

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS –
BIOQUÍMICA

**CARACTERIZAÇÃO MORFOFUNCIONAL DE CULTURA DE ASTRÓCITOS
ADULTOS**

Débora Guerini de Souza

Orientador: Dr. André Quincozes dos Santos

Co-orientador: Dr. Diogo Onofre Souza

Porto Alegre

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS –
BIOQUÍMICA

CARACTERIZAÇÃO MORFOFUNCIONAL DE CULTURA DE ASTRÓCITOS
ADULTOS

Débora Guerini de Souza

Orientador: Dr. André Quincozes dos Santos

Co-orientador: Dr. Diogo Onofre Souza

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.

Porto Alegre

2012

CIP - Catalogação na Publicação

Souza, Débora Guerini de
Caracterização morfofuncional de cultura de
astrócitos adultos / Débora Guerini de Souza. -- 2012.
79 f.

Orientador: André Quincozes-Santos.
Coorientador: Diogo Onofre Souza.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2012.

1. astrócitos adultos. 2. cultura de células. 3.
marcadores gliais. I. Quincozes-Santos, André,
orient. II. Souza, Diogo Onofre, coorient. III.
Título.

*“Porque onde estiver o vosso tesouro,
aí estará também o vosso coração”*

Dedico esta dissertação aos meus tesouros.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Ângela e Olcei, as melhores pessoas que conheço e que mais amo. Obrigado por todo incentivo e torcida, por todo esforço que fizeram pela minha formação e pela minha felicidade.

À minha irmã Carolina, que me introduziu no mundo da pesquisa, no Departamento de Bioquímica e no Laboratório 28.

Ao meu irmão Leonardo, pelo constante aprendizado no convívio, pela parceria e por estar sempre disposto a ajudar.

Ao meu querido orientador e “chefe”, André Quincozes, por ter “abraçado a causa” e ter sido tão companheiro nesse breve tempo de trabalho. Obrigado de coração por todo o aprendizado, pela ajuda, pelas risadas, pela angústia compartilhada, enfim, por tudo.

Ao meu querido co-orientador Diogo Souza, por ter sempre uma palavra de incentivo e otimismo, pelos ensinamentos, pelas oportunidades e pelo convívio prazeroso nestes anos.

Aos meus queridos “co-orientadores extra-oficiais” Marcelo Ganzella, Gisele Hansel e Júlia Moreira, sempre dispostos a ajudar, a ensinar, a colaborar e, claro, farrear. Um super obrigado por terem contribuído cientificamente e divertidamente na minha formação.

Ao pessoal dos laboratórios 26 e 28, por todo apoio e convívio prazeroso nestes anos... Em especial para os profs Roska e Lisi, a Denise, o Robert, o Viti, a Maria Elisa, o Hud, o Edy, o Dudu, a Cla, o Russo, a Ana Ardais, a Fezinha, a Bina, a Gabi, o Marcelo Costa, o Paulo, o Giordano, o Jean, o André Tonon enfim, todos que fazem dos labs 26 e 28 os melhores da Bioquímica!!!

À querida Bruna Bellaver, pela ajuda, pelo convívio e por também ter “abraçado a causa”.

Às queridas “flowers” que fazem meus dias muito mais alegres: Eloisa Comiran, Fer Bonatto, Ju Gnoatto, Cati Antunes, Kívia Belleboni,

Aos meus amigos queridos que os compromissos do mestrado afastaram dos olhos, mas nunca do coração: Ju Medeiros, Lucas Ladwig, Élen Carboni, Camila Adriana, Marta Prado, Ale Madalosso e Elis Mello.

Ao meu amor Cristófer, pelo apoio, paciência, carinho e incentivo.

Ao pessoal do biotério, da portaria e da secretaria do departamento, por serem tão eficientes e solícitos.

Dedico essa dissertação também à memória do prof. Perry, um querido e admirável mestre.

ÍNDICE

PARTE I	1
RESUMO	2
ABSTRACT	3
LISTA DE ABREVIATURAS	4
1. INTRODUÇÃO	6
1.1 CÉLULAS GLIAIS – OS ASTRÓCITOS	6
1.2 CULTURAS DE ASTRÓCITOS	11
1.3 MARCADORES ASTROCITÁRIOS	12
1.3.1 PROTEÍNAS DE CITOESQUELETO: PROTEÍNA GLIAL FIBRILAR ÁCIDA (GFAP) E VIMENTINA	12
1.3.2 PROTEÍNAS INTRACELULARES: S100B E ALDH1L1	13
1.3.3 GLUTAMINA SINTETASE	14
2. METABOLISMO GLUTAMATÉRGICO	14
2.1 CAPTAÇÃO DE GLUTAMATO	15
2.2 DESTINOS DO GLUTAMATO	16
2.2.1 SÍNTESE DE GLUTAMINA	16
2.2.2 SÍNTESE DE GSH	17
2.2.3 CICLO DOS ÁCIDOS TRICARBOXÍLICOS	17
3. RADICAIS LIVRES	18
4. OBJETIVOS	20
4.1 OBJETIVO GERAL	20
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20

PARTE II	21
CAPÍTULO I – ARTIGO CIENTÍFICO	22
PARTE III	58
DISCUSSÃO	59
PERSPECTIVAS	68
REFERÊNCIAS	69

PARTE 1

RESUMO

O uso de culturas de células do Sistema Nervoso Central é extensivamente aplicado na compreensão dos mecanismos celulares, moleculares e bioquímicos do cérebro, sendo que a maioria dos protocolos utilizados faz uso de animais neonatos para a obtenção das células. Neste estudo, propomos e caracterizamos um protocolo de obtenção de cultura de astrócitos corticais de ratos Wistar adultos, de 90 dias de idade. Para a elaboração da cultura, os cérebros foram cuidadosamente dissecados e o córtex foi dissociado mecanicamente e enzimaticamente com tripsina e papaína. As células foram cultivadas com DMEM/F12 (10% SFB) nas duas primeiras semanas e DMEM/F12 (20% SFB) nas últimas semanas. Ao final deste período, as células apresentavam morfologia poligonal caracteristicamente astrocitária, extensiva marcação para a Proteína Glial Fibrilar Ácida (GFAP) e para a Glutamina Sintetase (GS), ambas importantes marcadores gliais. Também foi avaliada a captação de glutamato, a atividade da GS e o conteúdo de glutatona (GSH). Ainda, verificamos a expressão de outras proteínas características de astrócitos, como vimentina, S100B e ALDH1L1, além dos transportadores glutamatérgicos GLAST e GLT-1. Sob exposição ao H_2O_2 e Zn^{2+} , podemos verificar que os astrócitos são suscetíveis ao estresse oxidativo, o qual pode causar alterações morfológicas e funcionais. Também, verificamos que estas células são suscetíveis a estímulos inflamatórios. Assim, concluímos que o protocolo proposto é efetivo para gerar uma cultura funcional e caracteristicamente astrocitária, utilizando-se ratos adultos, os quais já têm conexões celulares estabelecidas, ao contrário dos neonatos, que estão ainda no processo de formação das células e conexões. Isto pode representar um importante modelo de estudo para doenças neurodegenerativas, neurotoxicidade e neuroproteção, visto que astrócitos adultos cultivados *in vitro* apresentam características mais similares ao cérebro adulto *in vivo*, e podem ser usados para se obter respostas mais fidedignas aos estímulos aos quais serão submetidos.

ABSTRACT

The use of cell cultures of central nervous system is extensively applied to understand the cellular, molecular and biochemical mechanisms of the brain, and most part of the protocols makes use of newborns to obtain cells. In this study we have characterized a protocol to obtain astrocyte cultures of adult Wistar rats, 90 days old. For the preparation of culture, brains were carefully dissected and the cortex was dissociated mechanically and enzymatically with trypsin and papain. The cells were cultured with DMEM/F12 (10% FBS) in the first two weeks and DMEM/F12 (20% FBS) until it reaches confluence. Thereafter, the cells presented typical polygonal morphology of astrocytes, extensive marking for glial fibrillary acidic protein (GFAP) and Glutamine Synthetase (GS), both important glial markers. We also evaluated glutamate uptake, GS activity and intracellular levels of glutathione (GSH). We observed the expression of other characteristic proteins of astrocytes, such as vimentin, S100B, ALDH1L1 and, in addition, the main glutamate transporters in the brain, GLT-1 and GLAST. Upon exposure to H₂O₂ and Zn²⁺, we found that astrocytes are susceptible to oxidative stress, which may cause morphological and functional changes. Also, we found that these cells are susceptible to inflammatory stimuli. Thus, we conclude that the proposed protocol is effective to generate a functional and characteristic astrocytic culture, using adult rats, which already have established neural connections compared to newborns. This may represent an important study model for neurodegenerative diseases, neuroprotection and neurotoxicity, as adult astrocytes cultured *in vitro* have similar characteristics to the adult brain *in vivo*, and can be used to obtain more reliable responses to stimuli to which they will be exposed.

LISTA DE ABREVIATURAS

ALDH1L1: Aldeído Desidrogenase 1, membro L1

ATP: Adenosina Trifosfato

BDNF: Fator Neurotrófico Derivado do Encéfalo, do inglês “Brain-Derived Neurotrophic Factor”

BHE: Barreira Hemato-Encefálica

DCFH-DA: 2' 7'-Diclorofluoresceína diacetato

EAAC1: Carreador de Aminoácidos Excitatórios 1, do inglês “Excitatory Amino Acid Carrier 1”

ERO: Espécies Reativas de Oxigênio

FGF: Fator de Crescimento de Fibroblastos, do inglês “Fibroblast Growth Factor”

GFAP: Proteína Glial Fibrilar Ácida, do inglês “Glial Fibrillary Acidic Protein”

GLAST: Transportador Glutamato-Aspartato, do inglês “Glutamate-Aspartate Transporter”

GLT-1: Transportador de Glutamato - 1

GS: Glutamina Sintetase

GSH: Glutationa reduzida

LPA: Ácido Lisofosfatídico

MCTs: Transportadores de Ácidos Monocarboxílicos

MEC: Matriz Extra-Celular

NGF: Fator de Crescimento do Nervo, do ingles "Nerve Growth Factor"

NMDA: N-Metil-D-Aspartato

NT-3: Neurotrofina-3

SNC: Sistema Nervoso Central

SOD: Super Óxido Dismutase

INTRODUÇÃO

1. O SISTEMA NERVOSO CENTRAL

O Sistema Nervoso Central (SNC) é composto, principalmente, por dois grandes tipos celulares: os neurônios, responsáveis pela transmissão e processamento de informações, e as células gliais, que possuem diversos papéis e garantem o adequado funcionamento das funções neuronais. Estes dois tipos celulares estão tão intrinsecamente interligados, que acabam tendo inúmeras interações celulares e moleculares, o que culmina com o complexo funcionamento de todo o sistema (Bacci et al, 1999).

1.1 CÉLULAS GLIAIS – OS ASTRÓCITOS

O termo “neuroglia” foi cunhado pelo patologista Rudolf Virchow na década de 1850 e, inicialmente, este tecido foi considerado como sendo apenas preenchedor dos espaços entre os neurônios e parte do tecido conectivo (Somjen, 1988). Com o passar do tempo e com a evolução das técnicas de estudo das propriedades do SNC, o conhecimento sobre a diversidade e as propriedades das células neurogliais mudou muito. Os astrócitos, uma grande subpopulação deste tipo celular, foram se revelando células envolvidas em um grande número de funções que garantem a manutenção de condições fisiológicas no SNC.

Os astrócitos constituem aproximadamente 50% do número total de células do SNC. Eles são divididos em dois tipos: os protoplasmáticos, na substância cinzenta (freqüentemente ramificados e com largas expansões) e os

fibrosos, na substância branca (com menos ramificações, cilíndricas e longas) (Young, 1991).

Eles estão envolvidos na conservação do equilíbrio dos ambientes intra e extracelulares, particularmente nas atividades envolvendo sistemas de neurotransmissores: os astrócitos são centrais no catabolismo e na síntese de neurotransmissores, visto que possuem a enzima piruvato carboxilase, a única enzima cerebral capaz de repor intermediários para outras reações metabólicas. Além disso, eles possuem uma importante via de comunicação com os neurônios, que é o ciclo glutamato-glutamina: os astrócitos, por possuírem proteínas transportadoras de glutamato de alta afinidade (Danbolt, 2001) (veja a seguir), captam a grande maioria do glutamato extracelular (especialmente o que foi liberado nas comunicações neuronais) e o convertem a glutamina, via enzima glutamina sintetase (GS – EC 6.3.1.2). A glutamina gerada é lançada de volta para terminais pré-sinápticos e é utilizada na síntese *de novo* do neurotransmissor glutamato.

Ainda na questão do equilíbrio intra/extracelular, os astrócitos são as células responsáveis por manter a homeostase iônica: eles estão envolvidos na regulação do equilíbrio ácido-básico, através do metabolismo do CO₂ pela anidrase carbônica. O CO₂ é produzido nos neurônios pelo metabolismo oxidativo do piruvato, e os astrócitos o convertem em íons hidrogênio e bicarbonato. Também, os astrócitos tamponam as concentrações extracelulares de potássio que acumulam com a atividade neural, pois eles expressam canais de potássio nas sinapses e nos processos terminais ao redor dos capilares (Wang & Bordey, 2008). Esta atividade é de suma importância para o equilíbrio eletroquímico dos neurônios, visto que altas

concentrações de potássio no meio extracelular resultam em despolarização neuronal, hiperexcitabilidade e convulsões.

Uma outra importante característica dos astrócitos é estarem numa situação-chave de gerenciamento da energia metabólica utilizada nos processos cerebrais. Neste sentido, podemos citar dois importantes substratos energéticos que os astrócitos utilizam para suprir a energia requerida nos processos neuronais: glicogênio e lactato. Os astrócitos possuem maquinaria enzimática adequada para síntese e degradação de glicogênio e possuem grânulos deste no seu citoplasma, que, apesar da baixa concentração comparada às do fígado e músculo esquelético, serve como repositório de curto prazo para glicose. Estudos evidenciam que esta reserva de glicogênio é de grande importância em condições de hipoglicemia e de demanda energética tecidual aumentada (Brown et al, 2003; Tekkok et al, 2005); (Suh et al, 2007).

Ainda, os astrócitos expressam transportadores de glicose do tipo GLUT1 na membrana dos seus processos celulares adjacentes aos capilares sanguíneos. Desta maneira, eles captam glicose do sangue e a utilizam em parte oxidativamente para gerar ATP e suprir a energia necessária para suas rotas metabólicas, e em parte anaerobicamente, levando a um aumento do lactato intracelular. Um grande número de evidências indica que o lactato seria transferido para o meio extracelular e captado pelos neurônios via transportadores de ácidos monocarboxílicos (MCT's). Dentro do corpo celular neuronal, o lactato seria convertido a piruvato e oxidado no Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos, sendo que alguns estudos indicam que o neurônio teria preferência pelo lactato como substrato energético (Pellerin et al, 2002).

Além disso, a posição estratégica dos astrócitos, que têm seus processos em contato direto tanto com a vasculatura cerebral quanto com as sinapses, faz deles elementos centrais na modulação da atividade sináptica e no fluxo sanguíneo cerebral. Também, a atividade sináptica é capaz de produzir efeitos nos astrócitos que levam à liberação de substâncias vasoativas (Takano et al, 2006).

Em termos de suporte estrutural, já foi demonstrado que os astrócitos são a principal fonte de proteínas de matriz extracelular (MEC) e de moléculas de adesão do SNC. Essa propriedade está diretamente relacionada à promoção ou inibição da criação de neuritos durante o desenvolvimento ou em resposta a lesões, dependendo do balanço entre a MEC e moléculas de adesão. Do mesmo modo, eles são capazes de sintetizar e secretar enzimas proteolíticas, que têm um papel importante na degradação e no remodelamento da MEC, incluindo gelatinases específicas que contribuem na degradação e clearance do peptídeo β -amilóide extracelular (Yin et al, 2006). Sabe-se que deposição de peptídeo β -amilóide leva a formação de placas senis, que é o principal sinal histopatológico da doença de Alzheimer, o que indica aqui a importância dos astrócitos como células envolvidas em atividades neuroprotetoras (Wang & Bordey, 2008).

Além do controle do desenvolvimento de neuritos, os astrócitos liberam moléculas capazes de controlar a maturação, sobrevivência e diferenciação neuronais, como os fatores de crescimento NGF (Nerve Growth Factor), BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor), NT-3 (Neurotrophin-3) e FGF (Fibroblast Growth Factor). Substâncias como a proteína S100B, que estimula crescimento de neuritos e captação de glutamato astrocitária, podem ser liberadas pelos

astrócitos para proteger neurônios contra a excitotoxicidade glutamatérgica (Donato, 2001).

A barreira hemato-encefálica (BHE) é um sistema especializado da microvasculatura endotelial cerebral que protege o cérebro de substâncias tóxicas do sangue, supre o SNC com nutrientes e filtra o excesso de moléculas tóxicas do cérebro para a corrente sanguínea. Estudos demonstraram que os astrócitos estão em íntimo contato com as células endoteliais que formam a BHE e há uma comunicação recíproca entre estes tipos celulares, sendo que os astrócitos podem alterar características como mecanismos de transportes presentes na barreira e as células endoteliais podem alterar o crescimento e a síntese de proteínas astrocíticas.

