



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PÓS GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA CELULAR

Adenosina modula os níveis extracelulares de glutamato  
induzido por hiperosmolaridade em cultura de astrócitos  
hipotalâmicos

DANIELLE VALENTE BRAGA

BELÉM

2016

DANIELLE VALENTE BRAGA

Adenosina modula os níveis extracelulares de glutamato  
induzido por hiperosmolaridade em cultura de astrócitos  
Hipotalâmicos.

Dissertação apresentado ao Programa de Pós Graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Neurociências e Biologia Celular – área de concentração em neurociências.

**Orientador: Prof. Dr. Anderson Manoel Herculano Oliveira da Silva – ICB UFPA**

**Co-orientador: Prof. Dr. Domingos Luiz Wanderley Picanço-Diniz**

BELÉM

2016

"Bom mesmo é ir à luta com determinação, abraçar a vida com paixão, perder com classe e vencer com ousadia, por que o mundo pertence a quem se atreve. E a vida é muito bela para ser insignificante. "

— Charles Chaplin

## Agradecimentos

À minha adorada mãe Regina, pelo esforço e dedicação de sempre, por ser meu exemplo de mulher batalhadora. Ao meu pai Izidro (*in memoriam*), por ter me ensinado o valor da educação.

Aos meus irmãos Zélia e Francisco, pela força e por sempre estarem disponíveis para me ouvir quando eu precisava.

Aos meus avós, que acreditaram em mim e me apoiaram desde minha graduação. Em especial ao meu avô Raimundo, pelas horas de conversas e conselhos sábios.

Aos meus tios maravilhosos, pela inspiração em me manter perseverante na busca do conhecimento.

Ao meu querido orientador, pelas ideias geniais, pela compreensão, pelos conselhos, pela oportunidade e principalmente pela confiança que depositou em mim.

À professora Karen, pelo carinho, pelo exemplo, e por estar sempre disponível para dar sua opinião em meu trabalho e me ajudar a responder minhas perguntas.

Ao professor Domingos, por ter sido meu primeiro mentor científico, e por ter aberto as portas do seu laboratório.

Ao professor Evander, por ter me influenciado a seguir a carreira científica desde a minha graduação.

Aos queridos colegas de laboratório, ao Alan por ter me ajudado com o HPLC, à Tarcyane pela amizade, à Suelen pelo incentivo, ao Lucas por ter

me ajudado com o Inglês, à Alódia pelo abraço (as lágrimas vieram no início desta escrita e ela me ofereceu um abraço, linda!).

Ao laboratório do HUIBB, do qual tenho a honra de fazer parte, pelo incentivo à qualificação que é dado não somente a mim, mas a todos seus funcionários.

Enfim, a todos que de alguma forma me ajudaram para que este trabalho tivesse um começo, meio e fim.

## RESUMO

Estudos recentes mostram que liberação de glutamato por células gliais hipotalâmicas é uma importante resposta fisiológica em situações de hiperosmolaridade. Além disso, estudos prévios apontam um marcante aumento dos níveis de adenosina no fluido intersticial renal após o aumento da ingestão de sódio. Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi caracterizar a possível relação entre a liberação de adenosina e a liberação de glutamato em culturas primárias de astrócitos expostas à situação de hiperosmolaridade. Culturas de astrócitos hipotalâmicos obtidos de ratos da linhagem Wistar nos dois primeiros dias de nascidos, foram expostas à solução hipertônica com sódio (340mOsm/L) nos tempos 3, 5, 10 e 15 minutos. Após o estímulo, o meio de incubação foi coletado e os níveis extracelulares de glutamato e adenosina foram determinados por Cromatografia Líquida de Alta Eficácia (CLAE). Afim de avaliar a relação entre estes compostos em situações hiperosmóticas, utilizou-se o tratamento das culturas com Adenosina, com R-PIA um agonista do receptor A1, bem como com glutamato e agonista do receptor tipo NMDA. Nossos resultados demonstraram elevação significativa dos níveis extracelulares de glutamato após o estímulo hiperosmótico com um pico em 5 minutos. Similarmente, observamos o aumento nos níveis de adenosina no meio de incubação após 10 e 15 minutos. O tratamento com glutamato induziu aumento nos níveis extracelulares de adenosina após 15 e 20 minutos em meio iso-osmótico. A exposição ao NMDA não induziu a liberação de adenosina e em nenhuma das concentrações utilizadas. Os pré-tratamentos com adenosina e o agonista A1 R-PIA impediram a liberação de glutamato induzida por hiperosmolaridade. Nossos resultados mostraram também que o efeito do estímulo na liberação de glutamato e adenosina é dependente de sódio, e apresenta uma resposta específica para astrócitos do hipotálamo que pode ser modulada através da ativação do receptor A1 de adenosina.

