

Introdução

- Os astrócitos são células altamente variáveis na sua morfologia e função, sendo cruciais para a manutenção da homeostase do sistema nervoso central.
- Estas células são responsáveis por captar glutamato, o principal neurotransmissor excitatório, e pela sua conversão em glutamina através da enzima glutamina sintetase (GS). Além disso, atuam na manutenção da homeostase redox e na resposta inflamatória.
- A disfunção mitocondrial é um evento comumente associado ao envelhecimento cerebral e a diversas desordens neurológicas.
- Nesse sentido, a azida é um clássico inibidor do complexo IV da cadeia respiratória sendo frequentemente utilizada na indução de estresse oxidativo/nitrosativo *in vitro*.
- Recentemente, nosso grupo demonstrou que a ativação do fator nuclear kappa B (NFκB) e da proteína cinase ativada por mitógeno p38 (p38 MAPK) parece estar envolvida nos efeitos deletérios do envelhecimento em astrócitos hipocampais.

Objetivo

Avaliar o impacto do envelhecimento cerebral associado ao dano mitocondrial induzido por azida em astrócitos hipocampais através da utilização de um protocolo de obtenção de cultura de astrócitos provenientes de ratos Wistar adultos (AD) e envelhecidos (EN) (90 e 180 dias, respectivamente).

Métodos



Meio de cultura utilizado: DMEM/F12 com 10% SFB nas duas primeiras semanas e com 20% SFB até a confluência.

As células foram cultivadas em incubadora umidificada a 37°C numa atmosfera contendo 5% CO₂.

Após a confluência, as culturas foram tratadas com 5 mM de azida durante 3 horas.

Experimentos realizados:

- ➔ Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$);
- ➔ Produção de espécies reativas de oxigênio (EROs);
- ➔ Níveis de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α);
- ➔ Níveis de interleucina-1 β (IL-1 β);
- ➔ Captação de glutamato;
- ➔ Atividade de glutamina sintetase (GS);
- ➔ Conteúdo de glutatona;
- ➔ Níveis de p65 NFκB;
- ➔ Níveis de p38 MAPK;

Resultados

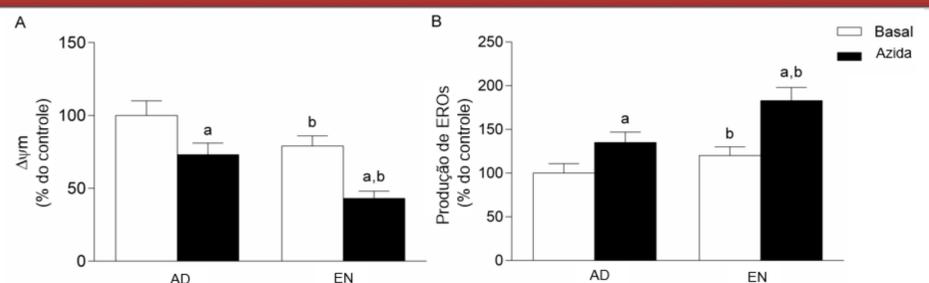


FIG. 1. Os efeitos oxidativos da azida foram mais deletérios em astrócitos hipocampais EN do que nos AD. As células foram incubadas em DMEM/F12 contendo 1% de SFB com 5 mM de azida durante 3 h. (A) $\Delta\Psi_m$ e (B) Produção de EROs. Os dados representam as médias + E.P.M. de quatro experimentos independentes realizados em triplicata. Diferenças entre os grupos foram analisadas estatisticamente usando ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Tukey. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos. **a** indica diferença em relação às condições basais. **b** diferenças em relação às culturas de AD.