Em qualquer sistema celular, os níveis redox devem ser rigorosamente controlados, visto que a atividade de diversas proteínas e enzimas é dependente de um equilíbrio estrutural que pode ser afetado pela oxidação causada por radicais livres. Também neste aspecto os astrócitos são de suma importância, pois são os principais produtores da principal defesa antioxidante cerebral: o tripeptídeo glutathiona (GSH) (Dringen, 2000). A GSH também é produzida pelos neurônios, porém o substrato utilizado é prioritariamente fornecido pelos astrócitos, reiterando novamente o papel destas células no equilíbrio redox do sistema. O papel da GSH será discutido em maiores detalhes a seguir.

Além de todas características citadas, os astrócitos ainda desempenham um importante papel no processamento da informação sináptica e na plasticidade e excitabilidade neuronais, sendo que estudos recentes ressaltam a importância da comunicação recíproca neurônio-astrócito. Também, sabe-se

que os astrócitos constituem o terceiro elemento da sinapse, caracterizando a sinapse tripartite (Perea & Araque, 2006). Estas células tão versáteis possuem ainda a robustez que as permite que se reorganizem em uma cultura de células monotípica funcional, com a importante característica da possibilidade de divisão celular até que elas atinjam a confluência.

1.2 CULTURAS DE ASTRÓCITOS

Culturas de astrócitos são extremamente úteis para estudos metabólicos relacionados ao sistema glutamatérgico, estresse oxidativo e resposta inflamatória, tanto no início do desenvolvimento quanto em estados de maior maturidade. Não obstante, nestes casos, cabe observar que os marcadores supracitados e as funções que eles desempenham sofrem alterações durante o envelhecimento.

É importante mencionar que numerosas evidências de alterações nas funções astrocíticas, incluindo mudanças na homeostase redox e no metabolismo do glutamato, têm sido relacionadas ao envelhecimento e às doenças neurodegenerativas. Em condições patofisiológicas, os astrócitos sofrem mudanças morfológicas e moleculares dramáticas que podem potencialmente causar tanto efeitos benéficos quanto prejudiciais, dependendo do contexto patológico (Sofroniew, 2009).

Classicamente, culturas de astrócitos de cérebro de roedores têm sido usadas na caracterização de propriedades bioquímicas, farmacológicas e morfológicas do SNC. Culturas primárias de astrócitos apresentam importantes marcadores, tais como as proteínas GFAP (proteína glial fibrilar ácida), S100B e glutamina sintetase (GS).

1.3 MARCADORES ASTROCITÁRIOS

1.3.1 PROTEÍNAS DE CITOESQUELETO: PROTEÍNA GLIAL FIBRILAR ÁCIDA (GFAP) E VIMENTINA

A GFAP é uma proteína constituinte de citoesqueleto de astrócitos, da classe dos filamentos intermediários do tipo III. Os estudos sobre as propriedades desta proteína derivaram de seu isolamento a partir do cérebro de portadores de esclerose múltipla, uma doença neurodegenerativa que tem como característica a gliose reativa (Eng et al, 2000). Esta proteína, de peso molecular aparente de 50kDa, é amplamente utilizada como marcador astrocítico e pode indicar tanto o estado basal, quanto o estado reativo dos astrócitos. Após alguma lesão no SNC, seja ela resultado de patologias, trauma, insulto químico ou doenças genéticas, os astrócitos se tornam reativos e respondem de maneira típica com a astrogliose, que é caracterizada por rápida síntese de filamentos intermediários de GFAP. O estudo da GFAP é mais uma evidência de como os astrócitos respondem de maneira complexa e variada a lesões.

Apesar de a GFAP ser a proteína de citoesqueleto mais característica de astrócitos, cabe ressaltar a importância de um filamento intermediário que está presente no citoesqueleto de astrócitos no início de seu desenvolvimento, a vimentina. Durante o processo de diferenciação, a vimentina vai sendo progressivamente substituída pela GFAP (Bignami et al, 1982; Dahl et al, 1981) *in vivo*, entretanto, em astrócitos primariamente cultivados, a transição vimentina – GFAP é incompleta e elas são, portanto, co-expressas (Bignami & Dahl, 1989; Ciesielski-Treska et al, 1988).

1.3.2 PROTEÍNAS INTRACELULARES: S100B E ALDH1L1

A proteína S100B é um homodímero de 21kDa e faz parte da família de proteínas S100, que foram primeiramente identificadas em extrato cerebral bovino (Moore, 1965). Ela é uma proteína ligante de cálcio produzida e secretada principalmente por astrócitos no SNC, apesar de sua expressão não ser exclusividade de células cerebrais (Donato, 2001; Donato, 2003). A S100B possui atividade tanto intracelular – por exemplo, regulação e diferenciação celular, fosforilação de proteínas, atividade de enzimas, entre outros –, quanto extracelular, sendo esta dependente da concentração, visto que em quantidades nanomolares ela apresenta efeitos tróficos, protege neurônios contra excitotoxicidade glutamatérgica (Goncalves et al, 2008; Tramontina et al, 2006) e aumenta a sobrevivência neuronal e em quantidades micromolares ela exerce efeitos neurotóxicos e induz apoptose (Van Eldik & Wainwright, 2003). A S100B é capaz de inibir a associação de microtúbulos mediada pela fosforilação de proteína Tau, o que pode ser mais um mecanismo de neuroproteção mediado por astrócitos, visto que esta medida evita a hiperfosforilação da proteína Tau, mais uma característica presente na doença de Alzheimer (Yu & Fraser, 2001).

Outro marcador que vem ganhando a atenção dos pesquisadores é uma proteína da família Aldeído Desidrogenase 1, o membro L1 (ALDH1L1 EC 1.5.1.6). Esta, também conhecida como 10-formiltetrahydrofolato desidrogenase, é uma enzima que converte 10-formiltetrahydrofolato a tetrahydrofolato e esta atividade está envolvida na biosíntese *de novo* de nucleotídeos e, portanto, na divisão e crescimento celulares (Krupenko, 2009). Um estudo recente demonstrou que ALDH1L1 é coexpressa na mesma

população de células que expressam o gene do transportador GLT-1, sabidamente exclusivo de astrócitos, e não em população de células que expressam proteínas específicas de neurônios, oligodendrócitos ou microglia (Yang et al).

1.3.3 GLUTAMINA SINTETASE

A glutamina sintetase (GS) é uma enzima que, no SNC, é exclusivamente astrocitária (Norenberg & Martinez-Hernandez, 1979). Ela é a peça chave tanto para a detoxificação da amônia quanto para a comunicação entre os astrócitos e os neurônios, por catalisar, de maneira ATP-dependente, a amidação do glutamato a glutamina. Após o glutamato ser captado pelos transportadores de alta afinidade astrocitários, intracelularmente ele pode seguir três destinos (veja a seguir), sendo um deles a conversão a glutamina e posterior retorno ao neurônio, que a reconverterá a glutamato para uso como neurotransmissor, o que caracteriza o ciclo glutamato-glutamina. Estudos demonstraram que neurônios, terminais sinápticos, oligodendrócitos, células microgliais, pericitos, células endoteliais e outros tipos celulares do SNC não possuem quantidades significativas desta proteína (Norenberg & Martinez-Hernandez, 1979).

2. METABOLISMO GLUTAMATÉRGICO

O glutamato é considerado o principal mediador de sinais excitatórios do sistema nervoso central (SNC) e está envolvido em muitos processos de neuroplasticidade, incluindo aprendizado e memória (Izquierdo & Medina, 1997), desenvolvimento cerebral, envelhecimento (Segovia et al, 2001b), entre

outros. Concomitantemente, sabe-se que inúmeras doenças cerebrais estão relacionadas com a hiperativação do sistema glutamatérgico (excitotoxicidade glutamatérgica) (Danbolt, 2001).

O glutamato ativa receptores ionotrópicos e metabotrópicos, situados em diferentes posições da sinapse excitatória, incluindo o terminal pré-sináptico, pós-sináptico e os astrócitos que dão suporte à sinapse (Danbolt, 2001). Portanto, a concentração de glutamato na sinapse determina a extensão de ativação dos receptores e se suas ações serão fisiológicas ou excitotóxicas. Assim, é de crítica importância que a concentração extracelular de glutamato seja regulada para evitar a hiperativação dos receptores e consequente excitotoxicidade glutamatérgica. Essa regulação se dá predominantemente pela captação de glutamato realizada pelos transportadores glutamatérgicos astrocitários (Anderson & Swanson, 2000).

2.1 CAPTAÇÃO DE GLUTAMATO

Os transportadores de glutamato são expressos em muitos tipos celulares no SNC, incluindo astrócitos, neurônios, oligodendrócitos, microglia e endotélio (Domercq & Matute, 1999; O'Kane et al, 1999) e, destes, a captação astrocitária dependente de sódio é, quantitativamente, a mais importante para a manutenção de níveis extracelulares fisiológicos de glutamato, evitando, assim, seu potencial excitotóxico. Este processo é capaz de concentrar o glutamato intracelular mais de dez mil vezes em comparação ao glutamato extracelular.

Até o momento, cinco transportadores foram identificados no cérebro de ratos. Incluem-se entre eles os transportadores astrocitários GLAST – presente majoritariamente no cerebelo – e GLT-1 – presente majoritariamente no córtex,

hipocampo e putamen caudato (Pines et al, 1992; Storck et al, 1992). O EAAC1, transportador de glutamato expresso em menores quantidades em astrócitos corticais, é expresso majoritariamente em neurônios (Kanai & Hediger, 1992). Transportadores de glutamato não expressos em astrócitos são o EAAT4 (Fairman et al, 1995), identificado em células cerebelares de Purkinje e o EAAT5 (Arriza et al, 1997), expresso na retina.

2.2 DESTINOS DO GLUTAMATO

O glutamato é o aminoácido mais abundante encontrado intracelularmente (concentrações encontradas variam entre 2 e 20mM), enquanto que a glutamina é o aminoácido mais abundante encontrado extracelularmente *in vivo* (0,7mM comparado a em torno de 0,02mM, encontrado para o glutamato) (Newsholme et al, 2003). Intracelularmente, ele pode ter três destinos principais: síntese de glutamina, produção de GSH ou oxidação no ciclo dos ácidos tricarboxílicos.

2.2.1 SÍNTESE DE GLUTAMINA

O glutamato captado pelos astrócitos pode ser convertido a glutamina, que é liberada para o meio extracelular e captada pelos neurônios para reconversão a glutamate (Danbolt, 2001). Este processo é a umas das vias de reciclagem do glutamato e a síntese de glutamina exclusivamente astrocitária deriva do fato de a enzima responsável pela sua produção – glutamina sintetase – ter sido imunocitoquimicamente demonstrada, no cérebro, como sendo exclusivamente astrocitária (Norenberg & Martinez-Hernandez, 1979). Entretanto, sabe-se que nem todas as populações neuronais expressam a

glutaminase ativada por fosfato (Laake et al, 1999; Ottersen et al, 1998), uma enzima mitocondrial que desamina a glutamina a glutamato e já foi observado em experimentos in vivo que a maior parte da glutamina administrada no cérebro é metabolizada a CO₂, o que leva a crer que a maioria da glutamina produzida seja utilizada como um importante substrato energético (Bradford et al, 1978; Hassel & Sonnewald, 1995).

2.2.2. SÍNTESE DE GSH

O tripeptídeo GSH é considerado uma das principais defesas antioxidante do cérebro (Dringen, 2000) e é formado por glutamato, cisteína e glicina. O glutamato é substrato da primeira enzima na via de síntese de GSH, a γ -glutamil-cisteíno sintetase, e os maiores fornecedores de GSH no cérebro são os astrócitos. A GSH exerce seu efeito antioxidante reagindo diretamente (de maneira não-enzimática) com espécies reativas de oxigênio (ERO), ou sofrendo oxidação pela ação da enzima glutathione peroxidase (Pope et al, 2008).

2.2.3 CICLO DOS ÁCIDOS TRICARBOXÍLICOS

Após captação pelos transportadores, o glutamato pode ser diretamente utilizado como fonte de energia pela sua conversão a α -cetoglutarato (por desaminação pela glutamato desidrogenase ou por transaminação por uma das transaminases). O α -cetoglutarato pode ser metabolizado através do ciclo dos ácidos tricarboxílicos a succinato, fumarato e malato, sucessivamente. O malato, posteriormente, pode seguir a via dos ácidos tricarboxílicos, ou pode ser descarboxilado a piruvato e reduzido a lactato (McKenna et al, 1996). O

lactato, então, pode ser exportado para o meio extracelular onde pode ser captado pelos neurônios (Pellerin et al, 2002).

3. RADICAIS LIVRES, ESTRESSE OXIDATIVO E RESPOSTA ANTIOXIDANTE

Radicais livres são estruturas químicas que possuem um de seus elétrons desemparelhados, ou seja, ocupando um orbital atômico ou molecular sozinho, o que confere alta instabilidade e reatividade a toda a estrutura. Estas propriedades tornam o radical livre altamente capaz de se ligar de maneira inespecífica às moléculas circundantes (Halliwell, 2006; Halliwell, 2007). Os radicais livres possuem papéis fisiológicos nas células (especialmente em vias de sinalização celular), mas são mais famosos e estudados pelos seus efeitos deletérios (Forman, 2007). Na mitocôndria, o funcionamento da cadeia de transporte de elétrons, essencial para a geração de ATP, é o mais conhecido processo de geração de radicais livres, sendo que em condições patológicas há um aumento da produção desses radicais (Halliwell, 2007) o que pode causar a oxidação de biomoléculas como lipídeos, proteínas e DNA (Halliwell, 2001).

A alteração do equilíbrio entre a produção de radicais livres (alta) e defesas antioxidantes (baixas) gera o estresse oxidativo (Halliwell, 2006; Halliwell, 2007), o que pode promover adaptação, dano ou morte celular. Se a célula se adapta, ela compensa o estresse com o aumento da síntese de antioxidantes. Quando isso não é possível, ocorre dano a biomoléculas e caso não haja um sistema eficiente de reparo, ocorrerá morte celular (Halliwell, 2001). Muitas doenças neurológicas têm sua fisiopatologia associada a

estresse oxidativo, que pode ser mediado, em parte, pela ativação de receptores glutamatérgicos ionotrópicos do tipo NMDA (Coyle & Puttfarcken, 1993).

Astrócitos adultos apresentam uma redução nas suas defesas antioxidantes, incluindo os níveis de GSH, e exibem mais susceptibilidade ao estresse oxidativo e um aumento nas ERO. Também, a captação de glutamato pode ser inibida pela oxidação direta de transportadores de glutamato e estes eventos estão associados ao envelhecimento e às doenças neurodegenerativas. Recentemente, foi demonstrado que a redução nos níveis de GSH está associada a processos neuroinflamatórios, bastante característico no curso das doenças neurodegenerativas (Lee et al). Assim, podemos inferir que o surgimento de moléculas antioxidantes na terapêutica pode representar avanços na profilaxia e/ou tratamento de doenças cuja origem seja relacionada ao estresse oxidativo.

Desta maneira, o estudo de propriedades astrocitárias no cérebro adulto é de fundamental importância para a compreensão do funcionamento do SNC como um todo e a cultura de células é uma ferramenta de alta relevância neste contexto, visto que se desenvolve de maneira controlada e é capaz de apresentar respostas alvo-específicas para diferentes insultos e agentes terapêuticos.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo foi estabelecer um modelo *in vitro* de cultura de astrócitos adultos de ratos Wistar e avaliar as principais funções astrocitárias relacionadas ao sistema glutamatérgico.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos deste estudo foram:

- Padronizar um protocolo que permitisse a geração de uma cultura funcional de astrócitos adultos;
- determinar a expressão dos principais marcadores gliais;
- comparar a captação de glutamato, atividade da GS e níveis intracelulares de GSH entre cultura primária de astrócitos de ratos Wistar adultos e neonatos;
- avaliar os efeitos do estresse oxidativo em parâmetros glutamatérgicos e medir a produção intracelular de espécies reativas de oxigênio;
- testar se os astrócitos adultos respondem a vias de sinalização responsáveis pela organização do citoesqueleto e a condições inflamatórias.

PARTE II

CAPÍTULO I

Artigo a ser submetido ao periódico GLIA

Characterization of adult astrocytes primary cultures: focus on glutamate metabolism.

Débora Guerini de Souza, Bruna Bellaver, Diogo Onofre Souza, André Quincozes-Santos

Characterization of adult astrocytes primary cultures: focus on glutamate metabolism.

