

# O papel do transporte de lactato astrócito-neurônio na excitotoxicidade glutamatérgica e os possíveis efeitos neuroprotetores da guanosina em fatias hipocampais

Silva, J.S.<sup>1</sup>, Kalinine, E.<sup>1</sup>, Mees, L.<sup>1</sup>, Pettenuzzo, L.F.<sup>1</sup>, Oses, J.P.<sup>2</sup>, Pellerin, L.<sup>3</sup>, de Assis, A.M.<sup>1</sup>, Souza, D.O.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Brasil

<sup>2</sup> Laboratório de Neurociências Clínicas, Centro de Ciências Da Vida E Da Saúde, Universidade Católica de Pelotas – UCPel, Brasil

<sup>3</sup> Departamento de Fisiologia, Universidade de Lausanne – UNIL, Suíça

## INTRODUÇÃO

A excitotoxicidade glutamatérgica (quando o glutamato está em excesso na fenda sináptica) está envolvido em vários processos patológicos no cérebro. Nesse contexto, os astrócitos desempenham um papel fundamental no sistema glutamatérgico capturando e metabolizando esse glutamato. Uma maneira que esses astrócitos podem usar o glutamato é através do ciclo de TCA para produzir ATP. Além disso, o glutamato em excesso na fenda sináptica aumenta a excitabilidade neuronal. Nessa situação, os astrócitos desempenham um papel central, fornecendo energia para o neurônio por meio do transporte de lactato astrócito-neurônio (ANLS) (Pellerin et al., 1994). No entanto, a literatura ainda não é clara sobre o envolvimento do ANLS na excitotoxicidade glutamatérgica. Além disso, pouco se sabe sobre os efeitos de drogas neuroprotetoras no ANLS.

## OBJETIVOS

Verificar o papel do ANLS em fatias hipocampais de camundongo incubadas com diferentes concentrações de glutamato (10µM, 100µM e 1000µM) avaliando o possível efeito neuroprotetor da guanosina.

## MÉTODOS

Para o processo de incubação utilizou-se hipocampus de camundongos CF1 adultos. Os animais foram sacrificados por decapitação. Após o sacrifício, o hipocampo foi retirado, pesado e fatiado em um aparelho Chopper (McIlwain) a 300 µm. Essas fatias foram pré-incubadas a 4°C e, posteriormente, lavadas com meio contendo fluido cerebrospinal artificial (aCSF) com glicose (5mM), após foi realizada a incubação das fatias com diferentes concentrações de glutamato no mesmo meio (10, 100 e 1000µM), porém sempre que utilizado algum substrato radioativo foi adicionado ao meio o mesmo substrato não radioativo, em dois tempos distintos (30 minutos e 2 horas) em banho metabólico com agitação constante a 37°C e aerado com uma mistura gasosa (95%CO<sub>2</sub>: 5%O<sub>2</sub>). Nesse modelo, realizamos em experimentos isolados a oxidação de diferentes substratos energéticos marcados radioativamente no carbono 14 (<sup>14</sup>C) a CO<sub>2</sub> (L-[U-<sup>14</sup>C] glutamato, D-[U-<sup>14</sup>C] glicose e L-[1-<sup>14</sup>C] lactato). Ainda, realizamos a dosagem da concentração de lactato no meio, a análise de viabilidade celular pela técnica de redução do sal de tetrazolium (MTT), dosagem da Enolase Neurônio Específica (NSE) no meio após o período de incubação e citometria de fluxo, onde observamos a marcação com Iodeto de Propídeo (PI) e a função mitocondrial através da marcação com Mitotracker.