Palavras chaves: **hiperosmolaridade, liberação de glutamato, liberação de adenosina, astrócitos hipotalâmicos.**

## **Abstract**

Recent studies have shown that glutamate release by hypothalamic glial cells is an important physiological response to hyperosmolarity. Furthermore, previous studies point out an accentuated increase of the adenosine levels in renal interstitial fluid after the intake sodium increases. This study aims to evaluate the possible relationship between the adenosine and glutamate releases in primary cultures of astrocytes exposed to hyperosmolarity conditions. Hypothalamic astrocytes cultures of Wistar rats at the first two days after birth were exposed to hypertonic sodium solution (340mOsm/L) in different times (3, 5, 10 e 15 min). After this stimulus, the incubation medium was harvested and the extracellular levels of glutamate and adenosine were determined by High Performance Liquid Chromatography. In order to evaluate the relationship between these compounds in hyperosmotic conditions, we have used treatment of the cultures with adenosine, with R-PIA (an agonist of the A1 receptor), as well as with glutamate (an agonist of the NMDA receptor). Our results showed a significant increase of the extracellular levels of glutamate after the hyperosmotic stimulus with a peak at 5 min. Similarly, we have seen an increase of the adenosine levels in the incubation medium after 10 and 15 min. The treatment with glutamate induced an increase in extracellular levels of adenosine after 15 and 20 minutes in isosmotic medium. The exposure to the NMDA receptor did not induce the release of adenosine in none of the concentrations utilized. The pretreatment with adenosine and R-PIA A1 agonist blocked the release of glutamate induced by hyperosmolarity. Our results also showed that the effect of the stimulus on the release of glutamate and adenosine is sodium-dependent and presents a specific response for hypothalamic astrocytes, which can be modulated by the adenosine A1 receptor activation.

**Key-words:** hyperosmolarity, glutamate release, adenosine release, hypothalamic astrocytes.

## Índice de Figuras

Figura 1 Mecanismos Básicos de Osmorregulação .....	22
Figura 2 Complexo de Osmorreceptores Centrais .....	24
Figura 3 Representação esquemática das vias de síntese de glutamato em astrócitos e neurônios .....	29
Figura 4 Representação esquemática da regulação da síntese e metabolismo de adenosina nos meios intra e extracelular. ....	39
Figura 5 Esquema simplificado da ação da adenosina em seus receptores ....	41
Figura 6 Delimitação da região dissecada do cérebro de ratos recém-nascidos .....	44
Figura 7 Representação esquemática de um Sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	46
Figura 8 Níveis de glutamato extracelular após estímulo hiperosmótico em cultura de astrócitos hipotalâmicos. ....	55
Figura 9 Adenosina extracelular após estímulo hiperosmótico em cultura de astrócitos hipotalâmicos. ....	56
Figura 10 sobreposição dos níveis extracelulares de glutamato e adenosina. . ....	57
Figura 11: Adenosina extracelular após incubação com 10 µM de glutamato nos tempos 3, 5, 10, 15 e 20 minutos. ....	58
Figura 12: Níveis extracelulares de glutamato após estímulo hiperosmótico promovidos por sódio e manitol.....	59
Figura 13 Níveis extracelulares de adenosina após estímulo hiperosmótico com sódio e manitol. ....	60
Figura 14 Níveis de adenosina extracelular após estímulos hiperosmótico em 10 minutos de incubação com NMDA .....	61
Figura 15 níveis de glutamato extracelular após estímulo hiperosmótico por 10 e 15 minutos em astrócitos hipotalâmicos pré incubados com Dipiridamol.....	62
Figura 16 Níveis de glutamato extracelular em porcentagem do controle após cinco minutos de incubação com meio hiperosmótico (HIPER)340mOsm/L em	



cultura de astrócitos hipotalâmicos pré incubada com adenosina (Ado) a 0,1 $\mu$ M. ....	63
Figura 17 níveis de glutamato extracelular em porcentagem do controle após cinco minutos de estímulo hiperosmótico 340 mOsm/L (HIPER) em cultura de astrócitos hipotalâmicos pré – incubada com R-PIA. ....	64
Figura 18 Níveis de glutamato extracelular após estímulo hiperosmótico em astrócitos pré incubados com CPT por 3, 5 10 e 15 minutos. ....	65
Figura 19 níveis extracelulares de glutamato após 3, 5, 10 e 15 minutos de estímulo hiperosmótico em astrócitos corticais. ....	66
Figura 20 Níveis extracelulares de adenosina após 3, 5, 10 e 15 minutos de estímulo hiperosmótico em astrócitos corticais. ....	67

