

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Faculdade de Farmácia
Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

ANÁLISE ONTOGENÉTICA DE CULTURAS DE ASTRÓCITOS
HIPOCAMPAIS

Bruna Bellaver

Porto Alegre, junho de 2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Faculdade de Farmácia
Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

ANÁLISE ONTOGENÉTICA DE CULTURAS DE ASTRÓCITOS
HIPOCAMPAIS

Bruna Bellaver

Orientador: Prof. Dr. Diogo Onofre Souza

Co-orientador: Dr. André Quincozes dos Santos

Trabalho de conclusão de curso
apresentado como requisito parcial
para obtenção do título de
Farmacêutico pelo curso de Farmácia
da Universidade Federal do Rio Grande
do Sul.

Porto Alegre, junho de 2013

ÍNDICE

RESUMO	4
1. INTRODUÇÃO	5
1.1 OS HEMISFÉRIOS CEREBRAIS	5
1.1.1 CÓRTEX	5
1.1.2 AMIGDALA	5
1.1.3 NÚCLEOS DA BASE	5
1.1.4 HIPOCAMPO	5
2. SISTEMA NERVOSO CENTRAL – ANATOMIA CELULAR	6
2.1 OS ASTRÓCITOS	6
2.2 CULTURA DE ASTRÓCITOS	8
2.3 MARCADORES ASTROCITÁRIOS	9
2.3.1 PROTEÍNA GLIAL FIBRILAR ÁCIDA (GFAP) E VIMENTINA	9
2.3.2 TRANSPORTADORES GLUTAMATO ASTROCITÁRIOS	9
2.3.3 GLUTAMINA SINTETASE	10
3. DEFESAS ANTIOXIDANTES	10
3.1 GSH	11
4. OBJETIVOS	11
5. MATERIAIS E MÉTODOS	11
5.1 OBTENÇÃO DAS CULTURAS PRIMÁRIAS DE ASTRÓCITOS	11
5.2 MANUTENÇÃO DA CULTURA	12
5.3 IMUNOCITOQUÍMICA	12
5.4 ATIVIDADE DA GLUTAMINA SINTETASE	13
5.5 CONTEÚDO DE GLUTATIONA	13
5.6 DOSAGEM DE PROTEÍNAS	14
5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	14
6. RESULTADOS	14
7. DISCUSSÃO	15
LEGENDAS DAS FIGURAS	20
FIGURAS	21
REFERÊNCIAS	26

RESUMO

A compreensão do funcionamento da estrutura hipocampal é de extrema importância para o entendimento de processos de aprendizado e memória que estão frequentemente associados ao envelhecimento cerebral. Considerando a relevância dessa estrutura cerebral e também a fundamental importância dos astrócitos para manutenção das condições fisiológicas do sistema nervoso central, nesse estudo foi estabelecido e caracterizado um modelo de cultura de astrócitos hipocampais de ratos Wistar adultos e envelhecidos, 90 e 180 dias, respectivamente. Para a preparação da cultura, os cérebros foram cuidadosamente dissecados e o hipocampo foi dissociado enzimaticamente, com tripsina, e também mecanicamente. As células foram semeadas em placas com poli-L-lisina e cultivadas em atmosfera com 5% CO₂ com DMEM/F12 (10% de soro fetal bovino (SFB)) nas duas primeiras semanas e DMEM/F12 (20% SFB) até atingirem a confluência. Ao final deste período, observou-se que as células apresentavam morfologia poligonal caracteristicamente astrocitária, e apresentavam extensiva marcação para importantes marcadores gliais como a proteína glial fibrilar ácida (GFAP), a proteína de citoesqueleto vimentina e a enzima glutamina sintetase (GS). Ainda foi observada marcação de outras proteínas caracteristicamente astrocíticas como os transportadores de glutamato, GLAST e GLT-1. Também foi avaliada a atividade da GS e o conteúdo de glutatona (GSH). Portanto, com este trabalho conseguimos estabelecer um protocolo de cultura de astrócitos hipocampais de ratos Wistar de 90 e 180 dias, adequado para o estudo de patologias que tenham suas bases relacionadas à região hipocampal e ao envelhecimento cerebral, permitindo, futuramente, a realização de experimentos que testem tanto alvos preventivos como terapêuticos em situações neurodegenerativas *in vivo* e *in vitro*.

INTRODUÇÃO

1 – SISTEMA NERVOSO CENTRAL – Anatomia

O Sistema Nervoso Central (SNC) é formado por duas regiões: a medula espinhal e o encéfalo. O encéfalo é subdividido em tronco cerebral (bulbo, ponte e mesencéfalo), cerebelo, diencefalo e hemisférios cerebrais. Já a medula espinhal, participa diretamente no controle dos movimentos corporais e processamento sensorial de informações advindas de outros locais do corpo.

1.1 – Os hemisférios cerebrais

Os hemisférios cerebrais possuem quatro componentes maiores, que juntos participam do que há de mais refinado no comportamento humano.

1.1.1. Córtex é essencial para o comportamento motor, percepção do tato, dor, posição dos membros, percepções sensoriais provenientes da pele, músculos e articulações e percepção visual;

1.1.2. Amígdala, estrutura que está relacionada não apenas com emoções, mas também com a coordenação de respostas corporais a situações estressantes ou ameaçadoras;

1.1.3. Núcleos da base, que são um conjunto de neurônios que participam de diversas funções em cooperação com o córtex cerebral, estando intimamente ligado ao controle de movimentos, emoções e cognição;

1.1.4. Hipocampo é uma estrutura altamente especializada que, além de estar envolvido nos processos de aprendizado e memória é também uma área altamente reativa a uma variedade de tratamentos. Devido a sua importante funcionalidade, o hipocampo tem recebido crescente interesse de pesquisadores (Raine, Cedric S. Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects).

Esta estrutura, juntamente com a amígdala, encéfalo e diencefalo, faz parte do sistema límbico, que desempenha um papel-chave na conduta humana, sendo esse sistema frequentemente associado a disfunções psiquiátricas (Machado, A Neuroanatomia Funcional). Muitos estudos apontam que esta estrutura desempenha um papel crítico na memória declarativa, ou

seja, em nossa capacidade de recordar fatos e eventos cotidianos. Estudos sugerem que o processamento de memória, mediado pelo sistema hipocampal, começa durante a aprendizagem e continua contribuindo para a consolidação de memórias por um período de tempo prolongado (Corkin, 1984). Alguns autores demonstraram haver perda de memória em roedores, após lesão cirúrgica limitada ao hipocampo, evidenciada quando os mesmos foram submetidos a tarefas que exigissem aptidões de memória e aprendizado (Eichenbau et al., 1989; Olton et al., 1979; Sutherland et al., 1989).

Em concordância com experimentos realizados em animais, estudos em humanos, que apresentavam problemas de memória já diagnosticados, permitiram, através de técnicas de ressonância magnética, a observação visual de anormalidade hipocampal, uma vez que esta estrutura mostrou-se significativamente diminuída e atrófica (Squire et al., 1990).

O hipocampo também está envolvido na gênese de distúrbios convulsivos em humanos e roedores. Quaisquer elevações substanciais nos níveis normais de atividade nesta estrutura disparam centenas de mudanças mensuráveis nas células e nos circuitos hipocampais (Morimoto et al., 2004).