## CONCLUSÕES PRELIMINARES

Observamos que o aumento da disponibilidade de glutamato no meio de incubação até a concentração de 1000 µM por até 2 horas promove aumento na oxidação desse substrato, sem grandes alterações no metabolismo da glicose e lactato. Não observamos alteração na viabilidade celular, NSE e na morte celular e função mitocondrial no tempo de 2 horas. Nesse contexto, acreditamos que o aumento da oxidação de glutamato é uma tentativa astrocitária de reduzir a concentração de glutamato extracelular, prevenindo a excitotoxicidade glutamatérgica. Com o intuito de compreender as interações astrócito-neurônio e o potencial neuroprotetor da guanosina, mais estudos são necessários.

## RESULTADOS

Nesse modelo de fatias hipocampais, observamos um aumento da oxidação de glutamato a <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> dependente da concentração de glutamato (10µM, 100µM e 1000µM) no tempo de 30 minutos de incubação (p=0,000; r=0.823) e em 2 horas de incubação (p=0,000; r=0.925). Quando incubamos as fatias hipocampais em diferentes concentrações de glutamato juntamente com o L-[1-<sup>14</sup>C] lactato, observamos que houve uma redução estatística da oxidação de lactato a <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> apenas no tempo de 2 horas de incubação e somente na concentração de 1000µM de glutamato (p=0,0130). Já quando incubamos as fatias hipocampais com diferentes concentrações de glutamato juntamente com D-[U-<sup>14</sup>C] glicose não observamos diferença estatística na oxidação deste substrato. Não observamos diferenças estatísticas na concentração de lactato no meio após a incubação com as fatias hipocampais por 30 min e 2h. Nesse sentido realizamos a análise de viabilidade celular, NSE, morte celular por Iodeto de Propídeo e função mitocondrial utilizando o Mitotracker, onde não encontramos nenhuma diferença estatística nas fatias hipocampais incubadas com diferentes concentrações de glutamato por 2 horas.

