rat astrocytes. **Glia**, [s. l.], v. 58, n. 12, p. 1415–1424, 2010.

KARKI P, Smith K. *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.**, [s. l.], v. 389, n. 2, p. 58–64, 2014.

KURAMOCHI, G. Kobayashi I. Regulation of the urine concentration mechanism by the oropharyngeal afferent pathway in man. **Am J Nephrol.**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 42–7, 2000.

LEIB, David E.; ZIMMERMAN, Christopher A.; KNIGHT, Zachary A. Thirst. **Current Biology**, [s. l.], v. 26, p. 1247–1271, 2016.

LENZ, Kathryn M.; MCCARTHY, Margaret M. A starring role for microglia in brain sex Differences. **Neuroscientist**, [s. l.], v. 21, n. 3, p. 306–21, 2015.

LENZ, Kathryn M.; NELSON, Lars H. Microglia and beyond: innate immune cells as regulators of brain development and behavioral function. **Front Immunol.**, [s. l.], v. 9, 13 p., 2018.

LIU, L.; SIMON, S. A. Capsaicin and nicotine both activate a subset of rat trigeminal ganglion neurons. **American Physiological Society**, Rockville, v. 270, p. 1807–1814, 1996.

MAHMOUD, Shaimaa *et al.* Astrocytes maintain glutamate homeostasis in the CNS by controlling the balance between glutamate uptake and release. **Cells**, [s. l.], v. 8, n. 2, p. 184-190, 2019.

MATSUDA, Takashi *et al.* Distinct neural mechanisms for the control of thirst and salt appetite in the subfornical organ. **Nature Neuroscience**, Inglaterra, v. 20, n. 2, p. 230–241, 2017.

MECAWI, Andre S. *et al.* Developmental programming of thirst and sodium appetite. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, [s. l.], v. 51, p. 1–14, 2015.

MOORE C.; LIEDTKE W. Osmomechanical-sensitive trpv channels in mammals. in: MOORE C. **Neurobiology of trp channels**. Boca Raton (FL): Crc Press/Taylor & Francis. 2017. 600 p.

MORENO-NAVARRETE, José María *et al.* Circulating zonulin, a marker of intestinal permeability, is increased in association with obesity-associated insulin resistance. **Plos One**, USA, v. 7, e37160, 2012.

MOUSSA, Charbel E-H. *et al.* Inhibitors of glutamate transport modulate distinct patterns in brain metabolism. **J Neurosci.**, Oxford, v. 85, n. 2, p. 342–50, 2007.

NEDERGAARD, M. Verkhratsky A. Artifact versus reality--how astrocytes contribute to synaptic events. **Glia**, [s. l.], v. 60, n. 7, p. 1013–1023, 2012.

NODA, Masaharu; HIYAMA, Takeshi Y. Sodium sensing in the brain. **Eur J Physiol.**, [s. l.], v. 467, p. 465–474, 2015.

PARNIS, J. *et al.* Mitochondrial exchanger NCLX plays a major role in the intracellular Ca²⁺ signaling, gliotransmission, and proliferation of astrocytes. **J Neurosci.**, Oxford, v. 33, n. 17, p. 7206–7219, 2013.

PEREA, Gertrudis; ARAQUE Alfonso. Glial calcium signaling and neuron-glia communication. **Cell Calcium**, [s. l.], v. 38, n. 4, p. 375–382, 2005.

PIERRE, K. Pellerin. Transportadores monocarboxilatos no sistema nervoso central: distribuição, regulação e função. **J Neurochem**, [s. l.], v. 94, n. 1, p. 1–14, 2005.

PINHEIRO, Paulo S.; MULLE, Christophe. Presynaptic glutamate receptors: physiological functions and mechanisms of action. **Nat Rev Neurosci**. Inglaterra, v. 9, p. 423–36, 2008.

RAMÍREZ-BARRANTES, R. *et al.* Perspectives of trpv1 function on the neurogenesis and neural plasticity, **Neural Plasticity**, [s. v.], p. 1–12. 2016.

RIVERA-APONTE, D. E. *et al.* Hyperglycemia reduces functional expression of astrocytic kir4.1 channels and glial glutamate uptake. **Neuroscience**, [s. l.], v. 3, n. 310, p. 216–223, 2015.

ROSE, C. R.; CHATTON, J. Y. Astrocyte sodium signaling and neuro-metabolic coupling in the brain. **Neuroscience**, [s. l.], v. 323, p. 121–34, 2016.