Débora Guerini de Souza, Bruna Bellaver, Diogo Onofre Souza, André
Quincozes-Santos*

Department of Biochemistry, Institute of Basic Health Sciences, Federal University of
Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

*André Quincozes-Santos, PhD
Departamento de Bioquímica
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Rua Ramiro Barcelos, 2600 – Anexo
Bairro Santa Cecília
90035 –003 Porto Alegre, RS, Brazil
Fax: +55 51 3308 5535 Phone: +55 51 3308 5559
E-mail: andrequincozes@yahoo.com.br

Abstract

Astrocytes are the main class of glial cells, serving a wide range of adaptive functions in the central nervous system (CNS). These cells regulate neurotransmitter systems, synaptic processing, ionic homeostasis, antioxidant defenses and energy metabolism. Astrocytes are responsible for major glutamate transport and regulate extracellular levels of glutamate. The synthesis of glutamine and glutathione (GSH) are two important destinations for glutamate. Cultures of astrocytes from rodent brain have been used extensively characterizing biochemical, pharmacological and morphological properties of CNS. The aim of this study is characterizing the adult astrocytes primary cultures from Wistar rats, focusing on glutamatergic metabolism. Adult astrocytes, in basal conditions, present polygonal to fusiform and flat morphology. These cells also present the main glial markers, such as GFAP, glutamate transporter, glutamine synthetase and S100B. Moreover, astrocytes are able to take up glutamate and convert it into glutamine and GSH. Changes in oxidative stress were observed and neuroprotective ability is diminished in adult astrocytes. The response to inflammatory stimulus was also observed and changes in actin cytoskeleton were induced in stimulated astrocytes. These findings indicate that culture model described here exhibit biochemical and physiological astrocytes properties and it may be useful for understanding of mechanisms related to adult and aging brain, as well as, compounds related to neurotoxicity and neuroprotection.

Introduction

Astrocytes are key cells in the maintenance of physiological and pathological conditions in the central nervous system (CNS) (Maragakis and Rothstein 2006; Nedergaard et al. 2003; Wang and Bordey 2008). They are involved in maintenance of extracellular environment and stabilization of cell-cell communications in the CNS (Maragakis and Rothstein 2006). Astrocytes have been shown to be involved in the regulation of the brain, in particular regarding neurotransmitter systems and ionic homeostasis; metabolic support for neurons; regulation of energy metabolism; synaptic information processing, plasticity and neuronal excitability; detoxification; defense against oxidative stress; metal sequestration; maintenance of the blood-brain barrier; guidance of neuronal migration and immune function (Belanger et al. ; Kettenmann and Verkhratsky 2008). These versatile cells are, in addition, the most resilient cells in the CNS.

Classically, cultures of astrocytes from rodent brain have been used extensively characterizing biochemical, pharmacological and morphological properties of CNS (Booher and Sensenbrenner 1972; Skytt et al.). Primary culture of astrocytes presents important markers, such as GFAP (glial fibrillary acidic protein), S100B and glutamine synthetase (GS) proteins (Bak et al. 2006; Donato et al. 2009; Menet et al. 2001; Westergaard et al. 1995). These markers undergo changes in aging (Gottfried et al. 2002; Menet et al. 2001; Pertusa et al. 2007), which also promotes changes in the functions mentioned above. Moreover, astrocyte cultures are extremely useful for metabolic studies related to glutamatergic system, oxidative stress and inflammatory response (Chen and Swanson 2003; Duan et al. 1999). It is important to mention that numerous evidences on alterations in astrocyte function during aging and neurodegenerative diseases have been related to changes in redox homeostasis and glutamate metabolism (Gottfried et al. 2002; Klamt et al. 2002; Pertusa et al. 2007).

Astrocytes are the cell type that is mainly responsible for clearing extracellular glutamate, due to its high-affinity glutamate transporters (Anderson and Swanson 2000; Danbolt 2001; Duan et al. 1999). The modulation of

extracellular glutamate determines whether their actions will be physiological or excitotoxic. Glutamate is the main mediator of excitatory signaling in the CNS and plays an important role in neural plasticity and neurotoxicity. After the glutamate be taken up by astrocytes, it is converted into glutamine by the enzyme GS (EC 6.3.1.2) (Hertz and Zielke 2004; Mates et al. 2002). Astrocytes then release glutamine onto glutamatergic and GABAergic terminals and it is again converted to glutamate; this system is called glutamate-glutamine cycle (Hertz and Zielke 2004; Magistretti and Pellerin 1997; Magistretti and Pellerin 2000). Glutamate uptake is also important for maintaining glutathione (GSH) levels (Hertz and Zielke 2004; Mates et al. 2002; Raps et al. 1989). GSH is the major antioxidant molecule of the brain. Both astrocytes and neurons can synthesize GSH tripeptide (γ -L-glutamyl-L-cysteinylglycine), but neurons are highly dependent on astrocytes for supply of the precursor amino acids necessary for their own GSH synthesis (Dringen 2000; Dringen et al. 1999; Hertz and Zielke 2004; Raps et al. 1989).

Adult astrocytes *in vivo* decrease antioxidant defenses, including GSH levels, exhibiting more susceptibility to oxidative stress and an increase in reactive oxygen species (ROS) (Lin et al. 2007; Pertusa et al. 2007). In addition, glutamate uptake can be inhibited by the direct oxidation of glutamate transporters and all these events are associated to aging and neurodegenerative disorders (Lee et al. ; Trotti et al. 1998; Volterra et al. 1994) (Lauderback et al. 2001). In this context, the aim of this study was to establish an *in vitro* model of astrocyte adult culture from Wistar rats and to evaluate the main astrocytic functions associated to glutamatergic system. First, we determined the expression of GFAP, GS, S100B, vimentin and aldehyde dehydrogenase family 1, member L1 (ALDH1L1 – EC 1.5.1.6). Secondly, we compared the glutamate uptake, GS activity and GSH intracellular levels between astrocytes primary cultured of newborns and adults Wistar rats. Next, we evaluated the effect of oxidative stress on glutamate parameters and measured intracellular ROS production. Finally, we tested whether cell cultures respond to cytoskeleton signaling pathways and inflammatory conditions.

Materials and Methods

Reagents

Dulbecco's Modified Eagle's Medium/F12 and other materials for cells culture were purchased from Gibco. Papain and H₂O₂ were from Merck. DNase, cysteine, albumin, ZnCl₂, polyclonal anti-β tubulin III, polyclonal anti-Glutamine Synthetase, monoclonal anti-S100B, monoclonal anti-vimentin, polyclonal anti-nestin, o-phthalaldehyde, lysophosphatidic acid (LPA), (2'-7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFHDA), propidium iodide (PI), γ-glutamylhydroxamate were from Sigma-Aldrich. SB203580 and 4',6'-diamino-2-phenylindole (DAPI) were from Calbiochem. Polyclonal anti-GFAP was from Dako; monoclonal anti-NeuN was from Millipore; monoclonal anti-CD11 was from Invitrogen; polyclonal anti-GLAST, polyclonal anti-GLT1 and polyclonal anti-EAAC1 were from Alpha Diagnostic; monoclonal anti-Aldehyde dehydrogenase family 1 member L1 was from Neuromab; monoclonal anti-GAPDH was from Chemicon. L-[³H]-glutamate, nitrocellulose membrane and ECL kit were purchased from Amersham. Alexa Fluor® 488 (A_{max}=493; E_{max}=519) or 594 (A_{max}=591; E_{max}=614)-conjugated AffiniPure antibodies were purchase from Jackson ImmunoResearch. All other chemicals were purchased from common commercial suppliers.

Session 1 – Cell culture

1.1 Primary adult astrocyte culture

This procedure was carried out in accordance with the NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and was approved by the local authorities. Male Wistar rats (90 days) had their entire cortex dissected aseptically, separated from hippocampus, striatum and white matter. During dissection, the cortices were kept in HBSS containing 0.05% trypsin and 0.003% DNase. Next, this solution was kept at 37°C for 15 min. After, tissue was mechanically dissociated with Pasteur Pipette for more 15 min, and centrifuged at 1000 RPM for 5 min. The pellet was resuspended in a solution of HBSS containing 40 U papain/ml, 0.02% cysteine and 0.003% DNase and again mechanically dissociated for 15 min, gently, with Pasteur Pipette. After another centrifugation (1000 RPM, 5

min), cells were resuspended in HBSS containing only DNase 0.003% and left for decantation during 30 – 40 min. Supernatant was collected and centrifuged for 7 min, 1000 RPM. Cells were resuspended in DMEM/F12 containing 10% fetal bovine serum (FBS), 15 mM HEPES, 14.3 mM NaHCO₃, 1% fungizone and 0,04% gentamicyn, plated in 6 or 24-well plates pre-coated with poli-L-lisine and cultured at 37°C in a 95% air/5% CO₂ incubator. Were seeded 3 – 5 x 10⁵ cells/cm². Some tests were made to evaluate the need of two enzymatic digestions and the need of two moments of mechanic dissociation until we came to this final protocol. Cysteine is required as a starter of papain activity.

1.2 Cell culture maintenance

First medium exchange occurred 24 h after culture obtention. At the first week, medium change occurred once every two days and from the second week on, once every four days. From the third week on, cells received medium supplemented with 20% FBS. Around 4th to 5th week, cells were used for experiments. No dbcAMP was added into the culture medium.

1.3 Primary newborn astrocyte culture

Cerebral cortices of newborn Wistar rats (1 – 2 days old) were removed, cleaned of meninges and mechanically dissociated in the presence of trypsin. This procedure was prepared as previously described by (Gottfried et al. 1999), with some modifications.

Session 2 - Experiments

2.1 Hydrogen peroxide and ZnCl₂ treatments

After cells reached the confluence, the culture medium was removed and cells were exposed to H₂O₂ (50 and 100 µM) for 1, 3 or 6 h. We performed an acute experiment also, exposing cells to 1mM H₂O₂ for 1 h. During incubations, cells were maintained at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂/95% air.

In another set of experiments and also after cells reached confluence, we evaluate the effects of ZnCl₂ exposure to the cells and the possible involvement of the Rho A signaling pathway in these effects. Cells were incubated with 50

μM ZnCl_2 in the presence or absence of 2 μM lysophosphatidic acid (LPA), which was added 30 minutes before the treatment.

2.2 Immunocytochemistry

Immunocytochemistry was performed as described previously (Brozzi et al. 2009). Briefly, cells cultured were fixed with 4% paraformaldehyde for 20 min and permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS for 5 min at room temperature. After blocking overnight with 4% albumin, cells were incubated overnight with anti-GFAP (1:400), anti-Glutamine synthetase (1:10000), anti- β -tubulin III (1:500), anti-NeuN (1:50), anti-CD11 (1:400), anti-nestin (1:100) at 4°C, followed by PBS washes and incubation with specific secondary antibody conjugated with Alexa Fluor® 488 (green staining) or 594 (red staining), for 1 h at room temperature. In all immunostaining-negative controls, reactions were performed by omitting the primary anti-body. No reactivity was observed when the primary antibody was excluded. Nucleus of cells was stained with 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Cells were viewed with a Nikon inverted microscope and images transferred to a computer with a digital camera (Sound Vision Inc., USA).

2.3 Western blot analyses

In order to confirm the presence of specific proteins, we performed the Western blot analyses. Briefly, cells were removed from plates after reached the confluence with a lyses solution of (in mM): 347 SDS, 100 EDTA, 500 TRIS-HCl pH 6.8. Protein was measured and samples were standardize with sample buffer [62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 4% (v/v) glycerol, 0.002% (w/v) bromophenol blue] and boiled at 95°C for 5 minutes. After, they were loaded in the gels (50 μg protein), together with a positive control (rat whole cortex homogenate), submitted to electrophoresis in SDS-polyacrylamide gel and blotted onto a nitrocellulose membrane. Adequate loading of each sample was confirmed with Ponceau S staining. After blocking with 4% albumin for 2h, membranes were incubated overnight with one of the following antibody: anti-vimentin (1:400), anti-S100B (1:2000), anti-GFAP (1:1000), anti-glutamine synthetase (1:20000), anti-GLT1 (1:2000), anti-GLAST (1:2000), anti-EAAC1 (1:2000), anti-ALDH1L1 (1:1000), anti-GAPDH (1:300), anti- β tubulin III (1:1500), anti-nestin (1:500).

After incubating overnight with the primary antibody at 4°C, membranes were washed and incubated with peroxidase-conjugated anti-rabbit immunoglobulin (IgG) – in the case of the following antibodies: anti -nestin, -GLT1, -GLAST, -EAAC1, -GS, - β tubulin III and -GFAP – or with peroxidase-conjugated anti-mouse immunoglobulin (IgG) – in the case of the following antibodies: anti -ALDH1L1, - vimentin, -GAPDH, -S100B – at a dilution of 1:2000 overnight. GAPDH was used as a loading control, but our interested was only identify the presence of proteins. The chemiluminescence signal was detected using ECL kit and a Kodak film.

2.4 Glutamate uptake

Glutamate uptake was performed as previously described (Gottfried et al. 2002) with some modifications. Briefly, astrocytes were incubated at 37°C in a Hank's balanced salt solution (HBSS) containing (in mM): 137 NaCl, 5.36 KCl, 1.26 CaCl₂, 0.41 MgSO₄, 0.49 MgCl₂, 0.63 Na₂HPO₄ . 7H₂O, 0.44 KH₂PO₄, 4.17 NaHCO₃, and 5.6 glucose, adjusted to pH 7.4. The assay was started by the addition of 0.1 mM L-glutamate and 0.33 μ Ci/ml L-[2,3-³H] glutamate. The incubation was stopped after 7 min by removal of the medium and rinsing the cells twice with ice-cold HBSS. The cells were then lysed in a solution containing 0.5 M NaOH. Radioactivity was measured in a scintillation counter. Sodium-independent uptake was determined by using N-methyl-D-glucamine instead of sodium chloride. Sodium-dependent glutamate uptake, considered the "specific uptake", was obtained by subtracting the non-specific uptake of the total uptake.

2.5 Glutamine synthetase activity

The enzymatic assay was performed as previously described (dos Santos et al. 2006), after cells reached confluence. Briefly, homogenate of cells (0.1 ml) was added to 0.1 ml of the reaction mixture containing (in mM): 10 MgCl₂, 50 L-glutamate, 100 imidazole-HCl buffer (pH 7.4), 10 2-mercaptoethanol, 50 hydroxylamine-HCl, and 10 ATP, and incubated for 15 min at 37°C. The reaction was stopped by the addition of 0.4 ml of a solution containing (in mM): 370 ferric chloride, 670 HCl, and 200 trichloroacetic acid. After centrifugation, the absorbance of the supernatant was measured at 530 nm and compared to

the absorbance generated by standard quantities of γ -glutamylhydroxamate treated with ferric chloride reagent.

2.6 Glutathione content

GSH levels were assessed as previously described (Browne and Armstrong 1998), after cells reached confluence. Astrocytes homogenates were diluted in 10 volumes of 100 mM sodium phosphate buffer, pH 8.0, containing 5 mM EDTA and the protein was precipitated with 1.7% meta-phosphoric acid. Supernatant was assayed with o-phthaldialdehyde (1 mg/ml methanol) at room temperature for 15 min. Fluorescence was measured using excitation and emission wavelengths of 350 and 420 nm, respectively. A calibration curve was performed with standard GSH solutions (0–500 μ M). GSH concentrations were calculated as nmol/mg protein.

2.7 Cell morphology and viability – MTT and PI assays

Morphological studies were performed using phase contrast optics and cells were photographed or used in fixed labeling studies. Cellular damage was assessed by fluorescent image analysis (Nikon inverted microscope using a TE-FM Epi-Fluorescence accessory) of PI uptake (PI, at 7.5 μ M) (dos Santos et al. 2006), at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂/95% air in DMEM/F12 5% FBS. Cell viability was determined by 3-(4,5-dimethyl-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay. Briefly, 0.05 mg/ml of MTT was added to the medium of incubation. After 3 hours of incubation, the medium from each well was gently removed by aspiration and dimethylsulfoxide (DMSO) was added to each well followed by incubation and shaking for 5 min. The formazan product generated during the incubation was solubilized in DMSO and measured at 560 and 650 nm. Only viable cells are able to reduce MTT.

2.8 Intracellular ROS production

Intracellular ROS production was detected using the nonfluorescent cell permeating compound, 2'-7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFHDA), on cells treated with H₂O₂ 50 μ M or in basal conditions. DCFH-DA is hydrolyzed by intracellular esterases to dichlorofluorescein (DCFH), which is trapped within the cell. This nonfluorescent molecule is then oxidized to fluorescent

dichlorofluorescein (DCF) by the action of cellular oxidants. Astrocytes were treated with DCFH-DA (10 μ M) for 30 min at 37°C. Following DCFH-DA exposure, the cells were scraped into PBS with 0.2% Triton X-100. The fluorescence was measured in a plate reader (Spectra Max M5, Molecular Devices, USA) with excitation at 485 nm and emission at 520 nm (Quincozes-Santos et al. 2009).

2.9 Cytoskeleton analyses – actin labeling

For actin-labeling analysis, pre-confluent cells cultured were exposure to H₂O₂, H₂O₂ + SB203580, ZnCl₂ and ZnCl₂ + LPA. After, cells were fixed for 20 min with 4% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS), rinsed with PBS, and permeabilized for 10 min in PBS containing 0.2% Triton X-100, followed by incubation with 10 μ g/ml rhodamine-labeled phalloidin in PBS for 45 min and washed twice with PBS. Astrocytes were analyzed and photographed with a Nikon microscope using a TE-FM Epi-Fluorescence accessory. The compound SB203580 is a specific inhibitor of p38 MAPK signaling pathway.

2.10 Tumor necrosis factor alpha (TNF- α) measurement:

Tumor necrosis factor alpha assay was carried out in 100 μ L of extracellular medium, using a rat TNF α ELISA from PeproTech (USA).