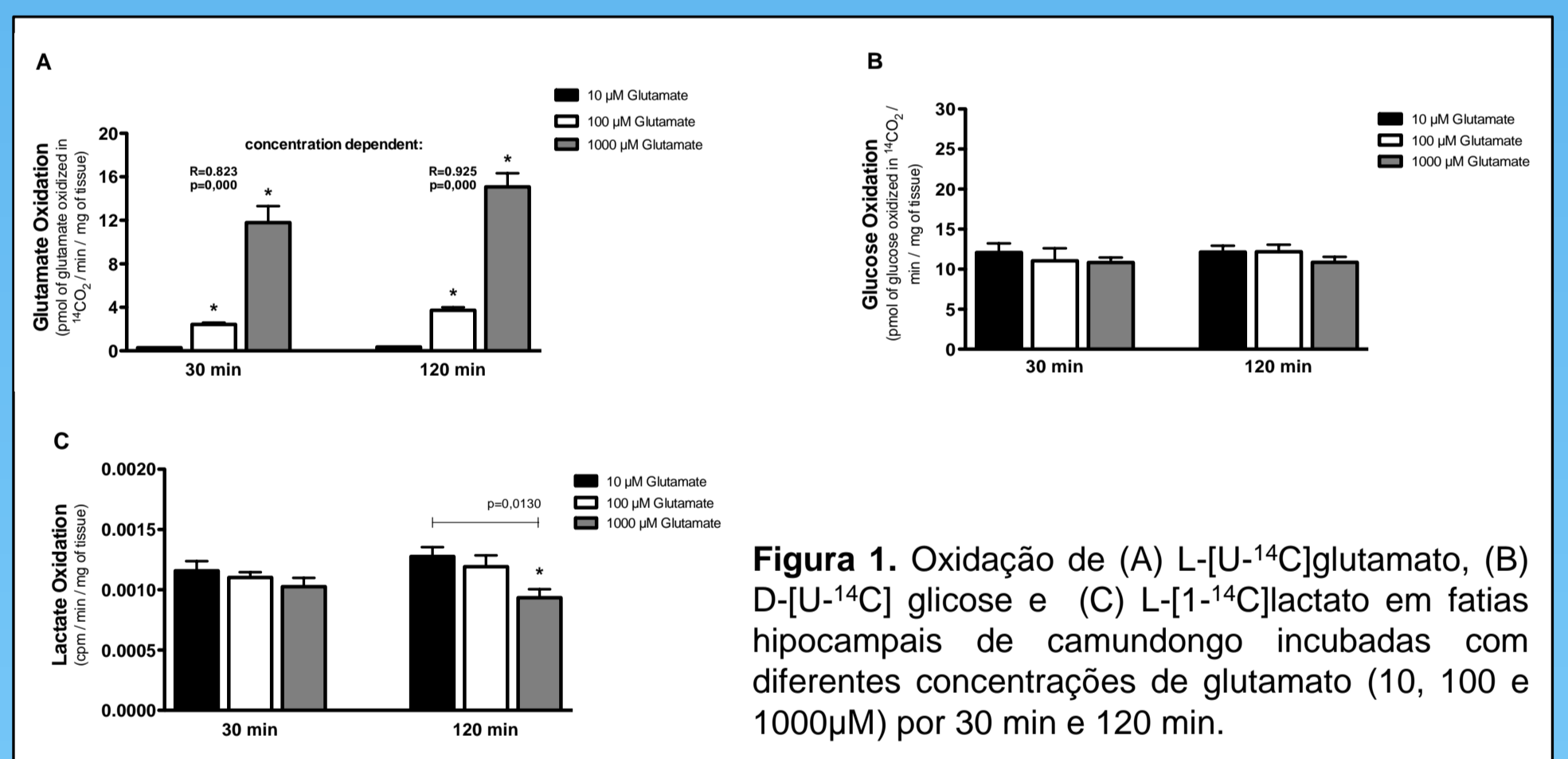


Figura 1. Oxidação de (A) L-[U-<sup>14</sup>C]glutamato, (B) D-[U-<sup>14</sup>C] glicose e (C) L-[1-<sup>14</sup>C]lactato em fatias hipocampais de camundongo incubadas com diferentes concentrações de glutamato (10, 100 e 1000µM) por 30 min e 120 min.