RUGGIERO, Rafael N. *et al.* Neurotransmissão glutamatérgica e plasticidade sináptica: aspectos moleculares, clínicos e filogenéticos. **Medicina**, São Paulo, v. 44, n. 2, p. 143–156, 2011.

SCHOUSBOE, Arne *et al.* Glutamate Metabolism in the Brain Focusing on Astrocytes. **Adv Neurobiol.**, [s. l.], v. 11, p. 13–30, 2014.

SCHUMACHER, Mark A. Transient receptor potential channels in pain and inflammation: therapeutic opportunities. **Pain Pract.**, [s. l.], v. 10, n. 3, p. 185–200, 2010.

SOFRONIEW, Michael V.; VINTERS, Harry V. Astrocytes: biology and pathology. **Acta Neuropathol**, [s. l.], v. 119, n. 1, p. 7–35, 2010.

SOUZA MM, Vechiato *et al.* Effects of hyperosmolality on hypothalamic astrocytic area, mrna expression and glutamate balance in vitro. **Neuroscience**, [s. l.], v. 442, p. 286–295, 2020.

SZALLASI, Arpad. The vanilloid receptor trpv1: 10 years from channel cloning to antagonist proof-of-concept. **Nat Rev Drug Discov.**, [s. l.], v. 6, n. 5, p. 357–72, 2007.

VASCONCELOS, Karina Giardi do Carmo. **Modulação da produção de lactato por células de schwann infectadas pelo mycobacterium leprae e sua implicação na neuropatia hansênica.** 2016. 82 p. Dissertação (Biologia Molecular). Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2016.

VERBALIS, Joseph G. Disorders of body water homeostasis. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.**, [s. l.], v. 17, n. 4, p. 471–503, 2003.

VERKHRATSKY, Alexei; RODRÍGUEZ, José J.; STEARDO, Luca. Astroglipathology: a central element of neuropsychiatric diseases?. **Neuroscientist**, [s. l.], v. 20, n. 6, p. 576–588, 2014.

VESCE S, Bezzi P.; VOLTERRA, A. Transmissão Sináptica com a Glia. **Physiol Sci.**, [s. l.], v. 16, p. 178–84, 2001.

VOLTERRA, Andrea; MELDOLESI, Jacopo. Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. **Nat Rev Neurosci.**, Inglaterra, v. 6, n. 8, p. 626–40, 2005.

WALTON, Heather Scott; DODD, Petter R. Glutamate-glutamine cycling in Alzheimer's disease. **Neurochem Int.**, [s. l.], v. 50, n. 7, p. 1052–66, 2007.

WELLMANN, Mario *et al.* Astroglial ca²⁺-dependent hyperexcitability requires p2y1 purinergic receptors and pannexin-1 channel activation in a chronic model of epilepsy. **Front Cell Neurosci.**, [s. l.], v. 12, n. 446, 12 p., 2018.

WOTUS, Cherly *et al.* Regulation of corticosterone production by vasopressin during water restriction and after drinking in rats. **Neuroendocrinology**, [s. l.], v. 78, n. 6, p. 301-11, 2003.

ANEXO A – APROVAÇÃO EMENDA CEUA

SEI/UNIFAL-MG - 0826282 - Despacho Administrativo https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador.php?acao=documento_impe...



Ministério da Educação
Universidade Federal de Alfenas
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700 - Bairro centro, Alfenas/MG - CEP 37130-001
Telefone: (35) 3701-9000 - <http://www.unifal-mg.edu.br>

DESPACHO ADMINISTRATIVO Nº 30/2022/COMISSAO-CEUA/REITORIA

Alfenas, na data da assinatura.

Ao(À) Marília Gabriella Alves Goulart Pereira, Sílvia Graciela Ruginsk Leitão
Interessado(a): Marília Gabriella Alves Goulart Pereira, Sílvia Graciela Ruginsk Leitão

Assunto: Despacho administrativo.

Prezada Profª Marília,

A comissão analisou sua solicitação de emenda neste processo e considerou deferido seu pedido.

Atenciosamente,

Pollyanna Francielli de Oliveira
Coordenadora CEUA



Documento assinado eletronicamente por **Pollyanna Francielli de Oliveira, Professor do Magistério Superior**, em 27/09/2022, às 16:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0826282** e o código CRC **65187883**.

Referência: Processo nº 23087.014948/2022-59 SEI nº 0826282

1 of 1 28/09/2022 07:53