2 – SISTEMA NERVOSO CENTRAL – Anatomia celular

O parênquima no Sistema Nervoso Central (SNC) é formado por células nervosas e suas extensões aferentes e eferentes, dendritos e axônios, todas estreitamente envoltas por células gliais. Além de neurônios, que são responsáveis pela transmissão do impulso nervoso, e células gliais, como os astrócitos e os oligodendrócitos, o parênquima do SNC contém vasos sanguíneos e células da microglia, que são os macrófagos residentes do SNC (Raine, Cedric S. Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects).

2.1 – OS ASTRÓCITOS

Os astrócitos, células gliais que representam aproximadamente 50% do número total de células do SNC, têm a maior diversidade funcional do cérebro, além de uma capacidade dinâmica de alterar seu fenótipo no decorrer da vida

(Shao e McCarthy, 1994). Ao longo dos últimos anos, tornou-se claro que os astrócitos são responsáveis por uma variedade de funções complexas e essenciais ao SNC. São células-chave na manutenção de condições fisiológicas e patológicas deste sistema (Maragakis e Rothstein 2006; Nedergaard et al., 2003;. Wang e Bordey, 2008).

Os astrócitos estão permanentemente em contato e tem múltiplas interações bidirecionais com vasos sanguíneos, o que permite a eles controlar o fluxo sanguíneo do SNC. Estudos demonstram que os astrócitos produzem e liberam diversas moléculas mediadoras que podem aumentar ou diminuir o diâmetro dos vasos sanguíneos e, conseqüentemente regular o fluxo sanguíneo local (Gordon G et al., 2007). Além disso, os astrócitos podem ser mediadores locais primários do fluxo sanguíneo do SNC em resposta a alterações na atividade neuronal (Koehler R et al., 2009).

Devido a essa posição-chave ocupada pelos astrócitos, na qual seus processos se mantêm em contato tanto com os vasos sanguíneos quanto em contato com os neurônios, eles são capazes de captar a glicose do sangue, fornecendo energia para manutenção da atividade neuronal (Peters A et al., 1991). Além disso, o astrócito é o principal local de armazenamento de grânulos de glicogênio no SNC e essa reserva pode sustentar a atividade neuronal durante curtos períodos de hipoglicemia e de demanda energética tecidual aumentada (Brown AM et al., 2007).

A manutenção da barreira hematoencefálica (BHE) também é de fundamental importância para o funcionamento normal do SNC. Ela permite que pequenas moléculas lipofílicas como CO_2 e O_2 penetrem livremente, de acordo com o seu gradiente de concentração, ao passo que limita o fluxo de moléculas hidrofílicas. Nutrientes tais como a glicose e os aminoácidos entram no cérebro por meio de transportadores, enquanto moléculas de maiores dimensões, atravessam a BHE por endocitose mediada por receptor (Pardridge et al, 1985 e Zhang e Pardridge, 2001).

Outra função a eles atribuída é a manutenção da homeostase iônica e pH. 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 extrema importância para o equilíbrio eletroquímico dos neurônios, visto que altas concentrações de potássio no meio extracelular resultam em despolarização neuronal, hiperexcitabilidade e convulsões, sendo, portanto essencial para a transmissão sináptica normal.

Existem também evidências de que os astrócitos desempenham um papel direto na transmissão sináptica pela liberação regulada de moléculas sinápticamente ativas, como ATP, adenosina, GABA, D-serina e glutamato (Halassa M et al., 2007). Os astrócitos ainda liberam fatores de crescimento que são moléculas capazes de controlar a maturação, sobrevivência e diferenciação neuronais.

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.

2.2 CULTURA DE ASTRÓCITOS

Devido ao fato de que os astrócitos são responsáveis por inúmeras e distintas funções, a cultura dessas células gliais pode ser utilizada para diversas finalidades. Elas são bastante úteis como modelo para estudos metabólicos relacionados ao sistema glutamatérgico, estresse oxidativo, resposta inflamatória e senescência (Pertusa et al., 2007), bem como para elucidar seu papel em condições fisiopatológicas. Culturas gliais também são adequadas para o estudo de novos tratamentos com compostos que atuam sobre os receptores de glutamato astrocitários (Gallo e Russell, 1995;. Cauley et al., 1997) ou que induzam vias neuroprotetoras em astrócitos (Ramos et al., 2004). Classicamente culturas astrocitárias são realizadas a partir de animais neonatos e embora não muito estudadas, as culturas provenientes de animais adultos podem ser uma ferramenta útil no estudo de células gliais que já tem suas conexões cerebrais bem estabelecidas e organizadas, podendo contribuir para o melhor entendimento do papel do astrócito no envelhecimento cerebral. Cabe ressaltar que há numerosas evidências de alterações nas funções

astrocitárias, incluindo mudanças na homeostase redox e no metabolismo do glutamato, que têm sido relacionadas ao envelhecimento e a doenças neurodegenerativas (Sofroniew, 2010).

2.3 – MARCADORES ASTROCITÁRIOS

2.3.1 – PROTEÍNA GLIAL FRIBRILAR ÁCIDA (GFAP) E VIMENTINA

Os filamentos de proteínas intermediárias constituem uma família extremamente grande e multigênica de proteínas que estão presentes em células gliais de vertebrados. A GFAP é uma proteína estrutural que constitui a subunidade proteica de filamentos intermediários do tipo III do citoesqueleto glial (Rodnight et al., 1997). Essa proteína tem sua expressão progressivamente aumentada à medida que as células gliais vão se diferenciando. Esta proteína, de peso molecular aparente de 50 kDa, tem sido amplamente reconhecida como um marcador de diferenciação de astrócitos, constituindo a principal proteína de filamentos intermediários em astrócitos maduros (Bramanti. V et al., 2010).

Apesar de a GFAP ser a proteína de citoesqueleto astrocitária mais característica, é importante mencionar a existência de outra proteína de filamento intermediário, a vimentina. Durante o desenvolvimento, os astrócitos imaturos expressam principalmente vimentina que vai sendo progressivamente substituída por GFAP (Bramanti. V et al., 2010). Entretanto, em astrócitos primariamente cultivados, a transição vimentina – GFAP é incompleta e elas são, portanto, coexpressas (Bignami & Dahl, 1989; Ciesielski-Treska et al, 1988).

2.3.2 – TRANSPORTADORES DE GLUTAMATO ASTROCITÁRIOS

Como dito anteriormente, os astrócitos desempenham um papel-chave na regulação da transmissão sináptica. Em particular, os astrócitos controlam indiretamente a transmissão de glutamato através da absorção eficiente e específica deste neurotransmissor excitatório (Anderson e Swanson, 2000). A captação de glutamato envolve uma variedade de transportadores de

membrana específicos deste aminoácido pertencentes à família de transportadores sódio-dependentes. Existem três principais subtipos destes transportadores, um deles, neuronal, o EAAC1, e os outros dois astrocitários, GLAST e GLT-1, sendo o último o maior responsável pela retirada de glutamato da fenda sináptica no cérebro adulto, evitando assim o dano neuronal devido à elevada atividade excitatória do glutamato (Huang e Bergles, 2004).

2.3.3 – GLUTAMINA SINTETASE

Os astrócitos possuem também a enzima glutamina sintetase (GS) (Norenberg & Martinez-Hernandez, 1979). Essa enzima proporciona aos astrócitos 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), captam a grande maioria do glutamato extracelular (especialmente o que foi liberado nas comunicações neuronais) e o convertem a glutamina, via enzima GS. A glutamina gerada é lançada de volta para terminais pré-sinápticos e é utilizada na síntese *de novo* do neurotransmissor glutamato nos neurônios.