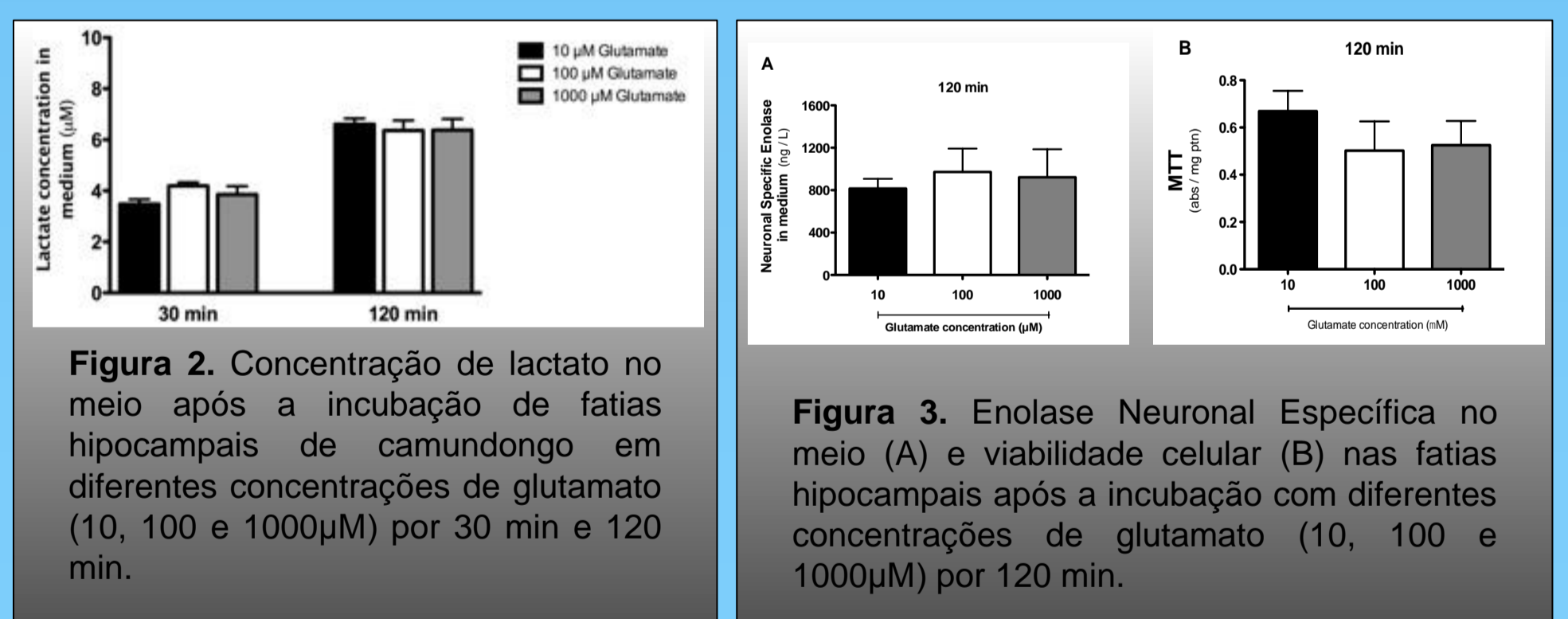


Figura 2. Concentração de lactato no meio após a incubação de fatias hipocampais de camundongo em diferentes concentrações de glutamato (10, 100 e 1000µM) por 30 min e 120 min.

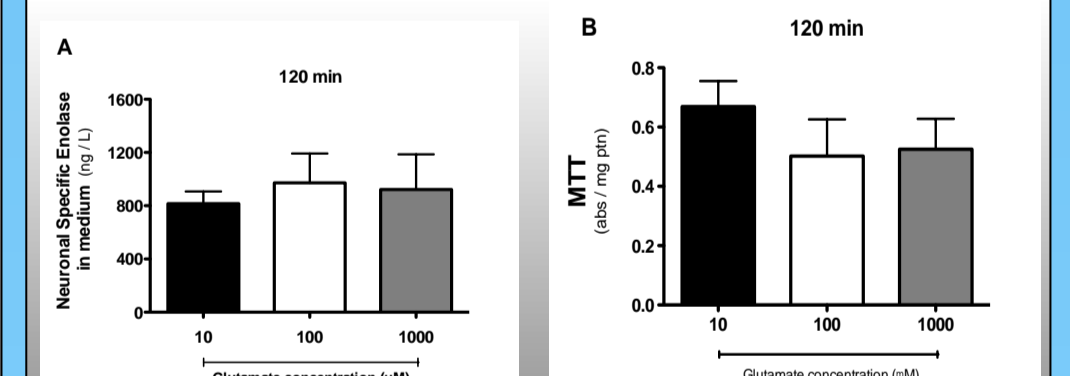


Figura 3. Enolase Neurônio Específica no meio (A) e viabilidade celular (B) nas fatias hipocampais após a incubação com diferentes concentrações de glutamato (10, 100 e 1000µM) por 120 min.