2.11 Protein assay

Protein content was measured by Lowry's method using bovine serum albumin as standard (Lowry et al. 1951).

2.12 Statistical analyses

Data from the experiments were analyzed statistically by Student-t test or by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by the Tukey's Test. Values of $P < 0.05$ were considered to be significant. All analyses were carried out using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS) software version 15.0.

Results

Glial markers expressed in adult astrocytes

Astrocytes possess specific cytoarchitectural to respond to changes in their microenvironment, developing adequately their functions (Belanger et al.). Our results showed that adult astrocytes, in basal conditions, present polygonal to fusiform and flat morphology (Fig. 1A, B), analyzed with phase-contrast microscopy. Moreover, these cells were able to divide until are reached the confluence, about 4th or 5th weeks and we did not observe any morphological alterations or significant cell death in this time (data not shown).

The main markers of astrocytes were also determined in adult astrocytes primary cultured. The expression of cytoskeleton GFAP protein was evaluated by immunocytochemistry (Fig. 2A, B); showing intense cytoplasmic immunolabeling to GFAP, attesting to their astrocyte phenotype. The stained for GFAP formed a meshwork extending across the cytoplasm. By immunoblot (Fig. 2C), we also observed strong marking for GFAP compared to brain homogenates from Wistar rats at 90 days. Vimentin, another intermediate filament of cytoskeleton was also expressed in these cells (Fig. 2D). Although we did not quantify the expression of the proteins, we suggest that the expression of GFAP was superior to the one observed to vimentin (see section materials and methods, antibody dilution) (Gottfried et al. 2002).

Nestin, an intermediate filament predominantly expressed by progenitor cells in CNS (Lendahl et al. 1990; Menet et al. 2001), was evaluated to determine the percentage of progenitors after 1st, 2nd weeks of culture and after reached the confluence. Immunoblot presented the expression of nestin for all three conditions evaluated (Fig. 3A). Nestin immunostaining indicated a low presence of progenitors in the first weeks (data not shown). Interestingly, nestin showed to be very diffusely distributed throughout the cytoplasm of the cells at confluence (Fig. 3B).

GS protein, a constitutive marker of astroglial cells, was also evaluated by immunocytochemistry (Fig. 4A) and immunoblot (Fig. 4B). In both determinations we observed intense marking for GS. Recently, was demonstrated that ALDH1L1, a key enzyme in folate metabolism, may regulate astrocyte division (Yang et al.). Immunoblot analyses determined the presence

of ALDH1L1 in our cultures (Fig. 4C). S100B, a Ca²⁺-binding protein, is abundantly expressed in astrocytes and has been implicated in the regulation of intracellular functions including proliferation and differentiation. Western blot showed the expression of S100B protein (Fig. 4D).

To determine whether the culture showed microglia or neurons after reached the confluence, we used three specific antibodies: (i) anti-CD11b/c (an antibody that recognizes a specific protein from microglia), (ii) anti- β tubulin III (an antibody that recognizes a type of microtubule expressed exclusively in neurons) and (iii) anti-NeuN (an antibody that recognizes a neuronal protein distributed in neuronal nuclei). We found by about 5% of stained for microglia and did not observe the expression of β tubulin III or NeuN (data not shown).

Glutamate uptake is decreased in adult astrocytes primary cultured

As shown in Table 1, the glutamate uptake was significantly decreased compared to primary astrocytes cultured from newborn Wistar rats. Two destinations of glutamate after be taken up by astrocytes were also evaluated, the GS activity and the intracellular content of GSH, both decreased when compared to newborn astrocytes (Table 1). It is important to mention that the levels of GSH found in adult astrocytes are similar to those in brain homogenates in the same age (Rodrigues et al. 2009).

The glutamate transport system plays important roles in the determination of glutamatergic synaptic transmission. Five different isoforms of glutamate transporters (or excitatory amino acid carriers – EAAT) have now been identified in the plasma membrane of astrocytes and neurons: GLAST (EAAT1), GLT1 (EAAT2), EAAC1 (EAAT3), EAAT4 and EAAT5 (Danbolt 2001). In our cells cultured we detected the immunocontent of GLAST and GLT1, the main glutamate transporter subtypes known to be expressed by mammalian forebrain astrocytes in culture and *in situ* (Fig. 5A and B, respectively). We did not observe the expression of EAAC1 (data not shown).

Astrocytes are vulnerable to oxidative stress

Considering that glutamate transporters are sensible to oxidative stress, which can cause impairment of glutamate uptake and of GSH synthesis, we assess the response of astrocytes under oxidative condition. Firstly, we evaluated integrity and metabolic activity of the cells stimulated with H₂O₂ for 1, 3 and 6 h by measuring PI incorporation and MTT reduction. H₂O₂ (50 and 100 μM) decreased MTT reduction by about 14% (P < 0.05) and 20% (P < 0.01) compared to control conditions, respectively, since 3 h of treatment (Table 2). They also induced a slight loss of cell integrity (Table 2). After 6 h, 100 μM H₂O₂ induced an intense reduction of cell viability. A high concentration of H₂O₂ (1000 μM – 1h of exposure) was able to induce cell death, indicating that adult *in vitro* astrocytes detoxify H₂O₂ quickly, in agreement with astrocytes *in vivo* and *in vitro* (data not shown) (Dringen et al. 1998).

In order, we measured the intracellular ROS production by DCFH oxidation, after cells were stimulated by 50 μM H₂O₂ for 3 h. We choose this concentration of H₂O₂ because we did not observe integrity loss in cell membrane. The ROS generation was increased by about 34% compared to control conditions (P < 0.01), Fig. 6A.

After causing significant changes in cellular redox status, we assessed the main destinations of glutamate under oxidative stress. Figure 6 also displays that 50 μM H₂O₂ after 3 h of treatment decreased glutamate uptake from 0.8 ± 0.08 nmol/mg protein/min to 0.6 ± 0.09 nmol/mg protein/min, P < 0.05 (Fig. 6B); GS activity by about 20%, P < 0.01 (Fig. 6C) and GSH intracellular levels from 15 ± 1.2 nmol/mg protein to 11.5 ± 1.4 nmol/mg protein, P < 0.01 (Fig. 6D) compared to control conditions.

These data strongly suggest that adult astrocytes respond to oxidative stress. Moreover, the generation and accumulation of ROS in adult astrocytes decreased the glutamatergic system activity, reducing the astrocytic protective functions related to glutamate metabolism.

Hydrogen peroxide and Zn²⁺ induce changes in actin cytoskeleton of astrocytes

The actin cytoskeleton is the major determinant of cell morphology, being involved in motility, migration and cellular adhesion (Zigmond 1996). Impairment of actin polymerization alters astrocytic functions, such as Ca^{2+} signaling, cell growth and glutamate uptake (Sergeeva et al. 2000). In contrast, the rearrangement of actin cytoskeleton is an important biological response to several extracellular stimuli, which are frequently mediated by the Rho family of small GTPases (Hall 2005).

Hydrogen peroxide was able to induce cell body retraction and actin reorganization (Fig. 7A, B, C). Zhu et al, (Zhu et al. 2005) demonstrated that H_2O_2 alters cytoskeleton of newborn astrocytes *in vitro* through activation of p38 MAPK pathway. In this sense, we used a specific inhibitor of p38 MAPK (SB203580), which suppressed cytoskeleton alterations induced by H_2O_2 (Fig. B, C). These results showed that adult astrocytes respond to cytoskeletal rearrangements and signaling pathways. SB203580 *per se* did not alter actin cytoskeleton.

To explore whether Rho GTPases was involved in rearrangement of actin fibers, we induced cytoskeleton reorganization with 50 μM Zn^{2+} for 3 h (Fig. 7D, E, F). It is important to mention that Zn^{2+} can regulate the activity of glutamate transporters (Duan et al. 1999), besides being associated with neurodegenerative disorders. The pre-treatment for 0.5 h of LPA, which is a specific upstream regulator of Rho A, showed that the morphological alterations induced by Zn^{2+} are modulated via Rho A pathway, because it was able to prevent Zn^{2+} -induced actin reorganization. We did not observe cell death in this concentration (data not shown).

In summary, our results showed that extracellular stimuli may exert cytotoxic action towards adult astrocytes *in vitro* via MAPK and Rho A pathway signaling, indicating an importance of actin cytoskeleton for maintenance of normal functions of CNS.

The effect of LPS on astrocytes

Tumor necrosis factor (TNF)- α is a potent pro-inflammatory cytokine, synthesized, mainly, by microglia and astrocytes (Tanabe et al.). LPS has been widely used experimentally to stimulate inflammatory responses, including in the CNS (Guerra et al.). Inflammatory response in the brain is primarily mediated by microglia, but growing evidence suggests a crucial importance of astrocytes. In this context, after treatment with LPS, adult astrocytes increased TNF levels from 3.3 ± 0.2 pg/ml to 13.6 ± 0.5 pg/ml, $P < 0.01$ (Fig. 8).

Discussion

Monotypic CNS cells culture have been shown to contribute largely for the understanding of brain properties and function. Considering the relevance of astrocytes for CNS maintenance and cellular communication, we established and characterized in this study a model of astrocytic cells culture from adult Wistar rats, focusing in the glutamatergic system. We also demonstrated that astrocytes are sensible to oxidative stress and inflammatory response. This study is the first to investigate the glutamate metabolism in adult astrocytes *in vitro*.

Adult astrocytes divide more slowly than cells from newborn animals; but, they support cellular division until the confluence. Adult cortical tissue has its connections already established and more organized than newborn tissue, which is very plastic and labile to stimuli. We have developed a protocol that allows the obtention of glial cells, suggesting that they are present *de novo* and not derived from precursor cells (Schwartz and Wilson 1992). Differently of other authors that use newborn animals cultured by 40 or 90 days *in vitro* as experimental approach to investigate the modifications in animal brain (Gottfried et al. 2002; Pertusa et al. 2007), we used adult animals to verify the astrocytic function. It is important to note the absence of staining for microglia and neuron proteins, which attested the basal conditions of culture.

Three intermediate filaments of cytoskeleton have been identified in astrocytes: GFAP, vimentin and nestin. The expression of GFAP and vimentin is tightly regulated during the development and is associated with the astrocytic

differentiation (Desclaux et al. 2009; Menet et al. 2001). At adult stages, the exact physiological roles of the GFAP and vimentin in the astrocytes remain incompletely understood, but they appear to be involved in the maintenance of shape, cytoarchitecture of CNS, mechanical stability and synaptic function (Menet et al. 2001). After CNS injury, the upregulation of both GFAP and vimentin expression display a major role in reactive astrocytes, contributing to the glial scar (Desclaux et al. 2009; Rozovsky et al. 1998). It has been, therefore, suggested that the overproduction of GFAP and vimentin could be used as a specific target for neuronal repair strategies (Lepekhn et al. 2001). Moreover, the increase in GFAP expression in astrocytes *in vitro* has been demonstrated in aging studies (Gottfried et al. 2002; Pertusa et al. 2007). Our result showed the presence of GFAP and vimentin (Fig. 2), in agreement to other studies that demonstrated the coexpression of these proteins in cultured astrocytes (Menet et al. 2001; Pertusa et al. 2007).

Nestin, another intermediate filament, predominantly expressed in progenitor cells and reexpressed in reactive astrocytes was detected, mainly, after 4th week cultured. As nestin does not organize itself into a cytoplasmic network and there is coexpression in culture of GFAP and vimentin, those two proteins could be promoting the polymerization of nestin in adult astrocytes (Frisen et al. 1995; Marvin et al. 1998). Also, we must consider that nestin is a protein that can have its expression upregulated in adult cells after certain stimuli, like, e.g. mechanical trauma (Holmin et al. 1997). The increase in FBS concentration in culture medium after two weeks could have lead to increase in nestin expression. The presence of nestin could be related to one of the limitations in the *in vitro* studies, because they are performed in controlled conditions and undergo strong influence of soluble trophic factors, present in the medium, what could have changed the expression of some proteins (Wanner).

Other markers of astrocytes were tested, and the expression of GS, ALDH1L1, S100B and GAPDH was detected. GS is an enzyme expressed only in astrocytes in the brain and astrocytic glutamine synthesis is essential for maintaining neuronal glutamate release (Allaman et al. ; Halassa and Haydon ; Paixao and Klein). Recently, was demonstrated that ALDH1L1 is a new

astroglial marker providing useful basis for the molecular analysis of astrocytes in physiological and pathological conditions (Yang et al.). S100B, another marker of astrocytes, was found in our cells. Astrocytes represent the brain cell type with the highest expression of S100B (Brozzi et al. 2009; Van Eldik and Wainwright 2003). GAPDH was used as a constitutive protein for our experiments.

In our cell culture model, we observed a spontaneous glutamate uptake, without the need of astrocyte differentiation with dibutyryl cAMP (Anderson and Swanson 2000; Duan et al. 1999; Swanson et al. 1997). The levels of glutamate uptake were low compared to newborn-derived astrocytic culture and our data are in agreement with several studies *in vivo* that reported the decrease in glutamate uptake in the cerebral cortex of aged rats (Bak et al. 2006; Pertusa et al. 2007; Segovia et al. 2001a; Segovia et al. 2001b). Additionally, patients with disorders related to aging, such as Alzheimer's disease, there is a significant decrease in glutamate uptake (Beckstrom et al. 1999; Ferrarese et al. 2000; Zoia et al. 2004); thus, the reduction on glutamate uptake seems to be directly associated to age. Adult astrocytes *in vitro* show immunocontent of the main glutamate transporters, GLAST and GLT1, in normal conditions.

In mammalian brain, the GS activity converts glutamate into glutamine and this is crucial to the glutamatergic recycling. Our findings show a decrease in GS activity. In adult brain the activity of GS decreases with age, probably because this enzyme is very sensitive to oxidative stress, which is characteristically increased in aging. As glutamine is an important source of glutamate, it also helps to maintain GSH levels (Banerjee et al. 2008). In Wistar rats the basal levels of GSH decrease with age (Gu et al. ; Rodrigues et al. 2009). Moreover, depletion of GSH in glial cells induces neurotoxicity and impairment in glutamate transporters, reduction of GSH synthesis and increase in oxidative stress have been described as the basis of many neurodegenerative diseases.

Our findings under oxidative conditions suggested that adult astrocytes were vulnerable to the action of biological oxidants. Supraphysiological H₂O₂ altered membrane permeability and mitochondrial activity. As expected, in this

condition we found decreased glutamate uptake and GS activity, two properties of astrocytic proteins primarily distributed at the membrane. Intracellular GSH was decreased probably by absence of their substrate and conversion to its oxidized form (Droge 2002; Halliwell 2001). Moreover, the metabolic mitochondrial status in adult astrocytes was decreased, as measured by MTT (mainly indicative of succinate-dehydrogenase activity) (Klamt et al. 2002; Lin et al. 2007; Pertusa et al. 2007).

In normal conditions, Rho A signaling pathway induces the formation of stress fibers and focal adhesions (Funchal et al. 2004; Guasch et al. 2003; Quincozes-Santos et al. 2009). For the first time, we demonstrated that LPA prevents the effect of excess Zn^{2+} on actin cytoskeleton. Increases in intracellular Zn^{2+} concentrations can lead to cell injury and Zn^{2+} homeostasis depend of cysteine uptake, and consequently, generation of GSH. p38 MAPK role in the astroglial response to oxidative stress was also observed in adult astrocytes cultured (Fig. 6). In this sense, considering our objectives, we must emphasize that MAPK signaling pathway is strongly associated with glutamate transporter and oxidative stress after injuries.

Santello et al, (Santello et al.), has recently been demonstrated that TNF- α critically controls glutamatergic gliotransmission. Furthermore, TNF- α has other important functions in the CNS, including injury-mediated microglial and astrocytes activation (Rossi and Volterra 2009; Tanabe et al.). Inflammatory stimulus induced a response in adult astrocytes. Moreover, oxidative stress also can induce inflammatory response and TNF- α is essential for production of other cytokines involved in neuroinflammation, another process associated to aging (Lee et al.).

In summary, these results obtained from adult astrocytes cultures suggest the expression of the main astrocytes markers, and activity of glutamatergic system. These cells represent an important new tool for studies *in vitro* and *in vivo*. In addition, their neuroprotective ability is diminished, a condition observed also in studies *in vivo*. The response to oxidative stress and inflammatory stimulus were also observed and changes in cytoskeleton were induced in stimulated astrocytes. Thus, the culture model described here exhibit

biochemical and physiological astrocytes properties and it may be useful for understanding of mechanisms related to adult and aging brain. Furthermore, the biochemical properties of astrocytes from Wistar rats submitted to lesions or experimental models, neurotoxicity and neuroprotection can be also evaluated.