3 – DEFESAS ANTIOXIDANTES

No cérebro *in vivo*, constantemente estão sendo gerados radicais livres. Devido à alta taxa metabólica cerebral e aos elevados níveis de ácidos graxos poli-insaturados, o cérebro é altamente vulnerável ao estresse oxidativo (Halliwell 1992). Para controlar o aumento da geração de espécies reativas de oxigênio (ERO), o nosso organismo possui um sistema de defesa antioxidante e uma diminuição nessa capacidade antioxidante poderá comprometer severamente a função celular.

Este sistema antioxidante pode ser subdividido em não enzimáticos, como a glutatona (GSH), e em enzimático, que inclui a catalase, a superóxido dismutase e a heme-oxigenase, que são capazes de detoxificar as EROs em espécies menos danosas às células. Neste estudo daremos foco ao sistema antioxidante não enzimático.

3.1- GSH

GSH é um tripeptídeo formado por glicina, glutamato e cisteína e sabe-se que os astrócitos possuem um elevado conteúdo deste composto que é considerado uma das principais defesas antioxidantes cerebrais (Dringen, 2000). A GSH é uma defesa não enzimática que exerce seu efeito antioxidante reagindo diretamente com ERO's, ou sofrendo oxidação pela ação da enzima glutathione peroxidase (Pope et al., 2008).

4 - OBJETIVOS

Este estudo teve como objetivo principal estabelecer um protocolo de cultura hipocampal de astrócitos a partir de ratos Wistar em diferentes idades – 1, 90 e 180 dias - e caracteriza-las morfofuncionalmente, a fim de comparar o perfil desses astrócitos ao longo do tempo.

A caracterização foi realizada através da determinação imunocitoquímica dos seguintes marcadores gliais: GFAP, GLAST, GLT-1 e vimentina, na confluência celular. Também foi determinada a presença de actina em dois momentos de cultivo celular: 7 DIV (DIV – *dias in vitro*) e confluência. A atividade da GS e os níveis intracelulares de GSH foram avaliados, a fim de verificar a funcionalidade dessas células.

5 – MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 – OBTENÇÃO DAS CULTURAS PRIMÁRIAS DE ASTRÓCITOS

Para obtenção das culturas foram utilizados ratos wistar machos com 1, 90 e 180 dias de idade. Em ambiente asséptico, foram dissecadas as estruturas hipocampais desses animais. Durante o processo de dissecação as estruturas foram mantidas em solução de HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) contendo 0,05% de tripsina e 0,003% de DNase.

Após esse processo, essa solução foi aquecida a 37°C durante 8 minutos. Posteriormente foi realizada uma dissociação mecânica no tecido com

o auxílio de pipetas Pasteur por mais 7 minutos e adicionado 20% de soro fetal bovino (SFB) para inativação enzimática. Então a suspensão foi centrifugada a 1.000 rpm durante 5 minutos. O pellet obtido dessa centrifugação foi ressuspensão em solução de HBSS contendo apenas DNase 0,003%. Foi aguardado um período de 20 minutos para que houvesse a decantação de restos celulares. Ao fim desse período o sobrenadante foi coletado e centrifugado por 7 minutos. As células foram novamente ressuspensas, dessa vez em DMEM/F12 contendo 10% SFB, 15 mM de HEPES, 14,3 mM de bicarbonato de sódio, 1% de fungizona e 0,04% de gentamicina. As células foram semeadas em uma quantidade de $3-5 \times 10^5$ células/cm² em placas de 6 ou 24 poços pré-tratadas com poli-L-lisina e cultivadas em incubadora a 37°C em uma atmosfera com 95% de ar/ 5% CO₂.

5.2 – MANUTENÇÃO DA CULTURA

A primeira troca de meio foi realizada após 24 horas da obtenção da cultura. Durante a primeira semana foram realizadas trocas de meio a cada dois dias e a partir da segunda semana as trocas foram realizadas a cada quatro dias. Durante essas primeiras duas semanas foi utilizado DMEM/F12 10% SFB. A partir da terceira semana as células passaram a receber meio suplementado com 20% SFB, até atingirem a confluência que se dá em torno da quarta e quinta semanas, podendo assim ser utilizadas para os experimentos.

5.3 – IMUNOCITOQUÍMICA

A imunocitoquímica foi realizada conforme o protocolo previamente descrito por Brozzi et al, 2009. Primeiramente as células cultivadas (7 DIV e confluência) foram fixadas com paraformaldeído 4% durante 20 minutos e permeabilizadas com PBS Triton X-100 0,1%. Após, foi realizado um bloqueio com albumina 4% por 24 horas em câmara úmida. Então, por mais 24 horas, sob temperatura de 4°C as células foram incubadas com diferentes anticorpos: anti- GFAP (1:400), anti-GLAST (1:400), anti-GLT-1 (1:400), anti-β tubulina III (1:500), anti-CD11 (1:400), anti-glutamina sintetase (1:10.000), anti-vimentina (1:400). Após sucessivas lavagens utilizando PBS foram incubados, durante 2 horas à temperatura ambiente, os respectivos anticorpos secundários

conjugados com Alexa Flúor® 488 ou 594, para obtenção de fluorescência verde e vermelha, respectivamente. Para coloração do citoesqueleto de actina as células foram incubadas com faloidina 1 mg/mL durante 30 minutos. Os núcleos celulares foram corados com 0,2 µg/ml de 4', 6'-diamidino-2-fenilindolo (DAPI). As células foram observadas utilizando-se microscópio invertido Nikon e as imagens transferidas para computador com uma câmera digital (Sound Vision Inc., EUA).

5.4 – ATIVIDADE DA GLUTAMINA SINTETASE

Para realização desta técnica foi utilizado um protocolo previamente descrito por dos Santos et al. 2006. Foi realizado um homogeneizado com células confluídas e adicionada uma solução de reação composta por 10 mM de MgCl₂, 50 mM de L-glutamato, de tampão de imidazol-HCl (pH 7,4), 10 mM de 2-mercaptoetanol, 50 mM de hidroxilamina HCl, e 10 mM de ATP . Após, incubou-se a amostra com a solução durante 15 min a 37°C. Para interromper a reação foi adicionada uma solução contendo 370 mM de cloreto férrico, 670 mM de HCl e 200 mM de ácido tricloroacético. Após foi realizada uma centrifugação e a absorbância do sobrenadante foi medida a 530 nm e comparada com a absorbância obtida de um padrão de γ-glutamilhdroxamato tratado com o reagente cloreto férrico.

5.5 – CONTEÚDO DE GLUTATIONA

Esta técnica foi realizada conforme protocolo anteriormente descrito na literatura. (Browne e Armstrong, 1998). Resumidamente, foi feito um homogeneizado de células que foi diluído em um tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 8,0, contendo 5 mM de EDTA, e as proteínas foram precipitadas com 1,7% de ácido metafosfórico. O sobrenadante é tratado com o-ftaldialdeído (1 mg/ml em metanol) durante 15 minutos. A fluorescência foi medida utilizando comprimentos de onda de excitação e emissão de 350 e 420 nm, respectivamente. Uma curva de calibração foi realizada com soluções padrão de GSH (0-500 mM). As concentrações de GSH foram calculadas em nmol/mg de proteína.