## LISTA DE ABREVIATURAS

AC- Adenilil Ciclase

ADP – Difosfato de Adenosina

AGRP - *Agouti-related protein*

AMP – Monofosfato de Adenosina

ATP – Adenosina Trifosfato

AVP – Arginina Vasopressina

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CMF- Meio Livre de Cálcio

CNT – Transportadores Concentrativos

DAG – Diacilglicerol

DMEM - Dulbecco Modified Eagle Medium

Ecto-PDE- Ectodifosfoidrolase

EHNA - Eritro-9-(2-hidroxi-3-inonil) adenosina

ENT – Transportadores Equilibrativos

FBS – Soro Bovino Fetal

GFAP – Proteína Glial Fibrilar Ácida

IP<sub>3</sub> – Inositol Trifosfato

MNCs – Neurônios Magnocelulares

MnPO – Núcleo Pré Óptico Mediano

NBMPR – Nitrobenziltioinosina

OCVs – Órgão Circunventriculares

OSF – Órgão Subfornicial

OT – Ocitocina

OVLT – Órgão Vasculoso da Lamina Terminal

PLC – Fosfolipase C

PVN – Núcleo Paraventricular

R-PIA - R-N6-(2-phenylisopropil)-adenosina

SAH – Adenosilomocisteína

SNC – Sistema Nervoso Central

SON – Núcleo Supra Óptico

## SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO .....	18
1.2 Resposta osmorregulatória frente à hiperosmolaridade .....	21
1.3 Astrócitos .....	25
1.4 Transmissão glutamatérgica no hipotálamo.....	26
1.4.1 Síntese de glutamato .....	28
1.4.2 Liberação e captação de glutamato.....	29
1.4.3 Liberação vesicular .....	30
1.4.4 Liberação e recaptção por transportadores e outros mecanismos .....	31
1.4.5 Receptores de glutamato (acrescentar a fisiologia).....	34
1.5 Adenosina.....	36
1.5.1 Mecanismos de Síntese, Liberação e Metabolismo de Adenosina.....	38
1.5.2 Transporte de Adenosina .....	40
1.5.3 Receptores e Sinalização adenosinérgica .....	40
2. OBJETIVOS .....	43
2.1 Objetivo geral .....	43
2.2 Objetivos específicos .....	43
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	44
3.1 Cultura de astrócitos hipotalâmicos.....	44
3.2 Estímulo hiperosmótico .....	45
3.3 Dosagem de glutamato através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	46
3.3.1 Reagentes e Soluções Analíticas .....	47
3.3.2 Condições cromatográficas .....	47
3.3.3 Preparo das Amostras .....	47
3.3.4 Derivatização.....	48
3.3.5 Curva de calibração .....	48
3.4 Dosagem de Adenosina pelo Método de CLAE .....	49
3.4.1 Reagentes e Soluções Analíticas .....	49
3.4.2 Condições cromatográficas .....	49
3.4.3 Preparo da solução padrão.....	50
3.4.4 Validação do método cromatográfico para quantificação de adenosina .	50
3.5 Análise Estatística .....	54
4. RESULTADOS .....	55

4.1 Níveis de glutamato extracelular após estímulo hiperosmótico .....	55
4.2 Níveis extracelulares de adenosina após estímulo hiperosmótico .....	56
4.3 Sobreposição dos níveis extracelulares de adenosina e glutamato após estímulo hiperosmótico.....	57
4.4 Efeito do glutamato na liberação de adenosina.....	58
4.5 Efeito da substituição do sódio por manitol promovendo a hiperosmolaridade nos níveis extracelulares de glutamato. ....	59
4.6 Efeito da substituição do sódio por manitol promovendo hiperosmolaridade nos níveis extracelulares de adenosina .....	60
4.7 Efeito do NMDA nos níveis extracelulares de adenosina após estímulo hiperosmótico.....	61
4.8 Efeito do Dipiridamol nos níveis extracelulares de glutamato após estímulo hiperosmótico.....	62
4.9 Efeito da adenosina nos níveis extracelulares de glutamato após estímulo hiperosmótico.....	63
4.10 Efeito do Agonista A1 R-PIA nos níveis extracelulares de glutamato após estímulo hiperosmótico.....	64
4.11 Efeito do CPT nos níveis extracelulares de glutamato após estímulo hiperosmótico.....	65
4.12 Níveis extracelulares de glutamato e adenosina após estímulo hiperosmótico em cultura de astrócitos corticais.....	66
5 DISCUSSÃO .....	68
6 Conclusões.....	75
7 REFERENCAIS .....	76
Anexo I .....	88

## 1 - INTRODUÇÃO

A maioria dos componentes dos fluidos corporais está em estado de fluxo constante e mantido em equilíbrio através do mecanismo de osmorregulação (JOHNSON; THUNHORST, 1997). A regulação precisa da osmolaridade dos fluidos corporais e conseqüentemente do volume celular é de fundamental importância para garantir a homeostasia do organismo (SIMARD; NEDERGAARD, 2004). Estudos mostram que mudanças no volume da célula, provocadas por alterações na osmolaridade do meio extracelular, podem levar à perda de inúmeras de suas funções (VERBALIS, 2007). Estas alterações têm particular importância quando se trata de células pertencentes ao sistema nervoso central (SNC), nas quais pequenas mudanças de volume alteram significativamente a relação espacial entre neurônios e outros tipos celulares, podendo afetar, por conseguinte, a transmissão sináptica (VERBALIS, 2010).

O sódio representa um importante constituinte do compartimento extracelular e, por permear a membrana celular muito lentamente, é considerado o principal soluto capaz de promover o aumento da osmolaridade plasmática (ANTUNES-RODRIGUES, PIKANÇO-DINIZ, *et al.*, 2005). A hiperosmolaridade normalmente ocorre como consequência da hipernatremia resultante da perda hipotônica de fluidos e/ou aumento da ingestão de sódio, não compensados pela ingestão suficiente de água (ANTUNES-RODRIGUES, PIKANÇO-DINIZ, *et al.*, 2005)

O principal componente do processo regulatório homeostático é o sistema neuroendócrino hipotálamo neuroipofisário formado por neurônios localizados nos núcleos supra óptico (SON) e paraventricular (PVN) hipotalâmico os quais, após eventos de hiperosmolaridade, produzem os hormônios arginina-vasopressina (AVP) e ocitocina (OT) secretados pela neuroipófise. Estudos em mamíferos, incluindo humanos, estabeleceram que a hiperosmolaridade do fluido extracelular estimula a sensação de sede (RAMSAY, 1989) que culmina na busca pela água e na liberação de AVP que promove a reabsorção de água pelas células renais (ANTUNES-RODRIGUES *et al.*, 2004). Além disso, a infusão de soluções hipertônicas de NaCl na artéria

carótida parece aumentar a natriurese mediada pela liberação de ocitona (OT) na corrente sanguínea (HUANG; LEE; SJOQUIST, 1995).