References

- Allaman I, Belanger M, Magistretti PJ. Astrocyte-neuron metabolic relationships: for better and for worse. *Trends Neurosci* 34(2):76-87.
- Anderson CM, Swanson RA. 2000. Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia* 32(1):1-14.
- Bak LK, Schousboe A, Waagepetersen HS. 2006. The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. *J Neurochem* 98(3):641-53.
- Banerjee R, Vitvitsky V, Garg SK. 2008. The undertow of sulfur metabolism on glutamatergic neurotransmission. *Trends Biochem Sci* 33(9):413-9.
- Beckstrom H, Julsrud L, Haugeto O, Dewar D, Graham DI, Lehre KP, Storm-Mathisen J, Danbolt NC. 1999. Interindividual differences in the levels of the glutamate transporters GLAST and GLT, but no clear correlation with Alzheimer's disease. *J Neurosci Res* 55(2):218-29.
- Belanger M, Allaman I, Magistretti PJ. Brain energy metabolism: focus on astrocyte-neuron metabolic cooperation. *Cell Metab* 14(6):724-38.
- Booher J, Sensenbrenner M. 1972. Growth and cultivation of dissociated neurons and glial cells from embryonic chick, rat and human brain in flask cultures. *Neurobiology* 2(3):97-105.
- Browne RW, Armstrong D. 1998. Reduced glutathione and glutathione disulfide. *Methods Mol Biol* 108:347-52.
- Brozzi F, Arcuri C, Giambanco I, Donato R. 2009. S100B Protein Regulates Astrocyte Shape and Migration via Interaction with Src Kinase: IMPLICATIONS FOR ASTROCYTE DEVELOPMENT, ACTIVATION, AND TUMOR GROWTH. *J Biol Chem* 284(13):8797-811.
- Chen Y, Swanson RA. 2003. Astrocytes and brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 23(2):137-49.
- Danbolt NC. 2001. Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* 65(1):1-105.
- Desclaux M, Teigell M, Amar L, Vogel R, Gimenez YRM, Privat A, Mallet J. 2009. A novel and efficient gene transfer strategy reduces glial reactivity and improves neuronal survival and axonal growth in vitro. *PLoS One* 4(7):e6227.
- Donato R, Sorci G, Riuzzi F, Arcuri C, Bianchi R, Brozzi F, Tubaro C, Giambanco I. 2009. S100B's double life: intracellular regulator and extracellular signal. *Biochim Biophys Acta* 1793(6):1008-22.
- dos Santos AQ, Nardin P, Funchal C, de Almeida LM, Jacques-Silva MC, Wofchuk ST, Goncalves CA, Gottfried C. 2006. Resveratrol increases glutamate uptake and glutamine synthetase activity in C6 glioma cells. *Arch Biochem Biophys* 453(2):161-7.
- Dringen R. 2000. Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog Neurobiol* 62(6):649-71.
- Dringen R, Kussmaul L, Hamprecht B. 1998. Detoxification of exogenous hydrogen peroxide and organic hydroperoxides by cultured astroglial cells assessed by microtiter plate assay. *Brain Res Brain Res Protoc* 2(3):223-8.
- Dringen R, Pfeiffer B, Hamprecht B. 1999. Synthesis of the antioxidant glutathione in neurons: supply by astrocytes of CysGly as precursor for neuronal glutathione. *J Neurosci* 19(2):562-9.
- Droge W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82(1):47-95.
- Duan S, Anderson CM, Stein BA, Swanson RA. 1999. Glutamate induces rapid upregulation of astrocyte glutamate transport and cell-surface expression of GLAST. *J Neurosci* 19(23):10193-200.

- Ferrarese C, Begni B, Canevari C, Zoia C, Piolti R, Frigo M, Appollonio I, Frattola L. 2000. Glutamate uptake is decreased in platelets from Alzheimer's disease patients. *Ann Neurol* 47(5):641-3.
- Frisen J, Johansson CB, Torok C, Risling M, Lendahl U. 1995. Rapid, widespread, and longlasting induction of nestin contributes to the generation of glial scar tissue after CNS injury. *J Cell Biol* 131(2):453-64.
- Funchal C, Gottfried C, De Almeida LM, Wajner M, Pessoa-Pureur R. 2004. Evidence that the branched-chain alpha-keto acids accumulating in maple syrup urine disease induce morphological alterations and death in cultured astrocytes from rat cerebral cortex. *Glia* 48(3):230-40.
- Gottfried C, Tramontina F, Goncalves D, Goncalves CA, Moriguchi E, Dias RD, Wofchuk ST, Souza DO. 2002. Glutamate uptake in cultured astrocytes depends on age: a study about the effect of guanosine and the sensitivity to oxidative stress induced by H₂O₂. *Mech Ageing Dev* 123(10):1333-40.
- Gottfried C, Valentim L, Salbego C, Karl J, Wofchuk ST, Rodnight R. 1999. Regulation of protein phosphorylation in astrocyte cultures by external calcium ions: specific effects on the phosphorylation of glial fibrillary acidic protein (GFAP), vimentin and heat shock protein 27 (HSP27). *Brain Res* 833(2):142-9.
- Gu Z, Du Y, Liu Y, Ma L, Li L, Gong Y, Tian H, Li C. Effect of aging on islet beta-cell function and its mechanisms in Wistar rats. *Age (Dordr)*.
- Guasch RM, Tomas M, Minambres R, Valles S, Renau-Piqueras J, Guerri C. 2003. RhoA and lysophosphatidic acid are involved in the actin cytoskeleton reorganization of astrocytes exposed to ethanol. *J Neurosci Res* 72(4):487-502.
- Guerra MC, Tortorelli LS, Galland F, Da Re C, Negri E, Engelke DS, Rodrigues L, Leite MC, Goncalves CA. Lipopolysaccharide modulates astrocytic S100B secretion: a study in cerebrospinal fluid and astrocyte cultures from rats. *J Neuroinflammation* 8:128.
- Halassa MM, Haydon PG. Integrated brain circuits: astrocytic networks modulate neuronal activity and behavior. *Annu Rev Physiol* 72:335-55.
- Hall A. 2005. Rho GTPases and the control of cell behaviour. *Biochem Soc Trans* 33(Pt 5):891-5.
- Halliwell B. 2001. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging* 18(9):685-716.
- Hertz L, Zielke HR. 2004. Astrocytic control of glutamatergic activity: astrocytes as stars of the show. *Trends Neurosci* 27(12):735-43.
- Holmin S, Almqvist P, Lendahl U, Mathiesen T. 1997. Adult nestin-expressing subependymal cells differentiate to astrocytes in response to brain injury. *Eur J Neurosci* 9(1):65-75.
- Kettenmann H, Verkhratsky A. 2008. Neuroglia: the 150 years after. *Trends Neurosci* 31(12):653-9.
- Klamt F, Gottfried C, Tramontina F, Dal-Pizzol F, Da Frola ML, Jr., Moreira JC, Dias RD, Moriguchi E, Wofchuk S, Souza DO. 2002. Time-related increase in mitochondrial superoxide production, biomolecule damage and antioxidant enzyme activities in cortical astrocyte cultures. *Neuroreport* 13(12):1515-8.
- Lauderback CM, Hackett JM, Huang FF, Keller JN, Szveda LI, Markesbery WR, Butterfield DA. 2001. The glial glutamate transporter, GLT-1, is oxidatively modified by 4-hydroxy-2-nonenal in the Alzheimer's disease brain: the role of Abeta1-42. *J Neurochem* 78(2):413-6.
- Lee M, Cho T, Jantaratnotai N, Wang YT, McGeer E, McGeer PL. Depletion of GSH in glial cells induces neurotoxicity: relevance to aging and degenerative neurological diseases. *FASEB J* 24(7):2533-45.
- Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD. 1990. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* 60(4):585-95.

- Lepekhn EA, Eliasson C, Berthold CH, Berezin V, Bock E, Pekny M. 2001. Intermediate filaments regulate astrocyte motility. *J Neurochem* 79(3):617-25.
- Lin DT, Wu J, Holstein D, Upadhyay G, Rourke W, Muller E, Lechleiter JD. 2007. Ca²⁺ signaling, mitochondria and sensitivity to oxidative stress in aging astrocytes. *Neurobiol Aging* 28(1):99-111.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193(1):265-75.
- Magistretti PJ, Pellerin L. 1997. Regulation by neurotransmitters of glial energy metabolism. *Adv Exp Med Biol* 429:137-43.
- Magistretti PJ, Pellerin L. 2000. The astrocyte-mediated coupling between synaptic activity and energy metabolism operates through volume transmission. *Prog Brain Res* 125:229-40.
- Maragakis NJ, Rothstein JD. 2006. Mechanisms of Disease: astrocytes in neurodegenerative disease. *Nat Clin Pract Neurol* 2(12):679-89.
- Marvin MJ, Dahlstrand J, Lendahl U, McKay RD. 1998. A rod end deletion in the intermediate filament protein nestin alters its subcellular localization in neuroepithelial cells of transgenic mice. *J Cell Sci* 111 (Pt 14):1951-61.
- Mates JM, Perez-Gomez C, Nunez de Castro I, Asenjo M, Marquez J. 2002. Glutamine and its relationship with intracellular redox status, oxidative stress and cell proliferation/death. *Int J Biochem Cell Biol* 34(5):439-58.
- Menet V, Gimenez y Ribotta M, Chauvet N, Drian MJ, Lannoy J, Colucci-Guyon E, Privat A. 2001. Inactivation of the glial fibrillary acidic protein gene, but not that of vimentin, improves neuronal survival and neurite growth by modifying adhesion molecule expression. *J Neurosci* 21(16):6147-58.
- Nedergaard M, Ransom B, Goldman SA. 2003. New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. *Trends Neurosci* 26(10):523-30.
- Paixao S, Klein R. Neuron-astrocyte communication and synaptic plasticity. *Curr Opin Neurobiol* 20(4):466-73.
- Pertusa M, Garcia-Matas S, Rodriguez-Farre E, Sanfeliu C, Cristofol R. 2007. Astrocytes aged in vitro show a decreased neuroprotective capacity. *J Neurochem* 101(3):794-805.
- Quincozes-Santos A, Nardin P, de Souza DF, Gelain DP, Moreira JC, Latini A, Goncalves CA, Gottfried C. 2009. The janus face of resveratrol in astroglial cells. *Neurotox Res* 16(1):30-41.
- Raps SP, Lai JC, Hertz L, Cooper AJ. 1989. Glutathione is present in high concentrations in cultured astrocytes but not in cultured neurons. *Brain Res* 493(2):398-401.
- Rodrigues L, Biasibetti R, Swarowsky A, Leite MC, Quincozes-Santos A, Quilfeldt JA, Achaval M, Goncalves CA. 2009. Hippocampal alterations in rats submitted to streptozotocin-induced dementia model are prevented by aminoguanidine. *J Alzheimers Dis* 17(1):193-202.
- Rossi D, Volterra A. 2009. Astrocytic dysfunction: insights on the role in neurodegeneration. *Brain Res Bull* 80(4-5):224-32.
- Rozovsky I, Finch CE, Morgan TE. 1998. Age-related activation of microglia and astrocytes: in vitro studies show persistent phenotypes of aging, increased proliferation, and resistance to down-regulation. *Neurobiol Aging* 19(1):97-103.
- Santello M, Bezzi P, Volterra A. TNF α controls glutamatergic gliotransmission in the hippocampal dentate gyrus. *Neuron* 69(5):988-1001.
- Schwartz JP, Wilson DJ. 1992. Preparation and characterization of type 1 astrocytes cultured from adult rat cortex, cerebellum, and striatum. *Glia* 5(1):75-80.
- Segovia G, Del Arco A, Prieto L, Mora F. 2001a. Glutamate-glutamine cycle and aging in striatum of the awake rat: effects of a glutamate transporter blocker. *Neurochem Res* 26(1):37-41.

- Segovia G, Porrás A, Del Arco A, Mora F. 2001b. Glutamatergic neurotransmission in aging: a critical perspective. *Mech Ageing Dev* 122(1):1-29.
- Sergeeva M, Ubl JJ, Reiser G. 2000. Disruption of actin cytoskeleton in cultured rat astrocytes suppresses ATP- and bradykinin-induced $[Ca^{2+}]_i$ oscillations by reducing the coupling efficiency between Ca^{2+} release, capacitative Ca^{2+} entry, and store refilling. *Neuroscience* 97(4):765-9.
- Skytt DM, Madsen KK, Pajicka K, Schousboe A, Waagepetersen HS. Characterization of primary and secondary cultures of astrocytes prepared from mouse cerebral cortex. *Neurochem Res* 35(12):2043-52.
- Swanson RA, Liu J, Miller JW, Rothstein JD, Farrell K, Stein BA, Longuemare MC. 1997. Neuronal regulation of glutamate transporter subtype expression in astrocytes. *J Neurosci* 17(3):932-40.
- Tanabe K, Matsushima-Nishiwaki R, Yamaguchi S, Iida H, Dohi S, Kozawa O. Mechanisms of tumor necrosis factor- α -induced interleukin-6 synthesis in glioma cells. *J Neuroinflammation* 7:16.
- Trotti D, Danbolt NC, Volterra A. 1998. Glutamate transporters are oxidant-vulnerable: a molecular link between oxidative and excitotoxic neurodegeneration? *Trends Pharmacol Sci* 19(8):328-34.
- Van Eldik LJ, Wainwright MS. 2003. The Janus face of glial-derived S100B: beneficial and detrimental functions in the brain. *Restor Neurol Neurosci* 21(3-4):97-108.
- Volterra A, Trotti D, Tromba C, Floridi S, Racagni G. 1994. Glutamate uptake inhibition by oxygen free radicals in rat cortical astrocytes. *J Neurosci* 14(5 Pt 1):2924-32.
- Wang DD, Bordey A. 2008. The astrocyte odyssey. *Prog Neurobiol* 86(4):342-67.
- Wanner IB. An in vitro trauma model to study rodent and human astrocyte reactivity. *Methods Mol Biol* 814:189-219.
- Westergaard N, Sonnewald U, Schousboe A. 1995. Metabolic trafficking between neurons and astrocytes: the glutamate/glutamine cycle revisited. *Dev Neurosci* 17(4):203-11.
- Yang Y, Vidensky S, Jin L, Jie C, Lorenzini I, Frankl M, Rothstein JD. Molecular comparison of GLT1+ and ALDH1L1+ astrocytes in vivo in astroglial reporter mice. *Glia* 59(2):200-7.
- Zhu D, Tan KS, Zhang X, Sun AY, Sun GY, Lee JC. 2005. Hydrogen peroxide alters membrane and cytoskeleton properties and increases intercellular connections in astrocytes. *J Cell Sci* 118(Pt 16):3695-703.
- Zigmond SH. 1996. Signal transduction and actin filament organization. *Curr Opin Cell Biol* 8(1):66-73.
- Zoia C, Cogliati T, Tagliabue E, Cavaletti G, Sala G, Galimberti G, Rivolta I, Rossi V, Frattola L, Ferrarese C. 2004. Glutamate transporters in platelets: EAAT1 decrease in aging and in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 25(2):149-57.

Table 1

Glial parameter (Basal conditions)	Newborn astrocytes	Adult astrocytes
Glutamate uptake (nmol/mg protein/min)	3.2 ± 0.4	0.9 ± 0.1*
GS activity (µmol/mg protein/min)	3.0 ± 0.5	2.3 ± 0.3*
GSH (nmol/mg protein)	25.0 ± 3.0	18.0 ± 2.0**

Analysis of the main glial parameters in basal conditions of newborn and adult astrocytes. Glutamate uptake, GS activity and GSH intracellular content were measured after cells reached the confluence. Data represent means ± S.E. from 6 experimental determinations performed in triplicate. * P < 0.05 and ** P < 0.01 indicate significant differences from newborn astrocytes values.

Table 2

Treatments	Cell Viability (% of control)					
	1 h		3 h		6h	
	MTT	PI	MTT	PI	MTT	PI
Basal	100	100	100	100	100	100
50 μ M H ₂ O ₂	94 \pm 7	93 \pm 6	86 \pm 6*	91 \pm 9	77 \pm 7**	79 \pm 9*
100 μ M H ₂ O ₂	91 \pm 7	92 \pm 8	80 \pm 8**	82 \pm 7*	58 \pm 6**	52 \pm 7*

Effects of H₂O₂ on adult astrocytes cell viability. Extracellular LDH activity and MTT reduction were measured as described in the Materials and Methods Section. The medium was removed followed by the addition of DMEM/F12 5% FBS and cells were maintained at 5%CO₂ / 37°C in the presence or absence of H₂O₂ for 3 h. Data represent means \pm S.E. from 3 experimental determinations performed in triplicate. * P < 0.05 and ** P < 0.01 indicate significant differences from control values.

Legends of figures

Fig. 1. Astrocytes morphology. **(A, B)** Primary adult astrocytes, under normal conditions, present polygonal to fusiform and flat morphology, as shown by phase-contrast microscopy. We did not observe morphological alterations during culture time. Arrowhead indicates a polygonal cell, arrow indicates fusiform cell (scale bar 50 μm).

Fig. 2. Adult astrocyte cultures present classical astroglial markers. **(A)** Astrocytes show intense immunolabeling to GFAP. **(B)** DAPI staining showed regular nucleus (round shape). Data from five independent experiments. Representative immunoblot band of rat cortex homogenate (Rat cortex) used as positive control and culture samples (Adult astrocyte) **(C)** GFAP; **(D)** vimentin; **(E)** GAPDH. $n=5$ for all immunoblot experiments. Scale bar 50 μm .