5.6 – DOSAGEM DE PROTEÍNAS

A quantidade de proteínas foi medida pelo método de Lowry utilizando albumina do soro bovino como padrão (Lowry et al. 1951).

5.7 – ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram avaliados por ANOVA de uma via, seguido de teste de Tukey. $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

6 – RESULTADOS

Classicamente, os resultados de estudos realizados com culturas celulares são provenientes de culturas de animais neonatos, e em nosso estudo observamos a morfologia poligonal astrocitária característica destas células e a presença dos principais marcadores gliais nesses astrócitos hipocampais (Fig. 1A, B, C, D, E, F). Neste sentido, adotamos a cultura de astrócitos de ratos Wistar neonatos como controle para o protocolo de cultura de astrócitos de animais de 90 e 180 dias.

A integridade do citoesqueleto astrocitário é de fundamental importância para a funcionalidade celular uma vez que ele está envolvido na organização e reorganização da membrana plasmática e é essencial para os mecanismos de reconhecimento celular (Carraway, 2000). O citoesqueleto de actina é formado por fibras, conhecidas como fibras de estresse, que apresentam alinhamento paralelo, dispostas na mesma direção e sentido. Após marcação com faloidina, foi observado o citoesqueleto de actina de astrócitos cultivados a partir de animais de 90 e 180 dias em diferentes fases de divisão (7 DIV e confluência) e a sua integridade pode ser confirmada pela organização das fibras de estresse (Fig. 2A, B, E,F). Outros marcadores astrocitários também foram identificados em culturas hipocampais de animais adultos. A proteína de citoesqueleto GFAP foi observada através de marcação imunocitoquímica em animais de 90 e 180 dias (Fig. 2C, D, G, H), atestando o fenótipo astrocítico dessas células tanto com 7 dias de divisão como na confluência.

Uma importante função desempenhada pelos astrócitos é a manutenção de baixos níveis de glutamato na fenda sináptica, para tal atividade eles expressam transportadores de glutamato, GLT-1 e GLAST, que captam o glutamato da fenda e também expressam a enzima GS que converte esse

glutamato a glutamina. Em nosso estudo observamos, em animais adultos e envelhecidos, a extensa imunomarcaco desses dois transportadores de glutamato astrocitários (Fig. 3C, D e Fig. 4C, D) bem como a presença dessa característica enzima astrocitária (Fig. 3B e Fig. 4B). Além da GFAP, outra importante proteína de citoesqueleto astrocitário, a vimentina, foi identificada nas culturas de animais adultos e envelhecidos (Fig. 3E, 4E).

Para determinar se as culturas apresentavam outros tipos celulares do SNC foram utilizados três anticorpos específicos: anti-CD11b/c (um anticorpo que reconhece a microglia), anti- β tubulina III (um anticorpo que reconhece microtúbulos expesso exclusivamente em neurônios) e anti-NeuN (um anticorpo que reconhece proteínas distribuídas em núcleos neuronais). Observamos uma marcao para microglia de aproximadamente 5% e não foi observada marcao para β tubulina III ou NeuN (dados não mostrados).

Dois dos principais destinos do glutamato, após ser captado pelos astrócitos, foram avaliados, a atividade da GS e o conteúdo de GSH. A atividade da GS apresenta-se reduzida em animais de 90 dias ($2 \pm 0,2 \mu\text{mol/mg prot/min}$, $P < 0,05$) quando comparados a neonatos ($2,6 \pm 0,2 \mu\text{mol/mg prot/min}$) e a reduo foi ainda maior em animais de 180 dias ($1,5 \pm 0,1 \mu\text{mol/mg prot/min}$, $P < 0,05$) (Fig. 5A). Em relao ao conteúdo de GSH, o perfil apresentou-se bastante semelhante ao de atividade de GS, portanto com valores de neonatos ($30 \pm 2 \text{ nmol/mg/prot,}$) superiores ao de animais adultos ($22 \pm 2,4 \text{ nmol/mg/prot}$, $P < 0,05$) e estes superiores ao de animais envelhecidos ($17 \pm 1,5 \text{ nmol/mg/prot}$, $P < 0,05$) (Fig. 5B).

7 – DISCUSSÃO

A compreensão do funcionamento da estrutura hipocampal  de extrema importância para o entendimento de processos de aprendizado e memória, e alteraes nesses processos estão frequentemente associados ao envelhecimento cerebral. Considerando a relevância dessa estrutura cerebral e também a fundamental importância dos astrócitos para manuteno das condies fisiológicas do SNC, nesse estudo nós estabelecemos e caracterizamos um modelo de cultura de astrócitos hipocampais de ratos Wistar adultos (90 e 180 dias).

Este protocolo de cultura celular monotípica do SNC pode contribuir significativamente para a compreensão das funções de cada tipo celular, sob a exposição ou não a condições adversas, pois elas representam uma maneira de estudar propriedades bioquímicas, celulares e moleculares específicas. Classicamente, culturas celulares astrocíticas são obtidas a partir de animais neonatos os quais possuem células com grande plasticidade e labilidade a estímulos. Os astrócitos cultivados a partir de cérebro adulto podem representar uma importante ferramenta para a compreensão de funções gliais porque seu tecido apresenta conexões já estabelecidas e, portanto mais organizadas do que o tecido neonato, representando mais fidedignamente a condição do cérebro adulto *in vivo* possibilitando a sua utilização para mimetizar diferentes modelos de patologias.

O citoesqueleto astrocitário, é uma estrutura altamente dinâmica que se reorganiza continuamente sempre que a célula altera a forma, se divide ou responde ao seu ambiente. As mudanças citoesqueléticas são a chave para a transmissão de sinais que levam a uma resposta celular apropriada (Alberts et al, 2002). As interações entre as proteínas de membrana e as proteínas do citoesqueleto têm papéis centrais nas respostas celulares. Observamos que nossas culturas hipocâmpais de animais adultos e envelhecidos apresentam citoesqueleto de actina com as suas fibras de estresse posicionadas na mesma direção e sentido indicando integridade celular.

Com o intuito de caracterizar a cultura obtida a partir desse protocolo, alguns marcadores gliais foram testados. Em astrócitos cultivados existem dois principais filamentos intermediários de citoesqueleto, a GFAP e a vimentina, que têm suas expressões finamente reguladas durante o desenvolvimento e são associadas à diferenciação astrocitária (Desclaux et al, 2009). Em concordância com estudos anteriores, nossos resultados demonstraram a coexpressão de GFAP e vimentina em cultura de astrócitos (Menet et al, 2001; Pertusa et al, 2007). O papel fisiológico exato de GFAP e de vimentina em astrócitos ainda não está completamente entendido, mas o que se sabe é que essas proteínas parecem estar envolvidas na manutenção da forma, estabilidade mecânica, citoarquitetura do SNC e função sináptica (Menet et al, 2001). Os astrócitos também são ativados em situações de dano no SNC. Uma

das características observadas durante a ativação glial é a expressão aumentada de GFAP em um processo chamado astrogliose reativa que ocorre em situações como trauma, insultos químicos e doenças neurodegenerativas (Eng et al., 2000).

Outros marcadores astrocitários também foram investigados, sendo confirmada a presença dos transportadores de glutamato astrocitários, GLAST e GLT-1 e a expressão da enzima GS, que é expressa apenas por astrócitos no cérebro, sendo ela essencial para a manutenção dos níveis de glutamato no SNC.