Há evidências de que o glutamato medeia a maior parte das atividades excitatórias no hipotálamo (BUSNARDO et al., 2012), contrariando o que se acreditava anteriormente que peptídeos neuro moduladores ou outros agentes de ação lenta seriam as principais substâncias neuroativas dessa região (PAL; TROMBLEY; HAVEN, 1993). Estudos sugerem que receptores glutamatérgicos podem estar envolvidos tanto com a liberação basal como na liberação osmoticamente ativada tanto de AVP como de OT (CURRÁS-COLLAZO; DAO, 1999). Assim, é de singular importância a descrição dos mecanismos regulatórios do transporte de glutamato no hipotálamo em situações homeostáticas ou alostáticas.

A adenosina é conhecida como um importante neuromodulador endógeno amplamente distribuído por todos os tecidos de mamíferos (REES; SCANLON; HAM, 2003; TOMÉ; SILVA; CUNHA, 2010), tendo papel crucial tanto em condições fisiológicas como patológicas (CUNHA, 2001). Dados da literatura mostram ainda, que a adenosina pode ser liberada para o espaço extracelular mediante diversos estímulos, entre eles, a ativação de receptores glutamatérgicos (LATINI; PEDATA, 2001). Ao mesmo tempo, estudos mostram um marcante aumento dos níveis de adenosina no fluido intersticial renal após o aumento da ingestão de sódio (SIRAGY; LINDEN, 1996) e, tanto a infusão intrarrenal com sistêmica de adenosina, promove um efeito natriurético em ratos (FRANSEN; KOOMANS, 1995). Estes resultados mostram claramente um envolvimento da adenosina na osmorregulação periférica. No entanto, pouco se sabe sobre a participação deste nucleosídeo na resposta fisiológica hipotalâmica em situações de hiperosmolaridade.

Os astrócitos desempenham um importante papel na homeostase cerebral. Evidências mostram que após o estímulo hiperosmótico estas células apresentam um aumento na expressão de proteína glial fibrilar ácida (GFAP) (LAFARGA, et al., 1992), proteína FOS (YUAN et al., 2010), canais de conexina 43, (JIANG et al., 2011), além de mudar sua forma e retrair os prolongamentos celulares que separam neurônio magnocelulares

hipotalâmicos (KUO; HARIRI; MICEVYCH, 2010). Estudos mostram ainda que durante o estímulo hiperosmótico, astrócitos hipotalâmicos promovem um aumento na síntese e na liberação de glutamato (CAO et al., 2008). Uma vez que astrócitos têm sido recentemente identificados como uma importante reserva para uma ampla variedade de gliotransmissores que modulam a atividade sináptica (MART et al., 2007), buscamos investigar se seu papel homeostático sob hiperosmolaridade é mediado pela liberação de adenosina.



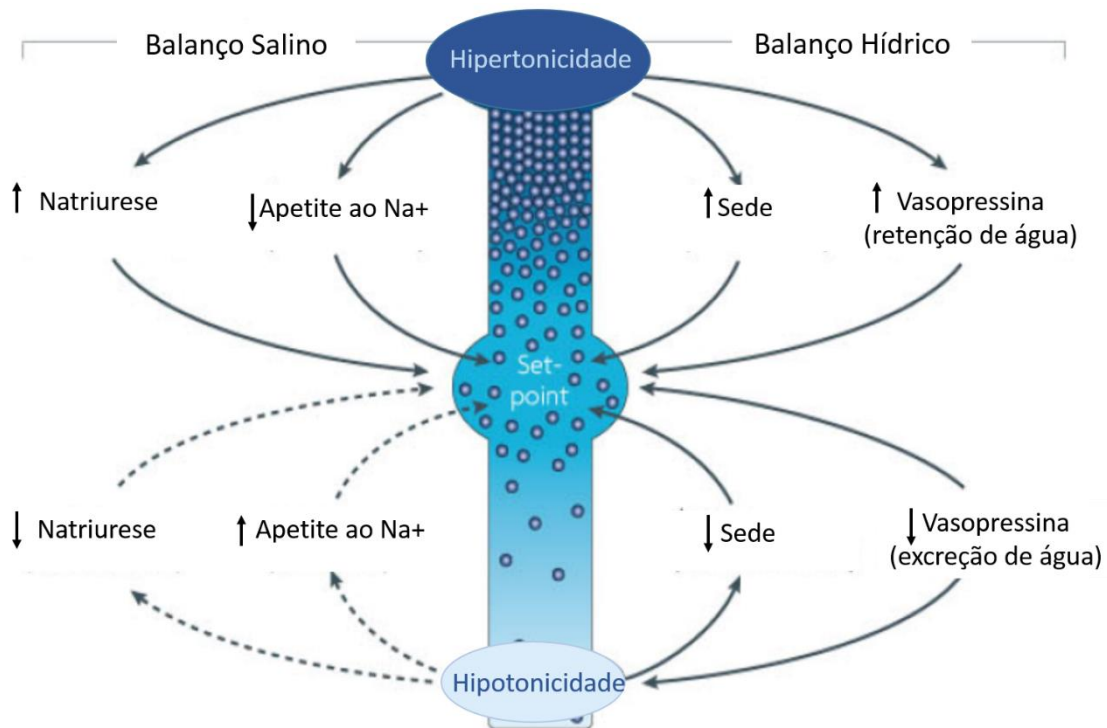
## 1.2 Resposta osmorregulatória frente à hiperosmolaridade