Fig. 3. Adult astrocytes cultures present expression of nestin. **(A)** Representative immunoblot band at 1st and 2nd week and at confluence. **(B)** Immunocytochemistry of adult astrocyte cultures at confluence. Representative data from two independent experiments, $n=3$ per week, performed in 2 – 3 wells.

Fig. 4. Adult astrocytes cultures present typical astroglial proteins. **(A)** Immunocytochemistry of adult astrocyte cultures for GS with merge for DAPI. Representative immunoblot band for: **(B)** GS; **(C)** ALDH1L1 and **(D)** S100B. Left band represents cortex homogenate (Rat cortex) used as positive control and right band represents culture samples (Adult astrocyte), $n=5$ for all immunoblot experiments.

Fig. 5. Adult astrocytes cultures express the main glutamate transporters. Representative immunoblot band for: **(A)** GLAST; **(B)** GLT-1. Left band represents cortex homogenate (Rat cortex) used as positive control and right band represents culture samples (Adult astrocyte), $n=5$ for all immunoblot experiments.

Fig. 6. Adult astrocytes cultures are vulnerable to oxidative stress. Astrocytes were exposed to 50 μM H_2O_2 for 3h. The medium was removed followed by the addition of DMEM/F12 5% FBS and cells were maintained at 5% CO_2 / 37°C. We evaluated **(A)** Intracellular ROS production. **(B)** Glutamate uptake. **(C)** GS activity. **(D)** GSH intracellular content. Data represent means \pm S.E. from 4 – 6 experimental determinations performed in triplicate. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ indicate significant differences from control values.

Fig. 7. Effects of H_2O_2 and Zn^{2+} on actin reorganization in adult astrocytes cultures. The medium was removed followed by the addition of DMEM/F12 5% FBS and cells were maintained at 5% CO_2 / 37°C in the presence or absence of H_2O_2 or Zn^{2+} for 3 h. Representative images of cells exposed to **(A, D)** basal conditions. **(B)** 50 μM H_2O_2 . **(C)** H_2O_2 + SB203580. **(E)** 50 μM Zn^{2+} . **(F)** Zn^{2+} + LPA. All images are representative fields from at least three experiments carried out in duplicate. Scale bar 50 μm .

Fig 8. Adult astrocytes cultures present inflammatory response. The medium was removed followed by the addition of DMEM/F12 5% FBS and cells were maintained at 5%CO₂ / 37°C in the presence or absence of LPS 10 µg/ml for 1 h. Data represent means ± S.E. from 3 experimental determinations performed in triplicate. ** P < 0.01 indicate significant differences from control value.

Fig. 1

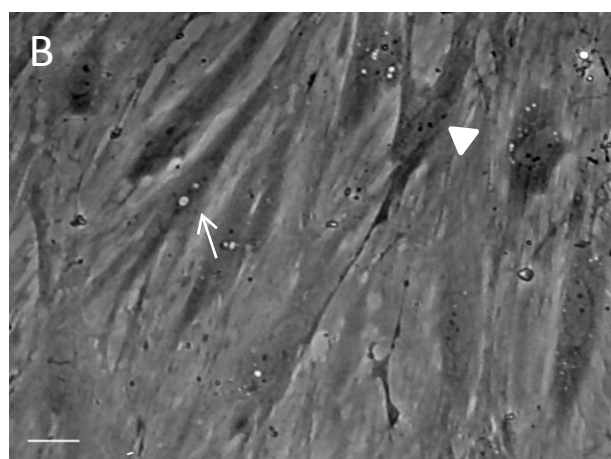
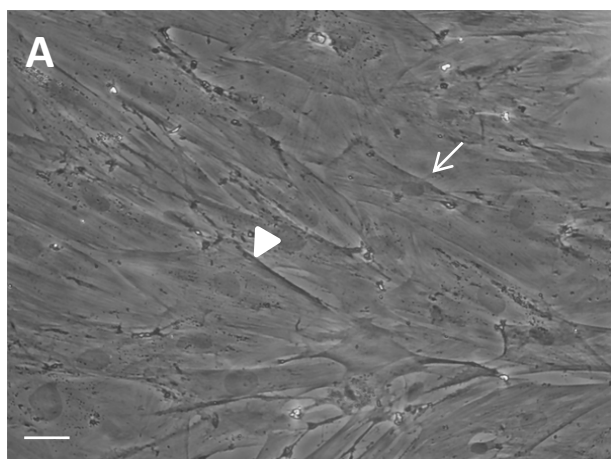
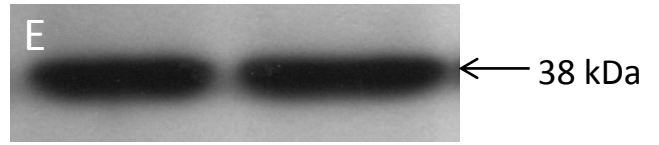
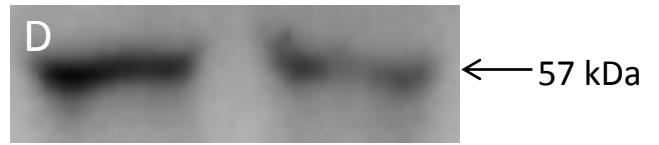
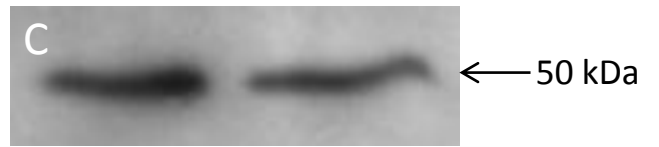
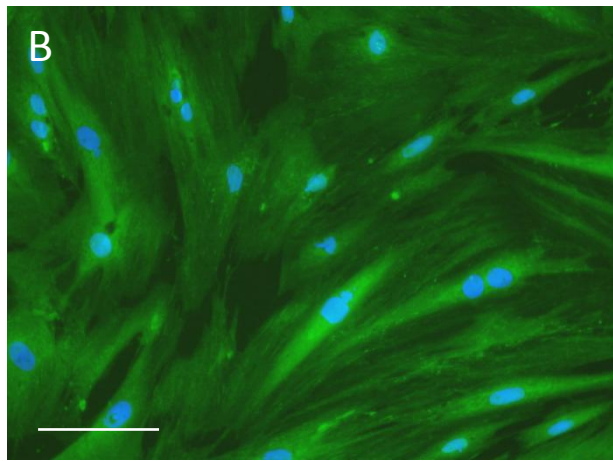
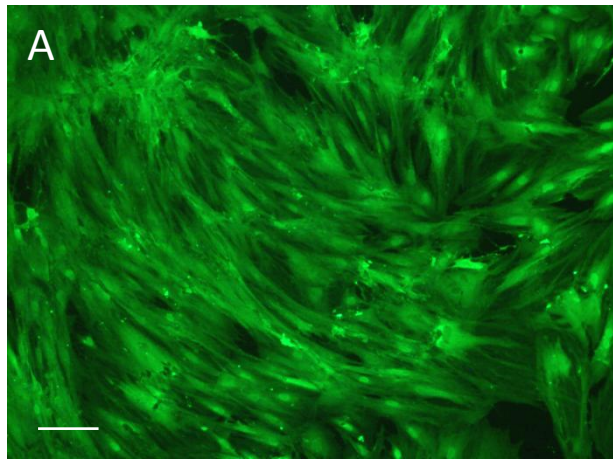


Fig. 2



Rat
cortex

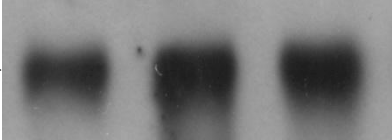
Adult
astrocytes

Fig. 3

A

1st week 2nd week At confluence

177 kDa →



B

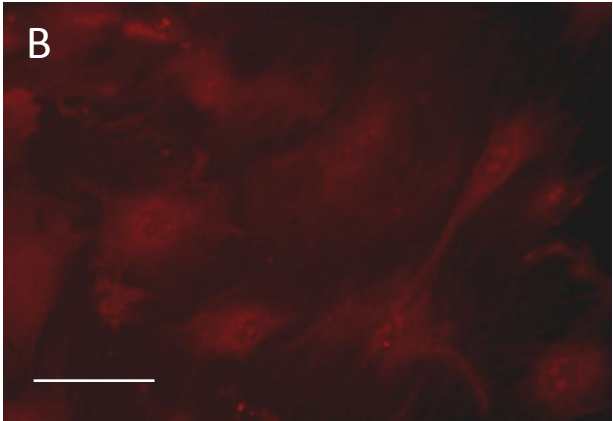


Fig. 4

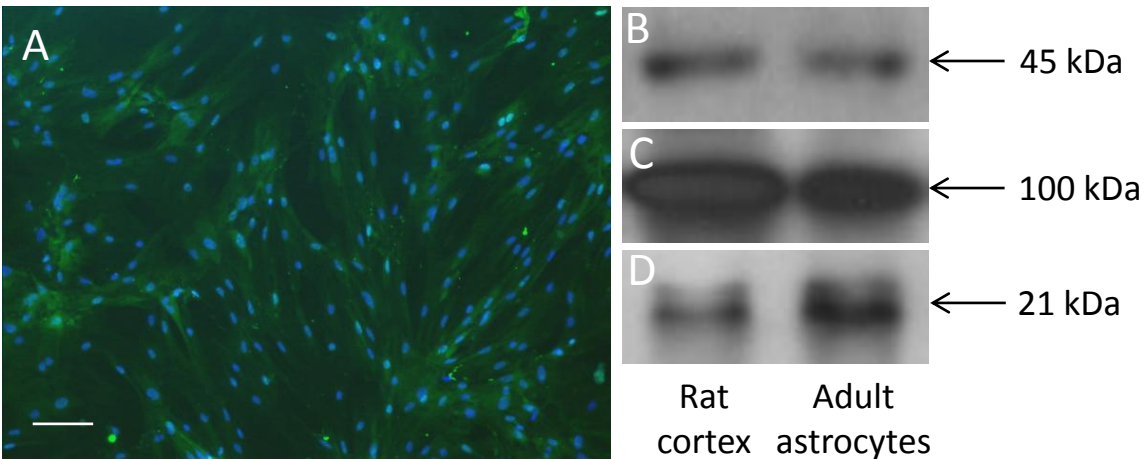


Fig. 5

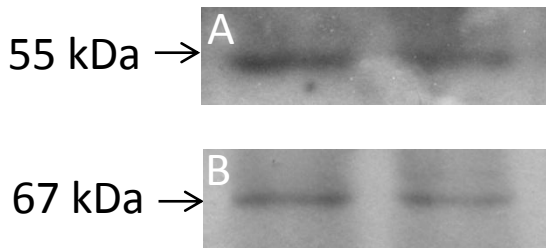


Fig. 6

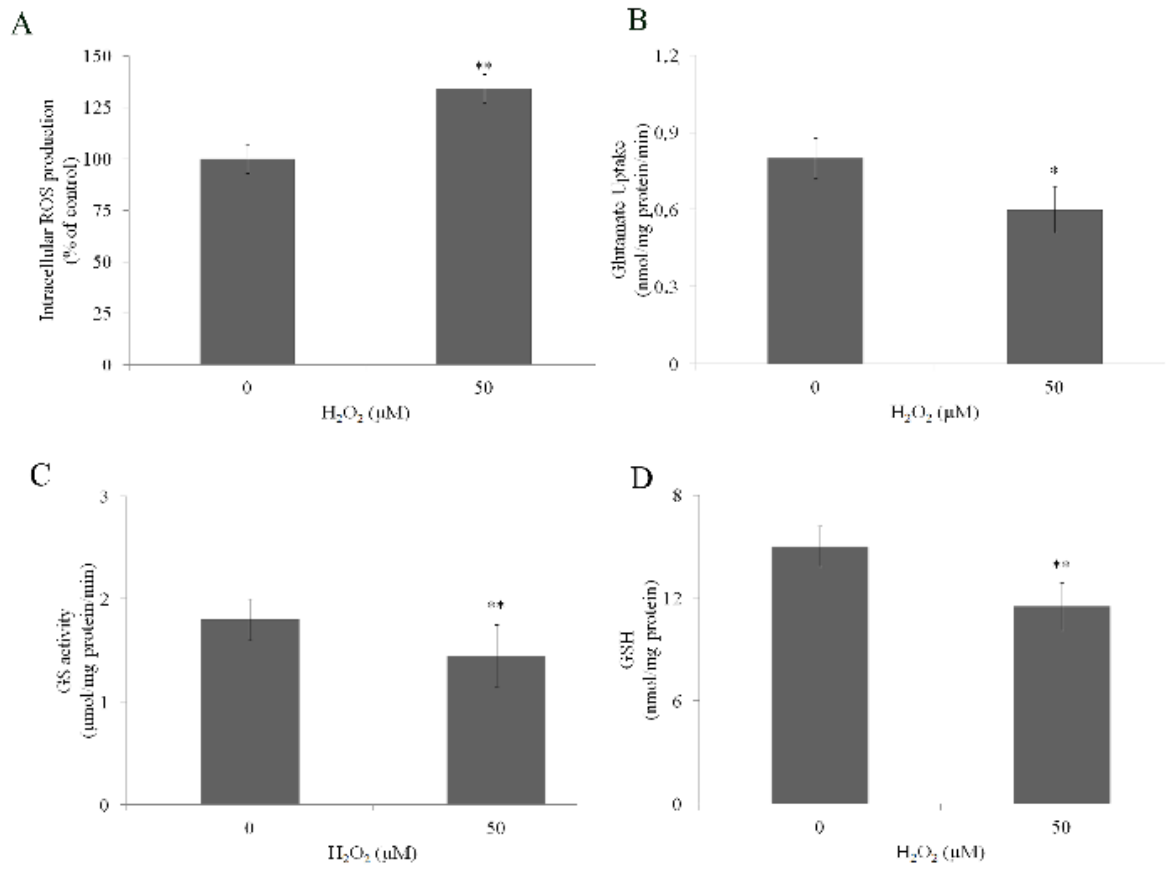


Fig. 7

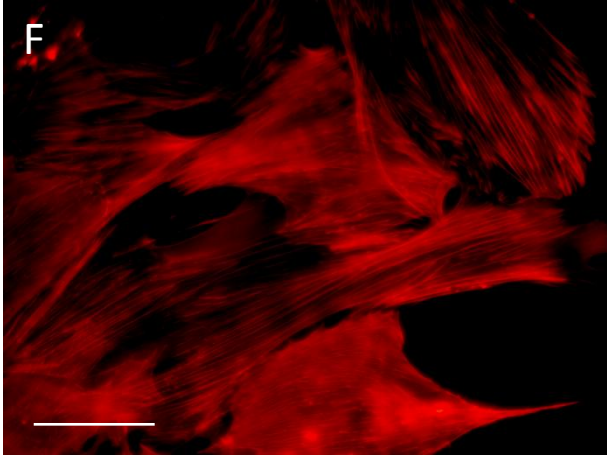
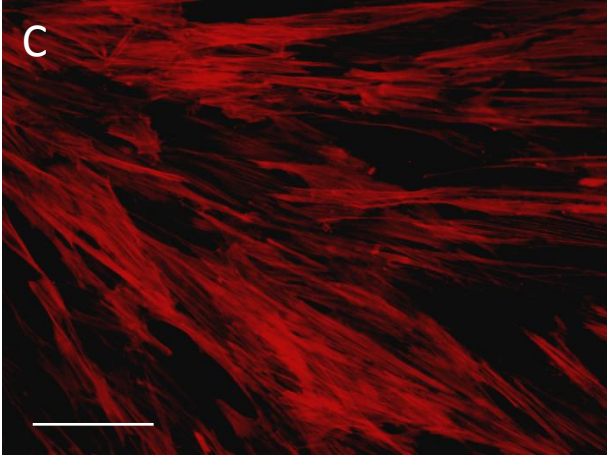
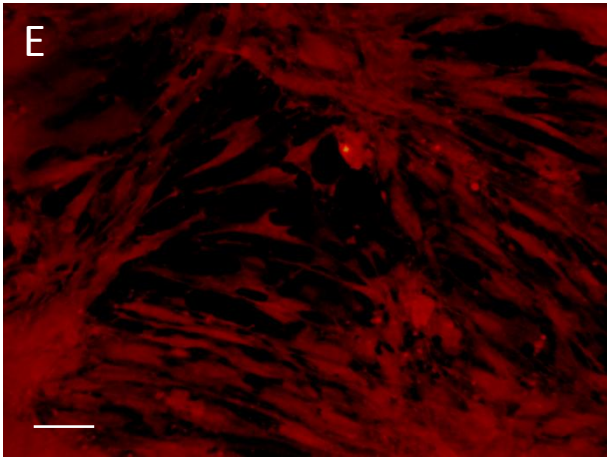
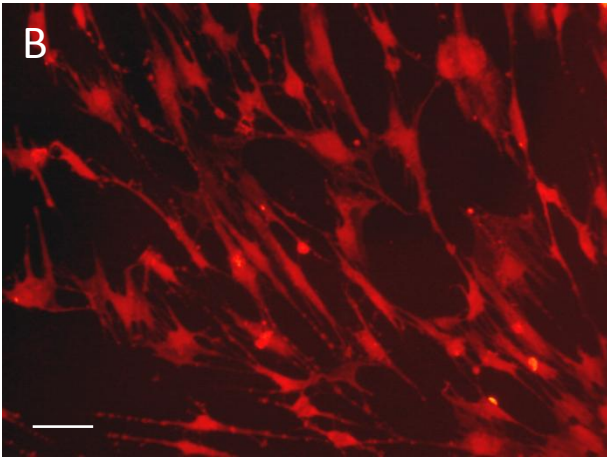
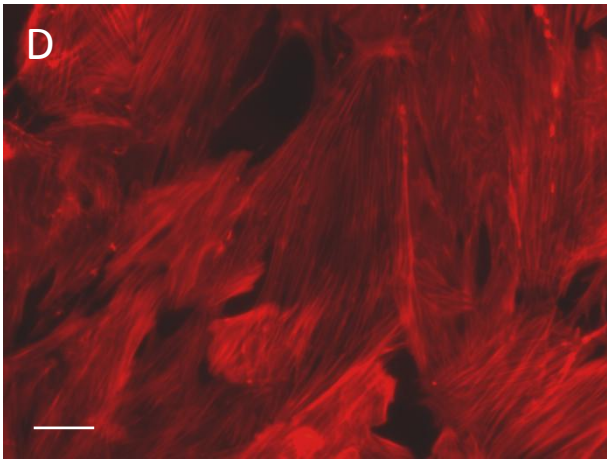
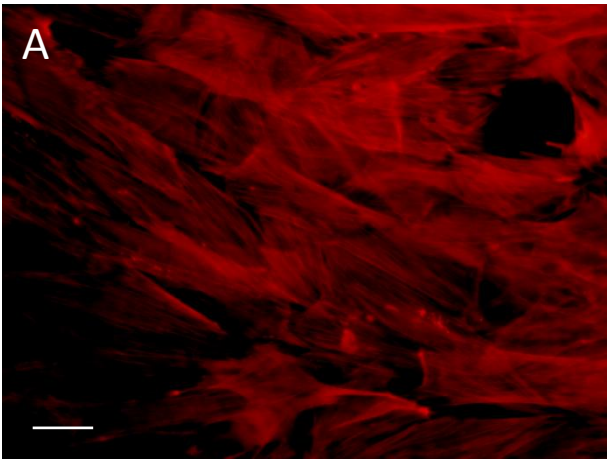
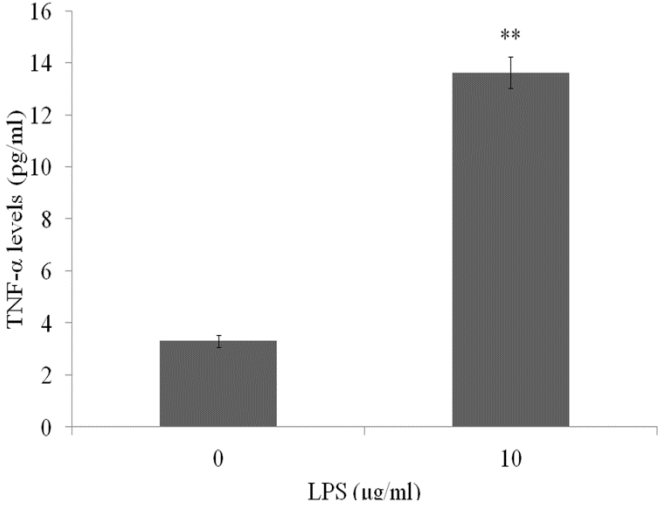