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório no sistema nervoso central de mamíferos. Esse aminoácido é também uma potente neurotoxina, e a excitotoxicidade glutamatérgica tem sido implicada na patogênese de esclerose lateral amiotrófica, epilepsia e outras doenças neurológicas. A captação de glutamato do espaço extracelular é realizada primariamente por transporte mediado por transportadores de glutamato, sendo que os principais, GLAST e GLT-1, são expressos por astrócitos (Anderson & Swanson, 2000; Danbolt, 2001). Nossos resultados demonstram, através de marcação imunocitoquímica, a presença destes dois transportadores astrocitários nas três idades cultivadas demonstrando mais uma semelhança com o cérebro animal adulto *in vivo* sendo mais uma evidência de que a utilização desse tipo de cultura é uma boa ferramenta para estudos de desenvolvimento e envelhecimento cerebrais.

Como foi anteriormente descrito, a GS tem um papel crucial para manutenção dos níveis de glutamato cerebral. Sendo a glutamina uma importante fonte de glutamato, ela também ajuda a manter os níveis de GSH, que é uma das principais defesas antioxidantes cerebrais (Banerjee et al., 2008). Nosso grupo foi pioneiro no estudo desses parâmetros, os resultados de Souza et al demonstraram que em culturas corticais de animais de 90 dias há tanto uma diminuição de atividade de GS quanto uma diminuição no conteúdo de glutathiona quando comparadas a culturas de animais neonatos (Souza et al., 2013). Corroborando com estes resultados encontrados em córtex, este estudo, que utilizou a região hipocampal para obtenção das culturas, mostrou que paralelamente ao envelhecimento cerebral há uma diminuição na atividade

da enzima GS e também do conteúdo de GSH. Portanto as culturas obtidas a partir de animais neonatos apresentaram uma maior atividade de GS e conteúdo de GSH quando comparadas com as culturas de animais de 90 e estas por sua vez, níveis mais elevados destes parâmetros quando comparadas às culturas de animais de 180 dias. Com a depleção dos níveis de GSH e consequente aumento no estresse oxidativo pode ocorrer neurotoxicidade, pois tanto os transportadores de glutamato, quanto a atividade de GS são sensíveis ao estresse oxidativo. Além disso, recentemente, Lee e colaboradores demonstraram que a diminuição do conteúdo de GSH leva ao aumento da resposta inflamatória celular, com aumento dos níveis de TNF- α e IL-1 β , clássicas citocinas pró-inflamatórias (Lee et al., 2010). Alterações nestes aspectos (metabolismo glutamatérgico, resposta antioxidante e resposta inflamatória) têm sido descritos na literatura como bases de diversas doenças neurodegenerativas.

A fim de atestar a pureza das culturas obtidas realizamos a marcação imucitoquímica para proteínas características de neurônios (β -tubulina III e NeuN) e de microglia (CD11), não havendo marcação significativa para ambas. Assim como a proteína NeuN, a β -tubulina III é marcadora de neurônios diferenciados, ou seja, sua imunorreatividade é observada em neurônios pós mitóticos. Porém em contraste com a β -tubulina III que está presente nos processos neuronais, NeuN é encontrada apenas no corpo celular dos neurônios (Weyer & Shiling, 2003).

Portanto, com este trabalho conseguimos estabelecer um protocolo de cultura de astrócitos hipocâmpais de ratos Wistar de 90 e 180 dias, adequado para o estudo de patologias que tenham suas bases relacionadas à região hipocâmpal e ao envelhecimento cerebral, permitindo, futuramente, a realização de experimentos que testem tanto alvos preventivos como terapêuticos em situações neurodegenerativas *in vivo* e *in vitro*. Assim, o modelo de cultura descrito neste trabalho exhibe propriedades bioquímicas e fisiológicas de astrócitos e pode ser útil para a compreensão dos mecanismos relacionados ao cérebro adulto e envelhecido.

LEGENDAS DAS FIGURAS

Fig.1 Imunocitoquímica de astrócitos hipocampais de ratos Wistar neonatos. Os astrócitos hipocampais de animais neonatos apresentam morfologia poligonal e plana observadas por meio de microscopia de contraste de fase **(A)**. Astrócitos apresentam imunomarcção para GFAP **(B)**, vimentina **(C)**, GS **(D)**, GLT-1 **(E)** e GLAST **(F)**. Barra de escala de 50 μ m.

Fig.2 Imunocitoquímica de astrócitos hipocampais cultivados a partir de animais adultos e envelhecidos. Imunomarcção do citoesqueleto de actina **(A, B)** e de GFAP **(C, D)** em astrócitos hipocampais de animais adultos e envelhecidos com 7 DIV. Imunomarcção do citoesqueleto de actina **(E, F)** e de GFAP **(G, H)** em astrócitos hipocampais de animais adultos e envelhecidos na confluência. Barra de escala de 50 μ m.

Fig.3 Imunocitoquímica de astrócitos hipocampais de ratos Wistar de 90 dias. Os astrócitos hipocampais de animais adultos apresentam morfologia poligonal característica astrocitária e também a expressão de marcadores gliais clássicos. Microscopia de contraste de fase **(A)**. Intensa imunomarcção para GS **(B)**, GLT-1 **(C)**, GLAST **(D)** e vimentina **(E)**. Barra de escala de 50 μ m.

Fig.4 Imunocitoquímica de astrócitos hipocampais de ratos Wistar de 180 dias. Os astrócitos hipocampais de animais envelhecidos apresentam morfologia poligonal característica astrocitária e também a expressão de marcadores gliais clássicos. Microscopia de contraste de fase **(A)**. Intensa imunomarcção para GS **(B)**, GLT-1 **(C)**, GLAST **(D)** e vimentina **(E)**. Barra de escala de 50 μ m.

Fig.5 Destinos do glutamato em cultura de astrócitos hipocampais. Dois dos principais destinos do glutamato, após ser captado pelos astrócitos, foram avaliados. Atividade da GS **(A)** e conteúdo de GSH **(B)**. Os dados representam média \pm D.P. de 4 - 6 determinações experimentais realizadas em triplicata. * $P < 0,05$ indica diferença significativa em relação aos valores do controle.