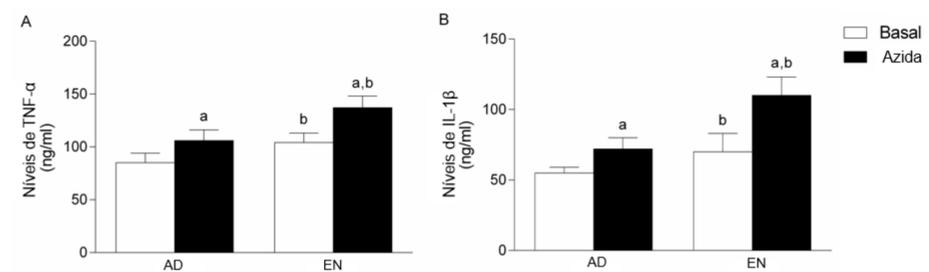


FIG. 2. Astrócitos hipocampais AD e EN aumentaram liberação de citocinas pró-inflamatórias após a exposição à azida. As células foram incubadas em DMEM/F12 contendo 1% de SFB com 5 mM de azida durante 3 h. (A) TNF- α e (B) IL-1 β . Os dados representam as médias + E.P.M. de quatro experimentos independentes realizados em triplicata. Diferenças entre os grupos foram analisadas estatisticamente usando ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Tukey. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos. **a** indica diferença em relação às condições basais. **b** diferenças em relação às culturas de AD.

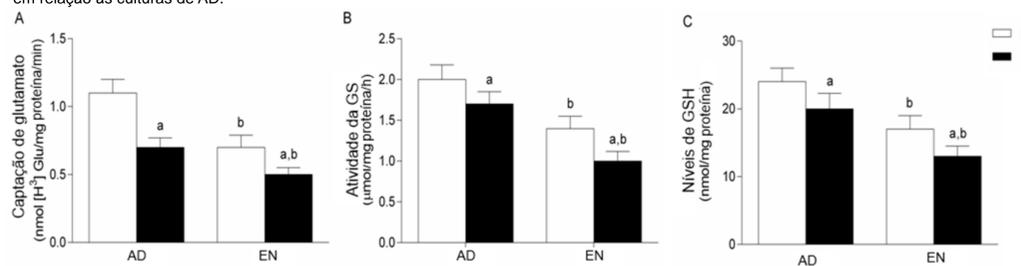


FIG. 3. A azida afetou o sistema glutamatérgico dos astrócitos de maneira idade-dependente. As células foram incubadas em DMEM/F12 contendo 1% de SFB com 5 mM de azida durante 3 h. (A) Captação de glutamato, (B) atividade da GS e (C) níveis de GSH. Os dados representam as médias + E.P.M. de quatro experimentos independentes realizados em triplicata. Diferenças entre os grupos foram analisadas estatisticamente usando ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Tukey. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos. **a** indica diferença em relação às condições basais. **b** diferenças em relação às culturas de AD.

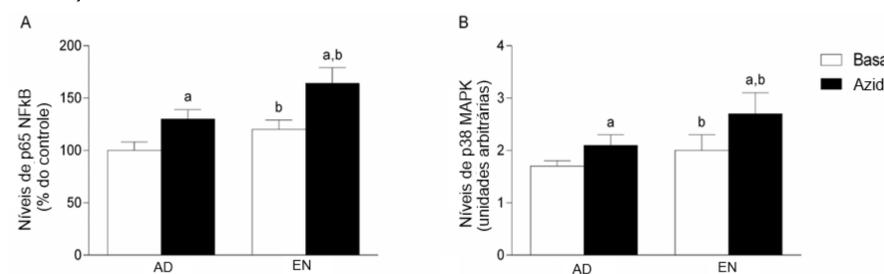


FIG. 4. As vias de sinalização NFκB e p38 MAPK estão envolvidas nos efeitos deletérios da azida dependentes da idade. As células foram incubadas em DMEM/F12 contendo 1% de SFB com 5 mM de azida durante 3 h. (A) NFκB e (B) p38 MAPK. Os dados representam as médias + E.P.M. de quatro experimentos independentes realizados em triplicata. Diferenças entre os grupos foram analisadas estatisticamente usando ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Tukey. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos. **a** indica diferença em relação às condições basais. **b** diferenças em relação às culturas de AD.

Conclusão

Nossos resultados demonstram que o envelhecimento cerebral acarreta maior suscetibilidade das células ao dano mitocondrial e evidencia a importância da cultura de astrócitos provenientes de animais maduros para estudos relacionados ao envelhecimento cerebral.