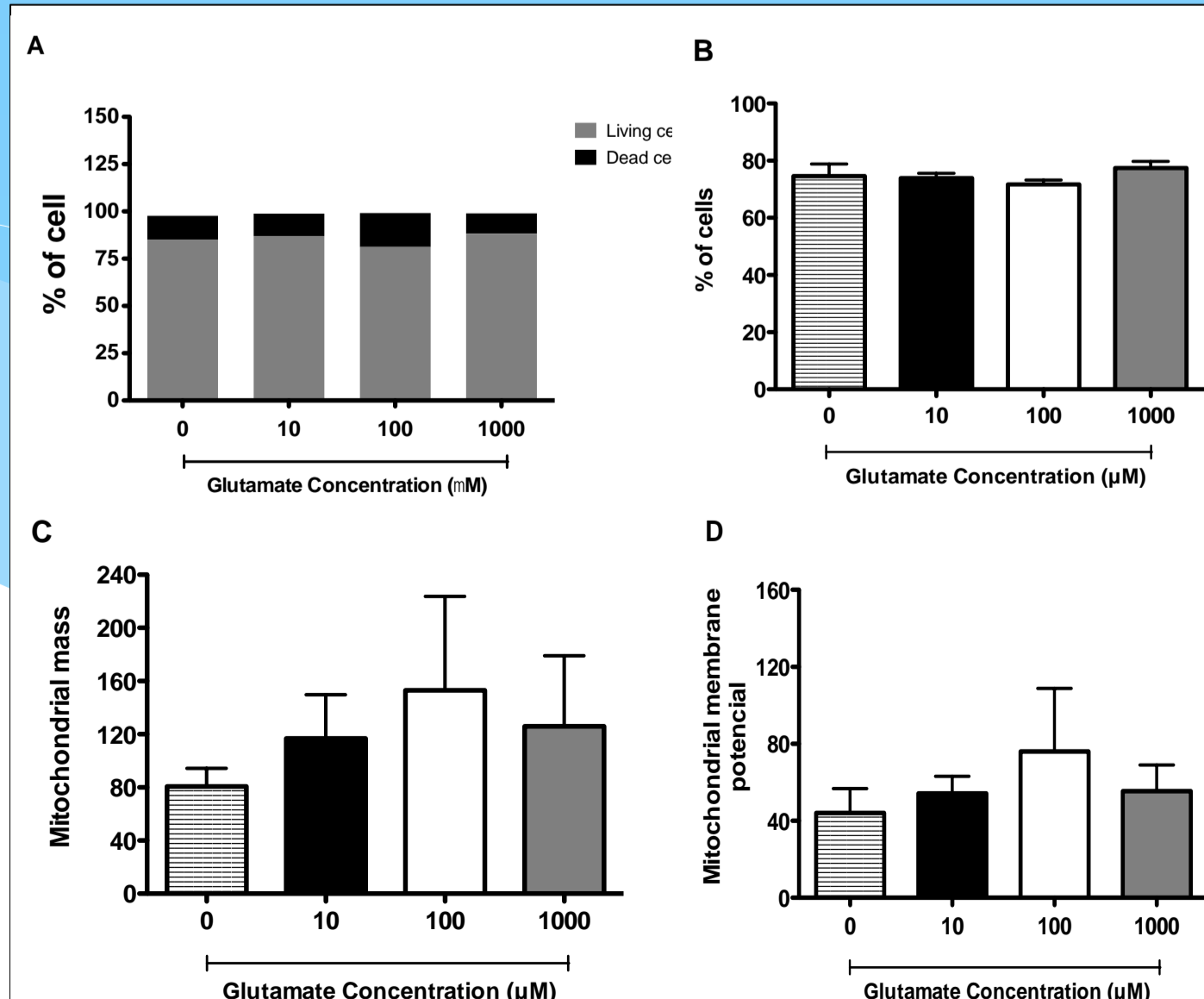
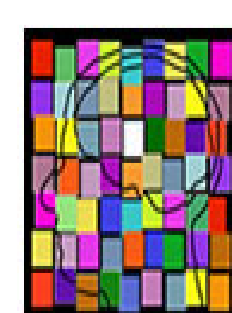


Figura 4. Número de células mortas e células vivas (A), número total de células (B), volume mitocondrial (C) e potencial de membrana mitocondrial (D) nas fatias hipocampais após a incubação com diferentes concentrações de glutamato (10, 100 e 1000µM) por 120 min.

Apoio financeiro:



Email:

jussemar.semara@gmail.com