Fig. 1

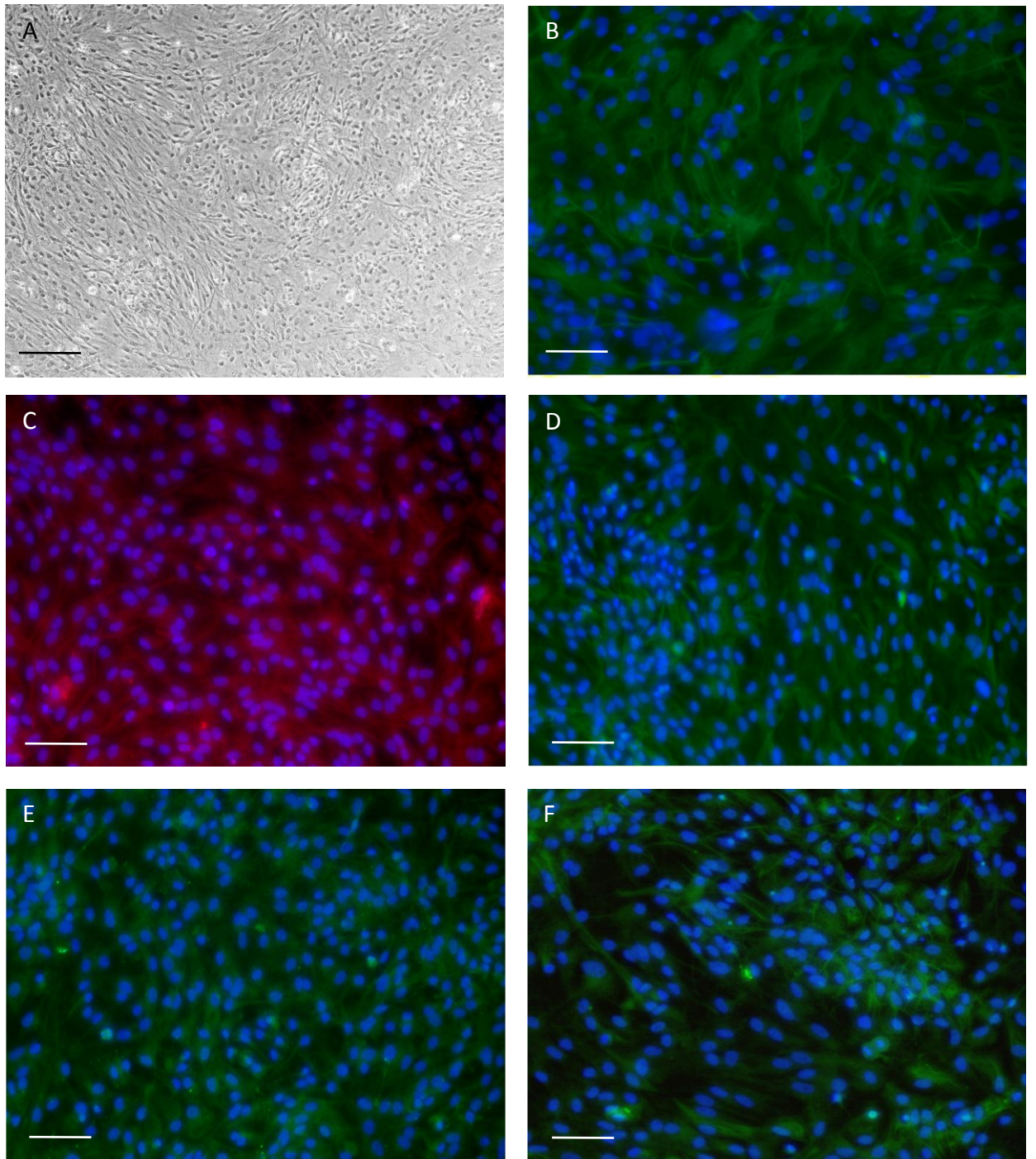


Fig. 2

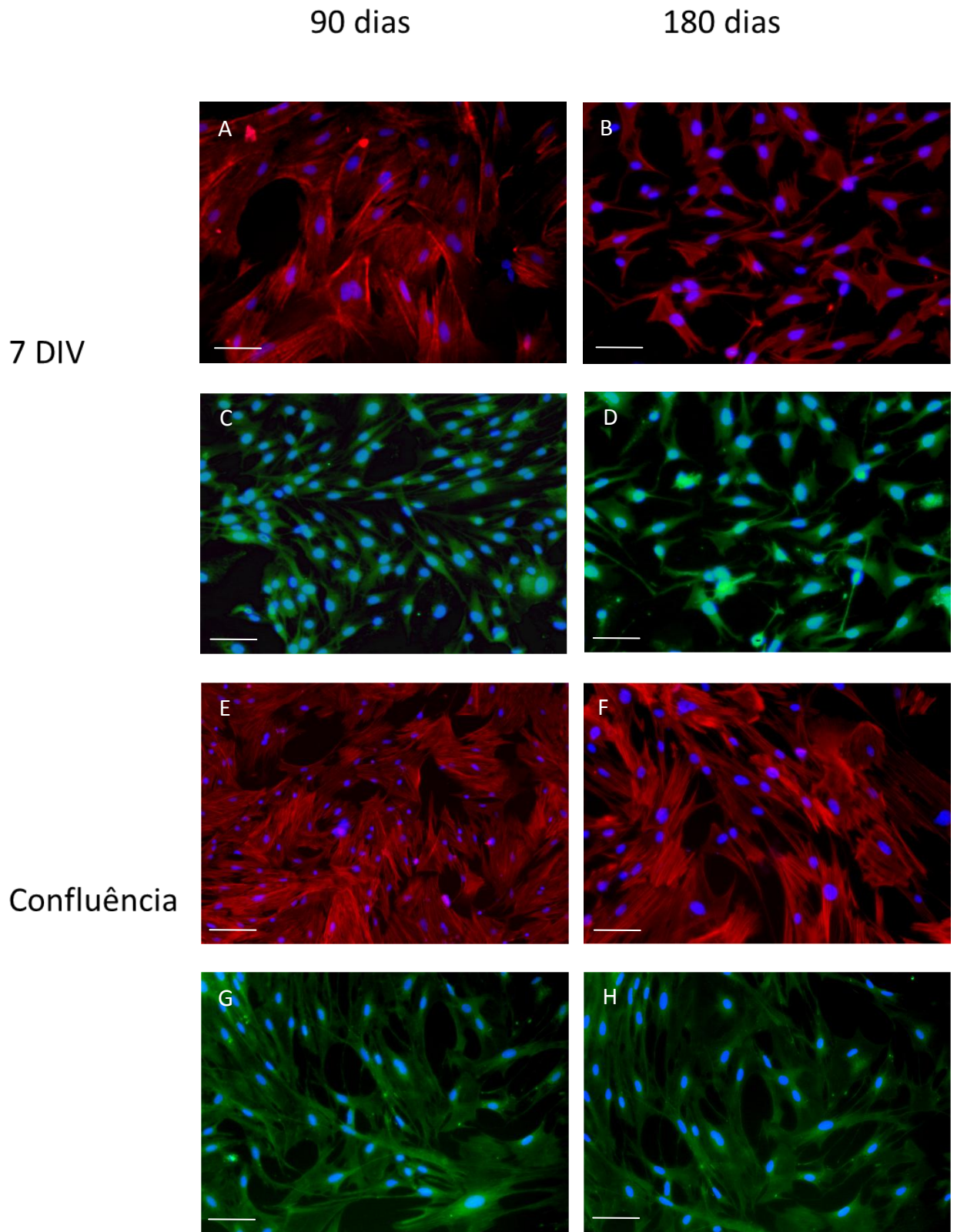


Fig. 3

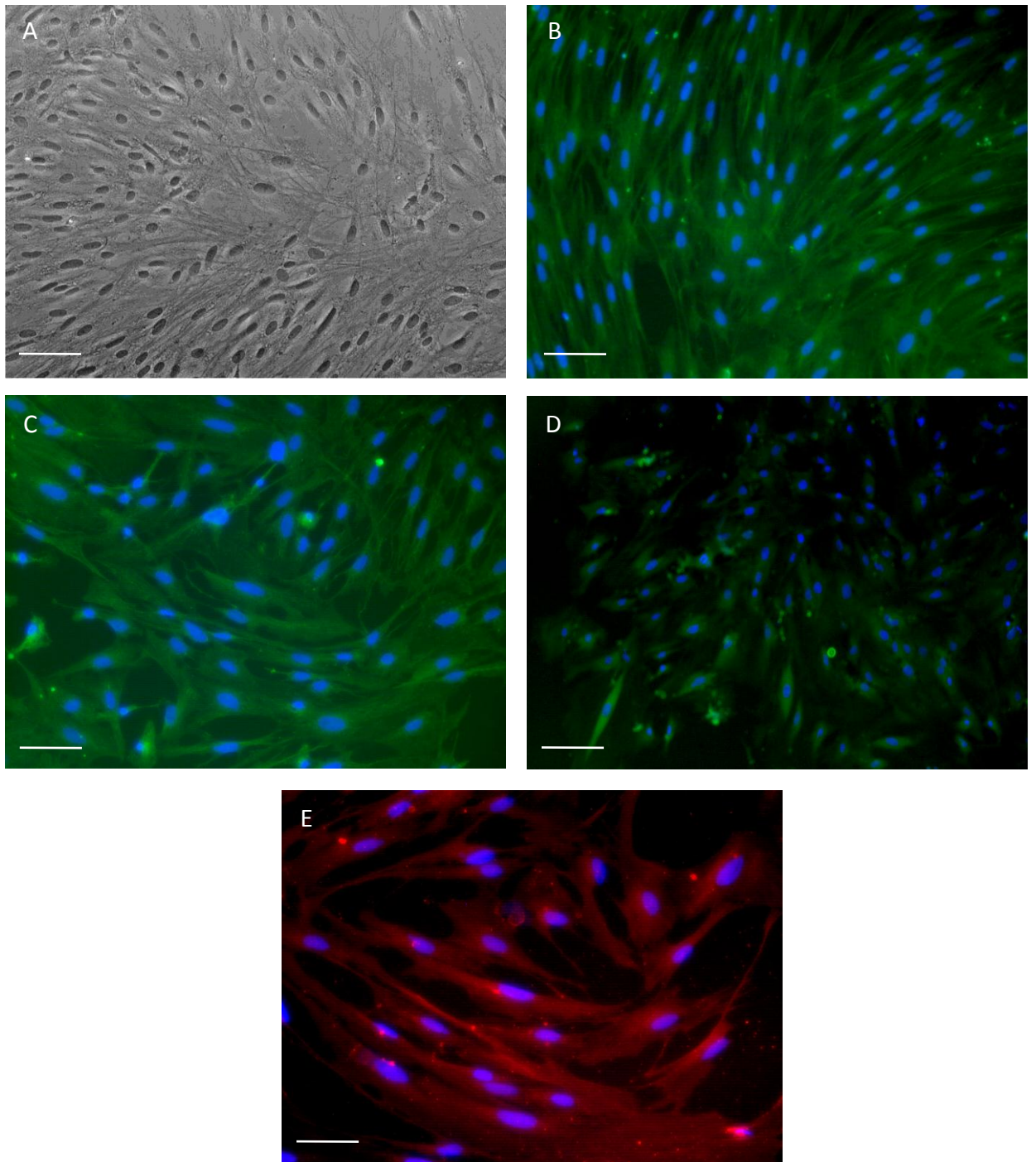