Fig. 8



PARTE III

DISCUSSÃO

Estudos que utilizam diferentes subtipos celulares do Sistema Nervoso Central (SNC) na preparação de culturas de células vêm sendo feitos e revisados exaustivamente (Hertz et al, 1998). Os estudos geralmente isolam um subtipo celular, apesar de isso ser, naturalmente, uma condição anormal, visto que, funcionalmente, o SNC depende não apenas da interação entre o mesmo tipo celular, mas também das conexões e da comunicação entre os diferentes tipos. Estas interações são tão complexas e as células estão tão interligadas na estrutura cerebral, que é necessário grande cuidado no estudo das interações celulares e das características bioquímicas de tipos celulares individuais.

Entretanto, as culturas monotípicas de células do SNC demonstram contribuir enormemente para a compreensão de propriedades de cada tipo celular, sob a exposição ou não a condições adversas, pois elas representam uma maneira de estudar propriedades bioquímicas e moleculares específicas.

Considerando a relevância dos astrócitos para a manutenção adequada do SNC, nós estabelecemos e caracterizamos, neste estudo, um modelo de cultura de células astrocitárias a partir de ratos Wistar adultos, com foco no sistema glutamatérgico. Nós demonstramos que, além de apresentar proteínas específicas que atestam sua função no metabolismo glutamatérgico, a cultura obtida é sensível ao estresse oxidativo e capaz de apresentar resposta inflamatória. Este estudo foi o primeiro a investigar o metabolismo glutamatérgico em astrócitos adultos *in vitro*.

Astrócitos adultos se dividem mais lentamente do que células de animais recém-nascidos. O tecido cortical adulto tem suas conexões já estabelecidas e

mais organizadas do que o tecido neonato, que apresenta alta plasticidade e é lábil a estímulos, podendo responder de maneira mais versátil e adaptada a certas situações, sendo, portanto, menos fiel à condição do cérebro suscetível a doenças neurodegenerativas. Nós desenvolvemos, neste estudo, um protocolo que permite a máxima obtenção de células gliais viáveis, sugerindo que elas estão presentes *de novo* e não são derivados de células precursoras (Schwartz & Wilson, 1992). Diferentemente de outros autores que usam animais neonatos cultivados por 40 ou 90 dias *in vitro* como abordagem para investigar modificações no cérebro (Gottfried et al, 2002; Pertusa et al, 2007), nós usamos animais adultos para verificar as funções astrocíticas.

Dentro do contexto das células gliais, um subtipo específico é relacionado, especialmente, ao sistema imune cerebral: as células microglicais. Em condições basais, a microglia encontra-se em estado de sentinela ou vigilante, monitorando o SNC em busca de irregularidades, a fim de manter a homeostasia neural. Diante de situações de lesão, estas células são ativadas, passando por diversos estágios, caracterizando a microglia ativada, responsiva aos estímulos decorrentes da alteração ocorrida. Nessa condição, a microglia passa a secretar mediadores inflamatórios como citocinas e óxido nítrico (NO). A ativação microglial pode resultar em resposta astrocítica, via secreção de mediadores inflamatórios (Adami et al, 2004; Bianchi et al, 2008; Garden & Moller, 2006; Yokoyama et al, 2004). É importante ressaltar a ausência de marcação imunocitoquímica para uma proteína característica de microglia ativada, o que atestou as condições basais da cultura.

A análise realizada para verificar a presença de neurônios demonstrou baixa ou nenhuma presença de proteínas específicas para este tipo celular, o

que está em concordância com estudos que demonstram que os neurônios requerem substratos e estímulos específicos para sobreviverem ao ambiente *in vitro*, os quais não foram fornecidos no meio utilizado para o crescimento de astrócitos (Pongrac & Rylett, 1998).

Os astrócitos possuem citoarquitetura específica para responder a mudanças no microambiente e desenvolver adequadamente suas funções (Belanger et al). Neste contexto, três filamentos intermediários do citoesqueleto foram identificados nos astrócitos cultivados: GFAP, vimentina e nestina. A expressão de GFAP e vimentina é finamente regulada durante o desenvolvimento e é associada a diferenciação astrocitária (Desclaux et al, 2009; Menet et al, 2001). No cérebro adulto, o exato papel fisiológico da GFAP e da vimentina nos astrócitos permanece não totalmente compreendido, mas, aparentemente, estas proteínas estão envolvidas na manutenção da forma, citoarquitetura do SNC, estabilidade mecânica e função sináptica (Menet et al, 2001). Após lesões no SNC, o aumento na expressão tanto de GFAP quanto de vimentina desempenha um importante papel na reatividade astrocitária, contribuindo para a “cicatriz glial” (Desclaux et al, 2009; Rozovsky et al, 1998). Tem sido sugerido, portanto, que a superprodução de GFAP e de vimentina poderiam ser usadas como um alvo específico em estratégias de reparo neuronal (Lepekhin et al, 2001). Ademais, o aumento na expressão de GFAP em astrócitos *in vitro* vem sendo demonstrado em estudos de envelhecimento (Pertusa et al, 2007). Nossos resultados demonstraram a presença de GFAP e vimentina, em concordância com outros estudos que demonstram a coexpressão dessas proteínas em astrócitos cultivados (Menet et al, 2001; Pertusa et al, 2007). Apesar de não termos quantificado a expressão das

proteínas, nós sugerimos que a expressão de GFAP foi superior a observada para vimentina, visto que para a detecção de vimentina foi necessário mais que o dobro de anticorpo do que o utilizado para GFAP.

Nestina, outro filamento intermediário, predominantemente expresso em células progenitoras e reexpressas em astrócitos reativos, foi detectada, principalmente, após a quarta semana de cultivo. Como a nestina não se organiza como uma rede citoplasmática e há coexpressão na cultura de GFAP e vimentina, estas duas proteínas poderiam estar promovendo a polimerização da nestina em astrócitos adultos (Frisen et al, 1995; Marvin et al, 1998). Também, devemos considerar que nestina é uma proteína que pode ter sua expressão aumentada em células adultas após certos estímulos, como por exemplo, trauma mecânico (Holmin et al, 1997). O aumento na concentração de soro fetal bovino (SFB) no meio de cultura após duas semanas poderia levar a um aumento na expressão de nestina. A presença de nestina pode ser relacionada a uma das limitações dos estudos *in vitro*, porque eles são desenvolvidos em condições controladas e sofrem fortemente a influência de fatores tróficos, presentes no meio de cultura, o que pode ter alterado a expressão de algumas proteínas (Wanner).

Outros marcadores de astrócitos foram testados, e a expressão de GS, ALDH1L1, S100B e GAPDH foram confirmadas. GS é uma enzima expressa apenas por astrócitos no cérebro e a síntese astrocitária de glutamina é essencial para manter a liberação de glutamato neuronal (Allaman et al; Halassa & Haydon; Paixao & Klein). Recentemente foi demonstrado que ALDH1L1 é um novo marcador astrogliar, o que fornece bases para a análise molecular de astrócitos em condições fisiológicas e patológicas (Yang et al).

S100B, outro marcador astrocitário, foi encontrada nas nossas células. Astrócitos representam o tipo celular cerebral que tem a maior expressão de S100B (Brozzi et al, 2009; Van Eldik & Wainwright, 2003). GAPDH foi usada como a proteína constitutiva em nossos experimentos.

Astrócitos adultos também captam glutamato espontaneamente, sem a necessidade de diferenciação com dibutilil cAMP (Anderson & Swanson, 2000; Duan et al, 1999; Swanson et al, 1997). Os níveis de captação de glutamato foram mais baixos quando comparados aos níveis da cultura de astrócitos neonatos e nossos dados estão de acordo com diversos estudos *in vivo* que relataram uma redução na captação de glutamato no córtex cerebral de ratos envelhecidos (Bak et al, 2006; Pertusa et al, 2007; Segovia et al, 2001a; Segovia et al, 2001b). Adicionalmente, em pacientes com doenças relacionadas ao envelhecimento, tais como Doença de Alzheimer, há uma significativa redução na captação de glutamato (Beckstrom et al, 1999; Ferrarese et al, 2000; Zoia et al, 2004); assim, a redução na captação de glutamato parece ser diretamente relacionada à idade. Estudos demonstraram que tanto em estágios iniciais quanto em estágios avançados das doenças neurodegenerativas há comprometimento astrocitário, pois há alteração no metabolismo glutamatérgico astrocitário e reatividade glial, contribuindo para um quadro de neuroinflamação (Van Eldik & Wainwright, 2003; Verkhratsky et al).

Os astrócitos, no córtex cerebral, captam glutamato através da atividade, principalmente, dos transportadores GLAST e GLT1, sendo este último o transportador mais abundantemente distribuído e que realiza a maior parte da captação astrocítica (Anderson & Swanson, 2000; Danbolt, 2001; Tanaka,

2000). Astrócitos adultos *in vitro* apresentam imunoconteúdo dos principais transportadores de glutamato, em condições normais, o que seria uma evidência que a cultura feita a partir de animais adultos mantém-se fiel às características de animais adultos ou envelhecidos, podendo apresentar respostas mais próximas à realidade, quando submetidas a certos estímulos. Apesar de o glutamato ser essencial em processos plásticos cerebrais, como desenvolvimento e envelhecimento (Banerjee et al, 2008; Danbolt, 2001) e em processos de aprendizado e memória (Izquierdo et al, 2006; Segovia et al, 2001b), a hiperestimulação do sistema glutamatérgico, decorrente de níveis aumentados de glutamato na fenda sináptica, é extremamente prejudicial ao cérebro (Danbolt, 2001). Esta situação, chamada excitotoxicidade glutamatérgica, está implicada em diversas doenças neurodegenerativas como Parkinson, Alzheimer, esclerose múltipla e epilepsia (Eulenburg & Gomez; Eulenburg et al; Gardoni & Di Luca, 2006; Pivovarova & Andrews).

No cérebro de mamíferos, a atividade da GS está relacionada à conversão de glutamato a glutamina e isto é crucial para a reciclagem do glutamato. Nossos achados demonstram uma redução na atividade da GS. No cérebro adulto a atividade da GS diminui com o envelhecimento, provavelmente porque esta enzima é muito sensível ao estresse oxidativo, que é caracteristicamente aumentado no envelhecimento. Como a glutamina é uma importante fonte de glutamato, ela também ajuda a manter os níveis de GSH (Banerjee et al, 2008). Em ratos Wistar, os níveis basais de GSH diminuem com a idade (Gu et al; Rodrigues et al, 2009), o que também pôde ser observado em nossa cultura de astrócitos adultos. Essas evidências acabam formando um ciclo, pois a depleção de GSH em células gliais induz

neurotoxicidade e mau funcionamento de transportadores de glutamato. Estes aspectos, redução da síntese de GSH e aumento no estresse oxidativo, têm sido descritos como as bases de muitas doenças neurodegenerativas.

Nossos achados em condições oxidativas sugerem que astrócitos adultos são vulneráveis a ação de oxidantes biológicos. Níveis suprafisiológicos de H_2O_2 alteraram a permeabilidade de membrana e atividade mitocondrial. Como esperado, nestas condições encontramos redução na captação de glutamato e na atividade da GS, duas proteínas astrocíticas principalmente distribuídas na membrana celular. Os níveis de GSH reduziram provavelmente pela ausência de substrato e conversão à forma oxidada (Droge, 2002; Halliwell, 2001), numa tentativa de conter o alto teor de radicais livres produzido pelas células após exposição ao H_2O_2 .

Ainda, o status metabólico mitocondrial em astrócitos adultos foi reduzido, como medido pelo teste do MTT (indicativo da atividade da succinato desidrogenase) (Klamt et al, 2002; Lin et al, 2007; Pertusa et al, 2007). Isto foi possível observar, pois em 30 minutos, tempo aproximado de reação ao MTT em culturas de neonatos, não gerou reação de cor quando aplicado a cultura de adultos, indicando que a atividade das desidrogenases é mais lenta em cultura de astrócitos adultos.

Em condições normais, a via de sinalização da Rho A induz a formação de fibras de estresse e adesões focais (Funchal et al, 2004; Guasch et al, 2003; Quincozes-Santos et al, 2009). Em nossos experimentos conseguimos mostrar, pela primeira vez, que o LPA previne os efeitos do excesso de Zn^{2+} no citoesqueleto de actina. Aumentos nas concentrações intracelulares de Zn^{2+} podem levar a lesão celular, sendo que a homeostase deste íon,

intracelularmente, depende da disponibilidade de GSH, a qual é capaz de tamponar o excesso de Zn^{2+} livre nas células porque este íon se liga com alta afinidade a grupos tióis (Maret, 2009). Assim, podemos observar que o conteúdo de GSH dos astrócitos adultos consegue manter os efeitos do excesso de Zn^{2+} apenas em alterações morfológicas num primeiro momento, não havendo morte celular aparente, como demonstrou o experimento de incorporação do corante iodeto de propídio.

O papel da p38 MAPK na resposta astrogliar ao estresse oxidativo também foi observada em astrócitos adultos cultivados. Neste sentido, considerando nossos objetivos, devemos enfatizar que a via de sinalização da MAPK é fortemente associada com transportadores de glutamato e estresse oxidativo após insultos. Além da peroxidação lipídica, a rede de filamentos do citoesqueleto é um dos primeiros alvos do estresse oxidativo (Dalle-Donne et al, 2001; Zhao & Davis, 1998). Alguns estudos vêm demonstrando que a perturbação de proteínas de citoesqueleto é um dos passos iniciais para o dano celular induzido por oxidantes (Zhu et al, 2005) e aqui, demonstramos que a exposição a altos níveis de H_2O_2 induz mudanças na estrutura e reorganização espacial de filamentos de actina, sendo estes efeitos revertidos quando esta via de sinalização é bloqueada.