Ao longo da evolução os organismos desenvolveram refinadas respostas fisiológicas e comportamentais para se adaptar e sobreviver ao ambiente em que viviam. A resposta à osmolaridade do meio extracelular foi uma delas (VERBALIS, 2010). Embora os mamíferos mantenham a osmolaridade dos fluidos corporais em valores aproximadamente entre 280 e 300 mOsm/L, um indivíduo pode sofrer flutuações nesses valores dependendo da ingestão e ou da perda de água e sódio, através do suor e da diurese (VERBALIS, 2007). A perda de água após 40 minutos de exercícios físicos no calor, por exemplo, ou 24 horas de privação de água, faz com que haja um aumento da osmolaridade plasmática em 10 mOsm/L, o que é suficiente para desencadear uma resposta fisiológica (BOURQUE, 2008)

O comportamento de busca pela água estimulada pela sede é um eficiente mecanismo de correção da tonicidade dos fluidos corporais (figura1). Um pequeno aumento de 1 a 2% da osmolaridade plasmática gera respostas neuroendócrinas que culminam na busca pela água (MCCANN; GUTKOWSKA; ANTUNES-RODRIGUES, 2003). Os núcleos supra óptico (SON) e paraventricular (PVN) do hipotálamo possuem duas populações de células neuroendócrinas magnocelulares que sintetizam os peptídeos hormonais AVP e OT, os quais são transportados aos terminais axonais localizados na neuroipófise e liberados na corrente sanguínea em resposta ao estímulo hiperosmótico (HUSSY et al., 2000). A vasopressina tem principalmente uma função antidiurética (MORSETTE et al., 2012; STRICKER; HOFFMANN, 2007; VOISIN; BOURQUE, 2002), estimulando a reabsorção de água pelo rim. No entanto, adicionalmente tanto a AVP como a OT, vêm sendo reconhecidas por seu papel natriurético (BOURQUE, 2008; MCCANN; GUTKOWSKA; ANTUNES-RODRIGUES, 2003; MORSETTE et al., 2012)

Como dito anteriormente, o principal responsável pela osmolaridade extracelular é o sódio e os ânions que o acompanham, principalmente o cloreto e o bicarbonato (ANTUNES-RODRIGUES, PICANÇO-DINIZ, et al., 2005). Em 1937, Gilman mostrou que poderia induzir sede após a injeção de NaCl

hipertônico na artéria carótida de cães. Porém, não obteve o mesmo resultado quando utilizava soluções osmoticamente equivalentes de ureia a qual é capaz de atravessar livremente a membrana plasmática (MCCANN; GUTKOWSKA; ANTUNES-RODRIGUES, 2003). Esse achado sugeriu que a sensação de sede surge como uma consequência da “desidratação celular” que seria a diminuição de volume resultante do efluxo da água citoplasmática em virtude do aumento da osmolaridade externa (BOURQUE, 2008).



**Figura 1 Mecanismos Básicos de Osmorregulação**

Aumento da osmolaridade do fluido extracelular modula respostas homeostáticas que alteram o balanço salino (esquerda) e o balanço hídrico (direita) através do princípio de feedback negativo. Condições hipertônicas e hipotônicas levam a mudanças na ingestão e excreção de água e sódio para manter a osmolaridade do fluido extracelular próximo a 300mOsm/L. Modificado de (BOURQUE, 2008)