Fig. 4

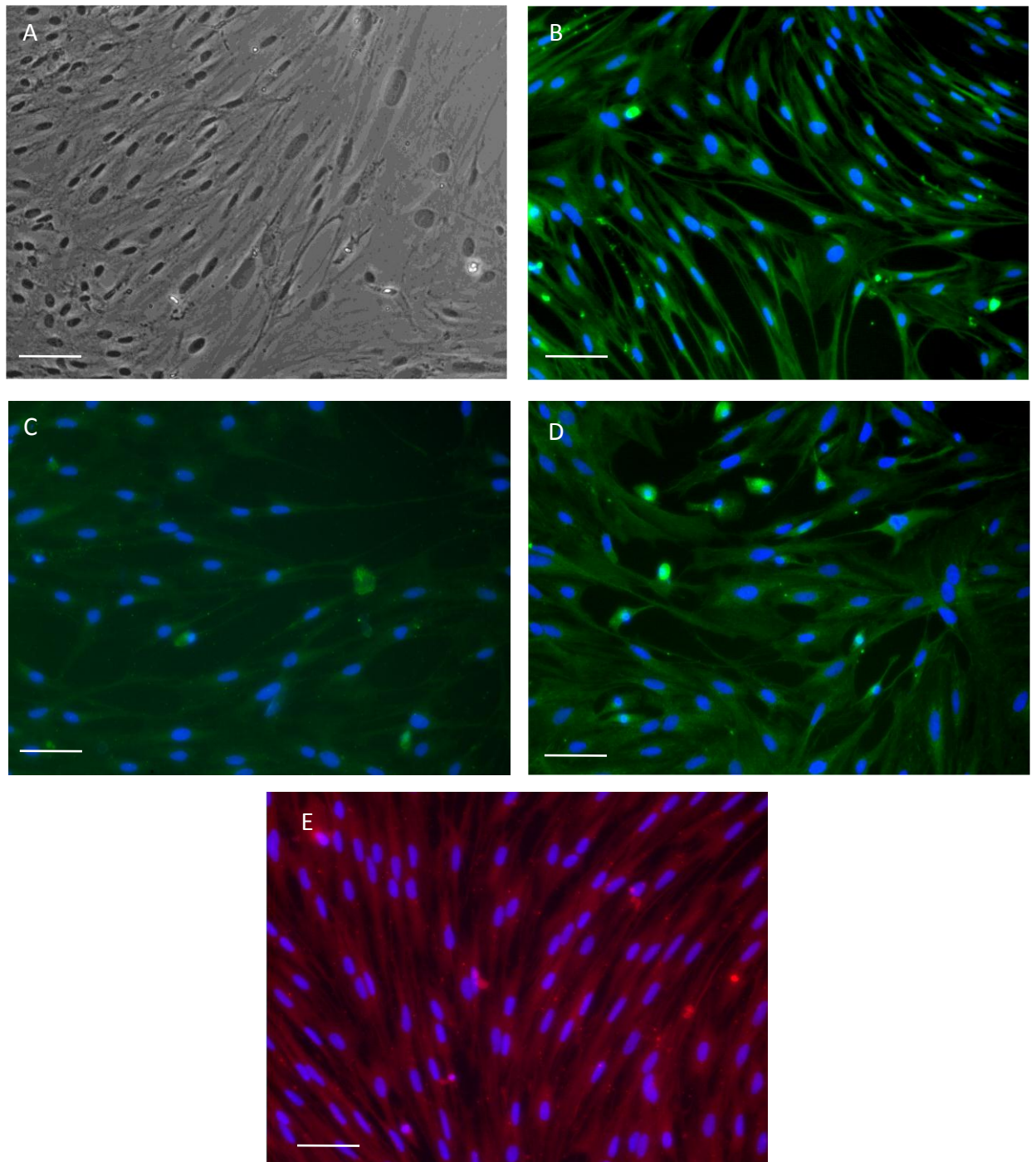
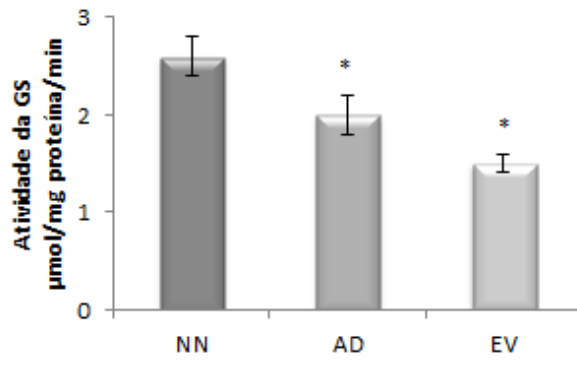
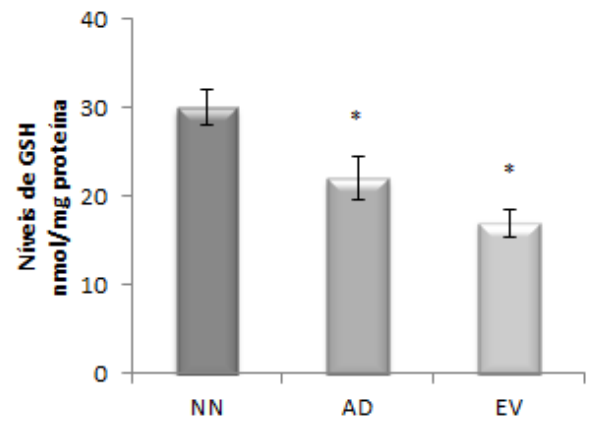