Santello e colaboradores (Santello et al) (2011) recentemente demonstraram que o $TNF-\alpha$ controla criticamente a gliotransmissão glutamatérgica. Esta citocina pró-inflamatória tem várias funções importantes no SNC, incluindo ativação microglial e astrocitária e plasticidade sináptica. Estímulos inflamatórios induzem uma resposta em astrócitos adultos, como esperado. Ademais, estresse oxidativo também pode induzir resposta

inflamatória e TNF- α é essencial para a produção de outras citocinas envolvidas na neuroinflamação, outro processo associado ao envelhecimento.

Assim, conseguimos estabelecer, com este protocolo, um modelo adequado para estudo de doenças neurodegenerativas, as quais têm sua base molecular e bioquímica em três pilares: estresse oxidativo, neuroinflamação e excitotoxicidade glutamatérgica (Aschner et al, 2007; Bau et al, 2005; D'Alimonte et al, 2007; Frizzo et al, 2001; Schmidt et al, 2007). Nossos dados mostram que os astrócitos adultos exibem as respostas esperadas frente aos estímulos fornecidos, sendo eles um modelo *in vitro* da população astrocitária do cérebro adulto, o que permite a realização futura de diversos experimentos que testem alvos preventivos e/ou terapêuticos em situações neurodegenerativas *in vivo* e *in vitro*.

Em resumo, os resultados obtidos neste estudo sugerem a expressão dos principais marcadores astrocitários e atividade do sistema glutamatérgico. Estas células representam uma importante nova ferramenta para estudos *in vitro* e *in vivo*. Adicionalmente, sua habilidade neuroprotetora está reduzida, uma condição também observada em estudos *in vivo*. A resposta ao estresse oxidativo e ao estímulo inflamatório também foram observadas e mudanças no citoesqueleto foram observadas em astrócitos submetidos a estímulos. Desta maneira, o modelo de cultura descrito aqui exhibe propriedades bioquímicas e fisiológicas de astrócitos e pode ser útil para a compreensão dos mecanismos relacionados ao cérebro adulto e envelhecido. Ademais, as propriedades bioquímicas de astrócitos de animais submetidos previamente a lesões ou modelos experimentais, condições de neurotoxicidade e neuroproteção também poderão ser avaliados.

PERSPECTIVAS

Com o desenvolvimento deste protocolo e caracterização da cultura, nós acreditamos ter estabelecido um importante modelo para o estudo de aspectos celulares e moleculares de doenças neurodegenerativas. Assim, como perspectivas do trabalho, investigaremos as funções astrocitárias relacionadas às seguintes alterações no protocolo: diferenciação das células com dibutilil-AMPc; alterações nas concentrações de soro; ontogenia da cultura.

Também, devido ao foco da pesquisa do grupo, que é a investigação de efeitos neuroprotetores e neuromodulatórios de derivados de purinas da guanina, com especial atenção ao nucleosídeo guanosina (Schmidt et al, 2007), buscaremos investigar os efeitos deste composto frente aos seguintes insultos *in vitro*:

- butionina sufoximina, uma toxina inibidora da síntese de GSH (Lee et al);

- ácido ocadáico, uma neurotoxina inibidora de proteínas fosfatases (Boe et al, 1991);

- lipopolissacarídeo, um componente de parede celular de bactérias gram-negativas, potente indutor de resposta inflamatória (Guerra et al).

E, finalizando, como abordagem inovadora, usaremos modelos *in vivo* de neurodegeneração, a partir da indução de demência por estreptozotocina (Pinton, 2011). Será avaliado o dano cognitivo dos animais e, posteriormente, elaboraremos a cultura de astrócitos para avaliar aspectos moleculares e bioquímicos, assim como, neuroproteção pela guanosina e outros agentes neuroprotetores.

REFERÊNCIAS

- Adami C, Bianchi R, Pula G, Donato R (2004) S100B-stimulated NO production by BV-2 microglia is independent of RAGE transducing activity but dependent on RAGE extracellular domain. *Biochim Biophys Acta* **1742**(1-3): 169-177
- Allaman I, Belanger M, Magistretti PJ Astrocyte-neuron metabolic relationships: for better and for worse. *Trends Neurosci* **34**(2): 76-87
- Anderson CM, Swanson RA (2000) Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia* **32**(1): 1-14
- Aschner M, Syversen T, Souza DO, Rocha JB, Farina M (2007) Involvement of glutamate and reactive oxygen species in methylmercury neurotoxicity. *Braz J Med Biol Res* **40**(3): 285-291
- Bak LK, Schousboe A, Waagepetersen HS (2006) The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. *J Neurochem* **98**(3): 641-653
- Banerjee R, Vitvitsky V, Garg SK (2008) The undertow of sulfur metabolism on glutamatergic neurotransmission. *Trends Biochem Sci* **33**(9): 413-419
- Bau C, Middlemiss PJ, Hindley S, Jiang S, Ciccarelli R, Caciagli F, Diiorio P, Werstiuk ES, Rathbone MP (2005) Guanosine stimulates neurite outgrowth in PC12 cells via activation of heme oxygenase and cyclic GMP. *Purinergic Signal* **1**(2): 161-172
- Beckstrom H, Julsrud L, Haugeto O, Dewar D, Graham DI, Lehre KP, Storm-Mathisen J, Danbolt NC (1999) Interindividual differences in the levels of the glutamate transporters GLAST and GLT, but no clear correlation with Alzheimer's disease. *J Neurosci Res* **55**(2): 218-229
- Belanger M, Allaman I, Magistretti PJ Brain energy metabolism: focus on astrocyte-neuron metabolic cooperation. *Cell Metab* **14**(6): 724-738
- Bianchi R, Giambanco I, Donato R (2008) S100B/RAGE-dependent activation of microglia via NF-kappaB and AP-1 Co-regulation of COX-2 expression by S100B, IL-1beta and TNF-alpha. *Neurobiol Aging*
- Boe R, Gjertsen BT, Vintermyr OK, Houge G, Lanotte M, Doskeland SO (1991) The protein phosphatase inhibitor okadaic acid induces morphological changes typical of apoptosis in mammalian cells. *Exp Cell Res* **195**(1): 237-246
- Brozzi F, Arcuri C, Giambanco I, Donato R (2009) S100B Protein Regulates Astrocyte Shape and Migration via Interaction with Src Kinase: IMPLICATIONS FOR ASTROCYTE DEVELOPMENT, ACTIVATION, AND TUMOR GROWTH. *J Biol Chem* **284**(13): 8797-8811
- D'Alimonte I, Flati V, D'Auro M, Toniato E, Martinotti S, Rathbone MP, Jiang S, Ballerini P, Di Iorio P, Caciagli F, Ciccarelli R (2007) Guanosine inhibits CD40 receptor expression and function induced by cytokines and beta amyloid in mouse microglia cells. *J Immunol* **178**(2): 720-731

Dalle-Donne I, Rossi R, Milzani A, Di Simplicio P, Colombo R (2001) The actin cytoskeleton response to oxidants: from small heat shock protein phosphorylation to changes in the redox state of actin itself. *Free Radic Biol Med* **31**(12): 1624-1632

Danbolt NC (2001) Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* **65**(1): 1-105

Desclaux M, Teigell M, Amar L, Vogel R, Gimenez YRM, Privat A, Mallet J (2009) A novel and efficient gene transfer strategy reduces glial reactivity and improves neuronal survival and axonal growth in vitro. *PLoS One* **4**(7): e6227

Droge W (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* **82**(1): 47-95

Duan S, Anderson CM, Stein BA, Swanson RA (1999) Glutamate induces rapid upregulation of astrocyte glutamate transport and cell-surface expression of GLAST. *J Neurosci* **19**(23): 10193-10200

Eulenburg V, Gomeza J Neurotransmitter transporters expressed in glial cells as regulators of synapse function. *Brain Res Rev* **63**(1-2): 103-112

Eulenburg V, Retiounskaia M, Papadopoulos T, Gomeza J, Betz H Glial glycine transporter 1 function is essential for early postnatal survival but dispensable in adult mice. *Glia* **58**(9): 1066-1073

Ferrarese C, Begni B, Canevari C, Zoia C, Piolti R, Frigo M, Appollonio I, Frattola L (2000) Glutamate uptake is decreased in platelets from Alzheimer's disease patients. *Ann Neurol* **47**(5): 641-643

Frisen J, Johansson CB, Torok C, Risling M, Lendahl U (1995) Rapid, widespread, and longlasting induction of nestin contributes to the generation of glial scar tissue after CNS injury. *J Cell Biol* **131**(2): 453-464

Frizzo ME, Lara DR, Dahm KC, Prokopiuk AS, Swanson RA, Souza DO (2001) Activation of glutamate uptake by guanosine in primary astrocyte cultures. *Neuroreport* **12**(4): 879-881

Funchal C, Gottfried C, De Almeida LM, Wajner M, Pessoa-Pureur R (2004) Evidence that the branched-chain alpha-keto acids accumulating in maple syrup urine disease induce morphological alterations and death in cultured astrocytes from rat cerebral cortex. *Glia* **48**(3): 230-240

Garden GA, Moller T (2006) Microglia biology in health and disease. *J Neuroimmune Pharmacol* **1**(2): 127-137

Gardoni F, Di Luca M (2006) New targets for pharmacological intervention in the glutamatergic synapse. *Eur J Pharmacol* **545**(1): 2-10

Gottfried C, Tramontina F, Goncalves D, Goncalves CA, Moriguchi E, Dias RD, Wofchuk ST, Souza DO (2002) Glutamate uptake in cultured astrocytes depends on age: a study about the effect of guanosine and the sensitivity to oxidative stress induced by H₂O₂. *Mech Ageing Dev* **123**(10): 1333-1340

Gu Z, Du Y, Liu Y, Ma L, Li L, Gong Y, Tian H, Li C Effect of aging on islet beta-cell function and its mechanisms in Wistar rats. *Age (Dordr)*

Guasch RM, Tomas M, Minambres R, Valles S, Renau-Piqueras J, Guerri C (2003) RhoA and lysophosphatidic acid are involved in the actin cytoskeleton reorganization of astrocytes exposed to ethanol. *J Neurosci Res* **72**(4): 487-502

Guerra MC, Tortorelli LS, Galland F, Da Re C, Negri E, Engelke DS, Rodrigues L, Leite MC, Goncalves CA Lipopolysaccharide modulates astrocytic S100B secretion: a study in cerebrospinal fluid and astrocyte cultures from rats. *J Neuroinflammation* **8**: 128

Halassa MM, Haydon PG Integrated brain circuits: astrocytic networks modulate neuronal activity and behavior. *Annu Rev Physiol* **72**: 335-355

Halliwell B (2001) Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging* **18**(9): 685-716

Hertz L, Peng L, Lai JC (1998) Functional studies in cultured astrocytes. *Methods* **16**(3): 293-310

Holmin S, Almqvist P, Lendahl U, Mathiesen T (1997) Adult nestin-expressing subependymal cells differentiate to astrocytes in response to brain injury. *Eur J Neurosci* **9**(1): 65-75

Izquierdo I, Bevilaqua LR, Rossato JI, Bonini JS, Medina JH, Cammarota M (2006) Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. *Trends Neurosci* **29**(9): 496-505

Klamt F, Gottfried C, Tramontina F, Dal-Pizzol F, Da Frola ML, Jr., Moreira JC, Dias RD, Moriguchi E, Wofchuk S, Souza DO (2002) Time-related increase in mitochondrial superoxide production, biomolecule damage and antioxidant enzyme activities in cortical astrocyte cultures. *Neuroreport* **13**(12): 1515-1518

Lee M, Cho T, Jantaratnotai N, Wang YT, McGeer E, McGeer PL Depletion of GSH in glial cells induces neurotoxicity: relevance to aging and degenerative neurological diseases. *FASEB J* **24**(7): 2533-2545

Lepekhin EA, Eliasson C, Berthold CH, Berezin V, Bock E, Pekny M (2001) Intermediate filaments regulate astrocyte motility. *J Neurochem* **79**(3): 617-625

Lin DT, Wu J, Holstein D, Upadhyay G, Rourke W, Muller E, Lechleiter JD (2007) Ca²⁺ signaling, mitochondria and sensitivity to oxidative stress in aging astrocytes. *Neurobiol Aging* **28**(1): 99-111

Maret W (2009) Molecular aspects of human cellular zinc homeostasis: redox control of zinc potentials and zinc signals. *Biometals* **22**(1): 149-157

Marvin MJ, Dahlstrand J, Lendahl U, McKay RD (1998) A rod end deletion in the intermediate filament protein nestin alters its subcellular localization in neuroepithelial cells of transgenic mice. *J Cell Sci* **111** (Pt **14**): 1951-1961

Menet V, Gimenez y Ribotta M, Chauvet N, Drian MJ, Lannoy J, Colucci-Guyon E, Privat A (2001) Inactivation of the glial fibrillary acidic protein gene, but not that of vimentin, improves

neuronal survival and neurite growth by modifying adhesion molecule expression. *J Neurosci* **21**(16): 6147-6158

Paixao S, Klein R Neuron-astrocyte communication and synaptic plasticity. *Curr Opin Neurobiol* **20**(4): 466-473

Pertusa M, Garcia-Matas S, Rodriguez-Farre E, Sanfeliu C, Cristofol R (2007) Astrocytes aged in vitro show a decreased neuroprotective capacity. *J Neurochem* **101**(3): 794-805

Pivovarova NB, Andrews SB Calcium-dependent mitochondrial function and dysfunction in neurons. *FEBS J* **277**(18): 3622-3636

Pongrac JL, Rylett RJ (1998) Optimization of serum-free culture conditions for growth of embryonic rat cholinergic basal forebrain neurons. *J Neurosci Methods* **84**(1-2): 69-76

Quincozes-Santos A, Nardin P, de Souza DF, Gelain DP, Moreira JC, Latini A, Goncalves CA, Gottfried C (2009) The janus face of resveratrol in astroglial cells. *Neurotox Res* **16**(1): 30-41

Rodrigues L, Biasibetti R, Swarowsky A, Leite MC, Quincozes-Santos A, Quilfeldt JA, Achaval M, Goncalves CA (2009) Hippocampal alterations in rats submitted to streptozotocin-induced dementia model are prevented by aminoguanidine. *J Alzheimers Dis* **17**(1): 193-202

Rozovsky I, Finch CE, Morgan TE (1998) Age-related activation of microglia and astrocytes: in vitro studies show persistent phenotypes of aging, increased proliferation, and resistance to down-regulation. *Neurobiol Aging* **19**(1): 97-103

Santello M, Bezzi P, Volterra A TNFalpha controls glutamatergic gliotransmission in the hippocampal dentate gyrus. *Neuron* **69**(5): 988-1001

Schmidt AP, Lara DR, Souza DO (2007) Proposal of a guanine-based purinergic system in the mammalian central nervous system. *Pharmacol Ther* **116**(3): 401-416

Schwartz JP, Wilson DJ (1992) Preparation and characterization of type 1 astrocytes cultured from adult rat cortex, cerebellum, and striatum. *Glia* **5**(1): 75-80

Segovia G, Del Arco A, Prieto L, Mora F (2001a) Glutamate-glutamine cycle and aging in striatum of the awake rat: effects of a glutamate transporter blocker. *Neurochem Res* **26**(1): 37-41

Segovia G, Porras A, Del Arco A, Mora F (2001b) Glutamatergic neurotransmission in aging: a critical perspective. *Mech Ageing Dev* **122**(1): 1-29

Swanson RA, Liu J, Miller JW, Rothstein JD, Farrell K, Stein BA, Longuemare MC (1997) Neuronal regulation of glutamate transporter subtype expression in astrocytes. *J Neurosci* **17**(3): 932-940

Tanaka K (2000) Functions of glutamate transporters in the brain. *Neurosci Res* **37**(1): 15-19

Van Eldik LJ, Wainwright MS (2003) The Janus face of glial-derived S100B: beneficial and detrimental functions in the brain. *Restor Neurol Neurosci* **21**(3-4): 97-108

Verkhatsky A, Olabarria M, Noristani HN, Yeh CY, Rodriguez JJ Astrocytes in Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics* **7**(4): 399-412

Wanner IB An in vitro trauma model to study rodent and human astrocyte reactivity. *Methods Mol Biol* **814**: 189-219

Yang Y, Vidensky S, Jin L, Jie C, Lorenzini I, Frankl M, Rothstein JD Molecular comparison of GLT1+ and ALDH1L1+ astrocytes in vivo in astroglial reporter mice. *Glia* **59**(2): 200-207

Yokoyama A, Yang L, Itoh S, Mori K, Tanaka J (2004) Microglia, a potential source of neurons, astrocytes, and oligodendrocytes. *Glia* **45**(1): 96-104

Zhao Y, Davis HW (1998) Hydrogen peroxide-induced cytoskeletal rearrangement in cultured pulmonary endothelial cells. *J Cell Physiol* **174**(3): 370-379

Zhu D, Tan KS, Zhang X, Sun AY, Sun GY, Lee JC (2005) Hydrogen peroxide alters membrane and cytoskeleton properties and increases intercellular connections in astrocytes. *J Cell Sci* **118**(Pt 16): 3695-3703

Zoia C, Cogliati T, Tagliabue E, Cavaletti G, Sala G, Galimberti G, Rivolta I, Rossi V, Frattola L, Ferrarese C (2004) Glutamate transporters in platelets: EAAT1 decrease in aging and in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **25**(2): 149-157