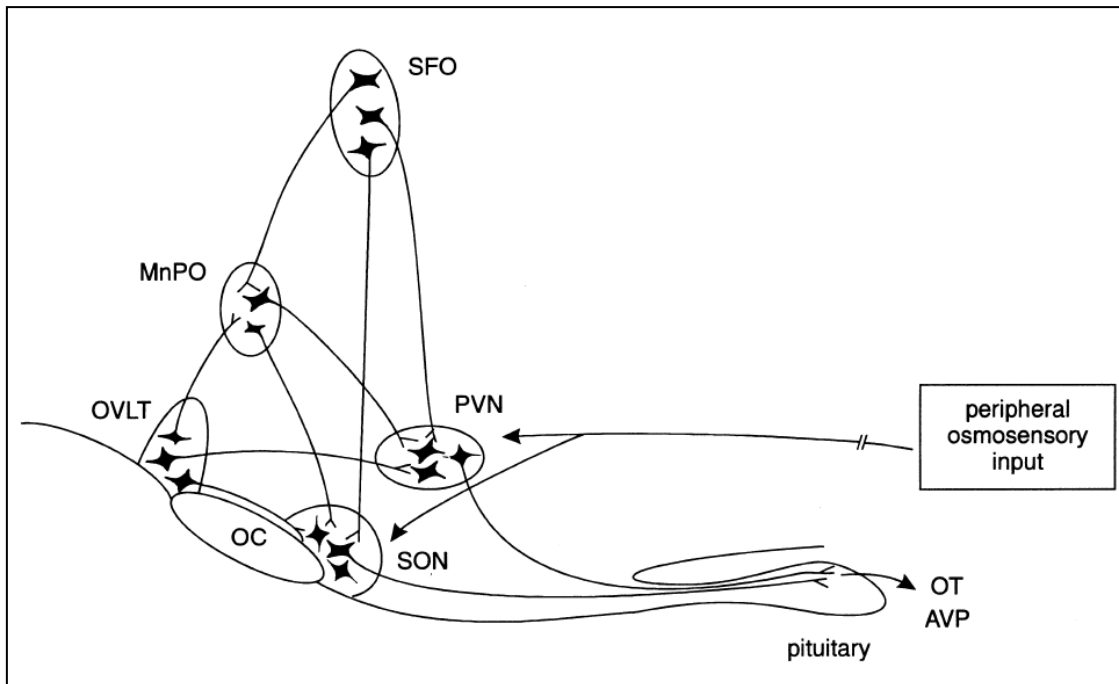
A modulação da atividade dos neurônios magnocelulares pelo estímulo osmótico resulta da integração de múltiplos *inputs* sensoriais que incluem osmorreceptores periféricos e centrais (figura 2) assim como a osmossensibilidade intrínseca do próprio neurônio (BOURQUE, 2008). Estudos pioneiros de Varney em 1937 apontam para a existência de um mecanismo sensorial capaz de detectar mudança na osmolaridade do fluido extracelular. Este mecanismo estaria representado por células as quais ele

chamou de “osmoreceptores”. Ao promover infusão de solução hiperosmótica nos vasos sanguíneos que irrigavam o hipotálamo anterior de cães, Varney mostrou um efeito antidiurético nesses animais (ANTUNES-RODRIGUES, PIKANÇO-DINIZ, *et al.*, 2005). A explicação mais parcimoniosa para estes resultados seria que neurônios magnocelulares hipotalâmicas que secretam vasopressina seriam por si só, as células osmorreceptoras, muito embora a localização destas células, não as caracterizasse como osmorreceptores e nem favorecesse uma resposta rápida a pequenas variações na osmolaridade plasmática (VERBALIS, 2010)

Um importante achado para a localização dos osmorreceptores foi proposto em 1977 quando pesquisadores mostraram que lesões na região ventral anterior ao terceiro ventrículo (AV3V) do cérebro provocava adipsia em ratos, embora, estes continuassem a produzir urina e se tornassem desidratados. Além disso, mesmo com a desidratação severa, os ratos não ingeriam água e os níveis de vasopressina eram mantidos nos valores normais (RAMSAY, 1989). Estudos posteriores sugeriram que uma região rica em capilares fenestrados, fora da barreira hemato-encefálica, os Órgãos Circunventriculares (OCVs), formados pelo Órgão Vasculoso da Lâmina Terminal (OVLT), Órgão Subfornicial (OSF) e o Núcleo Pré-Óptico Mediano (MnPO), seriam os principais sítios de osmorreceptores centrais (ANTUNES-RODRIGUES *et al.*, 2004). Em experimentos no qual essa região do encéfalo foi destruída em ratos, constatou-se tanto a diminuição da secreção de vasopressina como a inibição da sensação de sede em resposta ao aumento da osmolaridade (JOHNSON; THUNHORST, 1997).

Em humanos, indivíduos com danos cerebrais na região do OVLT, são incapazes de manter a osmolaridade do plasma mesmo em condições basais (VERBALIS, 2010). A participação do OVLT e da área que envolve o hipotálamo anterior na resposta à hiperosmolaridade também tem sido estudada utilizando técnicas imunistoquímicas que detectam rapidamente a intensa produção de proteína cFos sugerindo que essa área é fortemente ativada após desidratação (MCKINLEY *et al.*, 2008). Além disso, estudos eletrofisiológicos mostraram que a taxa de disparo de potenciais de ação em

grupos de neurônios do OVLT varia em função positiva com a hiperosmolaridade (BOURQUE, 2008).