Fig. 5

A



B



Referências:

Anderson CM, Swanson, RA (2000) Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia* 32, 1–14.

Banerjee R, Vitvitsky V, Garg SK (2008) The undertow of sulfur metabolism on glutamatergic neurotransmission. *Trends Biochem Sci* 33(9): 413-419.

Bignami MD, Mansour H, Dahl D (1989) Glial hyaluronate-binding protein in Wallerian degeneration of dog spinal cord. *Glia*, 2, 391–395.

Bramanti V, Tomassoni D, Avitabile M, Amenta F, Avola R (2010) Biomarkers of glial cell proliferation and differentiation in culture. *Front Biosci (Schol Ed)*. Jan 1;2:558-70.

Brown AM, Ransom BR. (2007) Astrocyte glycogen and brain energy metabolism. *Glia* 55:1263–1271.

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.

Cauley K, Kukekov V, Young D (1997) Kainate/AMPA receptors expressed on human fetal astrocytes in long-term culture. *J. Neurosci. Res.* 47 (3): 311–21.

Ciesielski-Treska J, Mares V, Viklicky V, Gerstein LM, Dráber, P (1988) Immunocytochemistry and heterogeneity of rat brain vimentin. *Histochemistry* 88, 575-581.

Corkin S (1984) Lasting consequences of bilateral medial temporal lobectomy: Clinical course and experimental findings in H. M. *Seminars in Neurology*, 4, 249-259.

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.

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, Gutterer JM and Hirrlinger J (2000) Glutathione metabolism in brain: metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defence against reactive oxygen species. *Eur. J. Biochem.* 267, 4912–4916.

Eichenbaum H, Mathews P, & Cohen NJ (1989) Further studies of hippocampal representation during odor discrimination learning. *Behavioral Neuroscience*, 103,1207-1216.

Eng LF, Ghirnikar RS, Lee YL (2000) Glial Fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem Res.* 25: 1439-51.

Gallo V, Russell JT (1995) Excitatory amino acid receptors in glia: different subtypes for distinct functions. *J Neurosci Res* 42:1-8.

Gordon GR, Mulligan SJ, MacVicar BA (2007) Astrocyte control of the cerebrovasculature. *Glia* 55:1214–1221.

Halassa MM, Fellin T, Haydon PG (2007) The tripartite synapse: roles for gliotransmission - in health and disease. *Trends Mol Med* 13:54–63.

Halliwell B (1992) Oxygen radicals as key mediators in neurological disease: fact or fiction *Ann. Neurol.* 32, S10–S15.

Huang YH, Bergles DE (2004) Glutamate transporters bring competition to the synapse. *Curr. Opin. Neurobiol.* 14, 346–352.

Koehler RC, Roman RJ, Harder DR (2009) Astrocytes and the regulation of cerebral blood flow. *Trends Neurosci* 32:160–169.

Lee M, Cho T, Jantarotai N, Wang YT, McGeer E, McGeer PL (2000) Depletion of GSH in glial cells induces neurotoxicity: relevance to aging and degenerative neurological diseases. *FASEB J* 24(7): 2533-2545.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193(1):265-75.

Machado, A. *Neuroanatomia funcional*. 2 ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2000.

Maragakis NJ, Rothstein JD (2006) Mechanisms of Disease: astrocytes in neurodegenerative disease. *Nat Clin Pract Neurol* 2(12):679-89.

Menet V, Gimenez y Ribotta M, Chauvet N, Drian MJ, Lannoy J, Colucci-Guyon E, Pardridge W, Eisenberg J, Yang J (1985) Human blood brains barrier insulin receptor. *J. Neurochem.* 44: 1771 – 1778.

Pope SA, Milton R, Heales SJ (2008) Astrocytes protect against copper-catalysed loss of extracellular glutathione. *Neurochem Res.* 33 (7):1410-8.

Privat A (2001) Inactivation of the glial fibrillary acidic protein gene, but not that of vimentin, improves 72 neuronal survival and neurite growth by modifying adhesion molecule expression. *J Neurosci* 21(16): 6147-6158

Norenberg MD, Martinez-Hernandez A (1979) Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain. *Brain Res.* Feb 2;161(2):303-10.

Olton DS, Becker JT, & Handelman GE (1979) Hippocampus, space and memory. *Behavioral and Brain Sciences*, 2, 313-365.

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

Peters A, Palay SL, Webster HD (1991) *The fine structure of the nervous system*, Third edn. Oxford University Press, New York). *Neurochem.*, 44, pp. 1771–1778.

Raine, Cedric S. *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects.* 7ed. 2006.

Ramos AJ, Girardi E, Vanore G, Brusco A (2004) Astrocytic response in hippocampus and cerebral cortex in an experimental epilepsy model. *Neurochem Res.* Feb;29(2):371-7.

Rodnight R, Gonçalves CA, Wofchuk ST, Leal R (1997) Control of the phosphorylation of the astrocyte marker glial fibrillary acidic protein (GFAP) in the immature rat hippocampus by glutamate and calcium ions: possible key factor in astrocytic plasticity. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 30, 325-338.

Shao Y, McCarthy KD (1994) Plasticity of astrocytes. *Glia.* 11:147-55.

Sofroniew MV, Vinters HV (2010) Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* Jan;119(1):7-35.

Souza D.G, Bellaver B, Souza DO, Quincozes-santos A (2013) Characterization of Adult Rat Astrocyte Cultures. *PLOS ONE.*

Squire LR, Amaral DG, & Press GA (1990) Magnetic resonance measurements of hippocampal formation and mammillary nuclei distinguish medial temporal lobe and diencephalic amnesia. *Journal of Neuroscience*, 10, 3106-3117.

Sutherland RW, & Rudy JW (1989) Configural association theory: The role of the hippocampal formation in learning, memory and amnesia. *Psychobiology*, 17, 129-144.

Weyner A, Schilinhg R (2003) Developmental and cell type-specific expression of the neuronal marker NeuN in the murine cerebellum. *J Neurosci Res* 73, 400-9.

Wang DD, Bordey A. (2008) The astrocyte odyssey. *Prog Neurobiol* 86(4):342-67.

Zhang, Y W.M. Pardridge (2001) Rapid transferrin efflux from brain to blood across the blood–brain barrier. *J. Neurochem.*, 76, pp. 1597–1600.