**Figura 2 Complexo de Osmorreceptores Centrais**

Os neurônios magnocelulares no SON e PVN projetam seus axônios até o lobo posterior da hipófise, a qual libera OT e AVP na circulação sanguínea. Eles recebem sinais de neurônios osmossensíveis centrais localizados no OVLT, SFO e MnPO. Neurônios do OVLT e SFO também projetam para MnPO. Adaptado de (HUSSY et al., 2000)

A hiperosmolaridade aguda, induzida após injeção intraperitoneal de NaCl hipertônico induz a imediata redução de volume do encéfalo. Estudos mostram que ratos submetidos entre 15 e 20 minutos de hipernatremia aguda apresentam uma redução do volume do cérebro proporcional ao aumento da osmolaridade plasmática, geralmente estabilizando após 15 a 30 minutos da injeção de NaCl (LIEN; SHAPIRO; CHAN, 1990). Segundo Verbalis, 2010 esta complexa natureza tempo-dependente do processo de adaptação do cérebro envolve um rápido acúmulo de íons inorgânicos e um lento acúmulo de osmólitos orgânicos como, por exemplo, o glutamato em um processo chamado aumento regulatório de volume em neurônios (VERBALIS, 2010). No entanto, os mecanismos envolvendo o processo de adaptação do cérebro a situações hiperosmóticas e o papel de outros tipos celulares tais como astrócitos, ainda não está completamente elucidado

### 1.3 Astrócitos

O conceito de neuroglia foi introduzido em 1856 por Rudolf Virchow para dar nome ao material conectivo que dava suporte aos neurônios. Analisando tecidos humanos *post mortem*, o patologista notou a presença de uma substância conectiva no tecido nervoso do encéfalo e na medula no qual estavam inseridos os elementos que formavam o sistema nervoso. Essa substância foi inicialmente nomeada *nervenkitt*, que significa “cimento de nervo”, que foi mais tarde traduzido como neuroglia (KETTENMANN; VERKHRATSKY, 2008). A palavra glia, expressão grega para cola, foi usada para designar células que ligavam neurônios e a função de suporte foi, naquela época, a única atribuída a estas células. Esta ideia persistiu por todo século XX, e só começou a mudar nas últimas duas décadas, com a descoberta de mecanismos excitáveis envolvendo o aumento das concentrações intracelulares de cálcio iônico, os quais mostram que, na verdade, estas células assumem um papel mais ativo do que Virchow imaginava (AGULHON et al., 2008). Já o termo astrócito, foi introduzido em 1893, por Michael von Lenhossek para designar a célula glial com morfologia estrelada, (revisado em MATYASH; KETTENMANN, 2010). Antes disso, não havia diferenciação entre astrócitos, células microgliais e oligodendrócitos, que constituem a família de células gliais.

Atualmente os astrócitos não são mais vistos apenas como meros suportes estruturais para o neurônio. Pesquisas recentes reconhecem estas células como elementos ativos na comunicação celular a qual está intimamente envolvida no controle de inúmeras funções do cérebro. Uma de suas principais funções é a regulação dos níveis extracelulares de neurotransmissores, como o GABA e o glutamato (SCHOUSBOE; WAAGEPETERSEN, 2005). Além de expressar uma gama de receptores que reconhecem neurotransmissores que modulam suas funções, podem eles mesmos liberar uma variedade de moléculas sinalizadoras que transmitem mensagens através da rede de conexões gliais (HAMILTON; ATTWELL, 2010). Diversos estudos têm

identificado ainda, as diferentes vias pelas quais os astrócitos podem liberar glutamato, entre as quais: exocitose  $\text{Ca}^{+2}$  dependente, transporte reverso, antipoter cistina-glutamato, receptor  $\text{P2X}_7$ , canais de ânions e Conexina/Panexinas, (para revisão ver MALARKEY, 2009; PARPURA; GRUBIŠIĆ; VERKHRATSKY, 2011).

#### **1.4 Transmissão glutamatérgica no hipotálamo**

No final da década de 1950, Curtis e colaboradores mostraram pela primeira vez o efeito excitatório do ácido glutâmico sobre o cérebro de mamíferos, quando observaram que a injeção de glutamato de sódio no córtex motor de caninos e primatas tinha um efeito convulsivante (WATKINS; JANE, 2006). Entretanto, foi somente em meados da década de 1970 que o glutamato foi amplamente reconhecido como o principal neurotransmissor excitatório do SNC, onde estudos eletrofisiológicos farmacológicos e bioquímicos estabeleceram os mecanismos de ação deste aminoácido na transmissão sináptica (WATKINS; JANE, 2006).

Desde então, o glutamato tornou-se um dos neurotransmissores mais estudados, e os mecanismos de muitos de seus efeitos celulares e moleculares já foram elucidados. No sistema nervoso central (SNC), particularmente, atua como o principal neurotransmissor excitatório, sendo o mediador químico de cerca de 80 a 90% das sinapses excitatórias cerebrais (McKenna, 2007). Estudos posteriores descreveram algumas mudanças nas propriedades eletroquímicas e estruturais em canais iônicos de uma célula neural, quando modificavam a interação da molécula do glutamato com o sítio de ligação do receptor levando a indícios de diferentes tipos de receptores de glutamato no SNC presentes tanto em neurônios como em células gliais (KEW; KEMP, 2005).

Dentre os motivos pelos quais o glutamato e seus receptores têm sido alvo de muitos estudos está sua importante participação em processos fisiológicos, destacando-se dentre eles, o seu papel na transdução de sinais

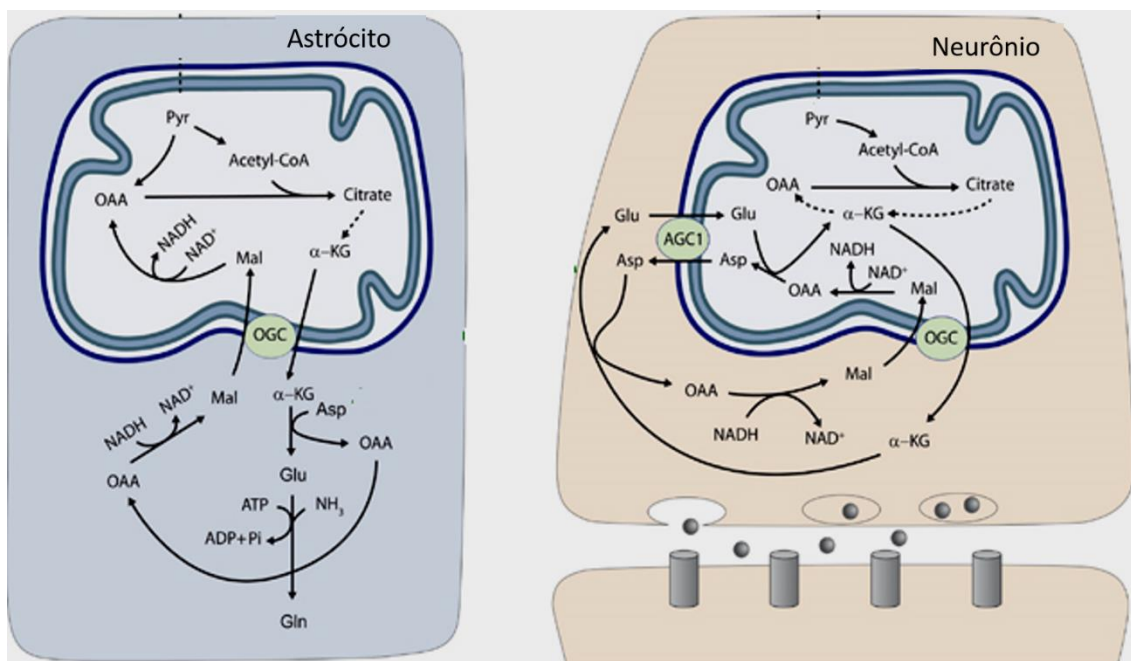
em células do SNC. No entanto, pouco se sabe sobre as propriedades fundamentais da transmissão glutamatérgica em células pertencentes ao sistema neuroendócrino. Estudos recentes evidenciam que a liberação fisiológica de vasopressina requer sinapses glutamatérgicas, com propriedades que maximizam a atividade de células magnocelulares (MNCs) do núcleo supra óptico (SON) exibindo aí diversos mecanismos complexos de plasticidade sináptica que envolvem o aumento dos níveis intracelulares de  $Ca^{2+}$  (PAL; TROMBLEY; HAVEN, 1993). Além disso, esta liberação parece estar envolvida com a retirada de prolongamentos astrócitários que separam neurônios magnocelulares durante a desidratação, aparentemente para subregular a transmissão sináptica basal em direção aos MNCs (IREMONGER; BENEDIKTSSON; BAINS, 2010). Há evidências que mostram que o transmissor excitatório primário liberado pelos neurônios no hipotálamo é o glutamato, contrariando o que se acreditava anteriormente que essas células utilizariam peptídeos – neuromoduladores ou outros agentes de ação lenta como principais substâncias neuroativas (PAL; TROMBLEY; HAVEN, 1993). Dados ainda mais recentes mostram que o glutamato está envolvido na regulação do apetite, uma vez que, a injeção intra-hipotalâmica em ratos, tanto de glutamato como de cainato, AMPA ou NMDA estimularam rapidamente uma intensa busca por alimento (DELGADO, 2013).

Normalmente, quando há excesso de glutamato extracelular, as células gliais atuam no sentido de diminuir a excitabilidade e excitotoxicidade produzida pelo glutamato liberado pelo neurônio. Frequentemente, isso se dá através da captação do glutamato extracelular por estas células gliais. Entretanto, outras vias que inibem a liberação de glutamato por astrócitos podem estar envolvidas neste mecanismo. Um dado interessante da literatura mostra que após cinco minutos de estímulo hiperosmótico há um aumento da síntese de glutamato por astrócitos no hipotálamo que retornam aos níveis basais após quinze minutos de estímulo (CAO et al., 2008), sugerindo um mecanismo protetor que envolve a regulação dos níveis deste neurotransmissor em astrócitos, durante eventos fisiológicos de hiperosmolaridade que precisa ser abordado mais profundamente.

### 1.4.1 Síntese de glutamato

Uma das vias de síntese do glutamato (figura 3) se dá a partir de um intermediário oriundo do ciclo de Krebs, o  $\alpha$ -cetoglutarato. Um grupamento amino oriundo de outros aminoácidos é adicionado ao  $\alpha$ -cetoglutarato através de enzimas transaminases dando origem ao glutamato (SCHOUSBOE; WAAGEPETERSEN, 2005). Esta reação pode ser reversível já que a desaminação do glutamato, por enzimas específicas, leva à formação do  $\alpha$ -cetoglutarato (VAN DEN HEUVEL et al., 2004). O oxaloacetato, outro intermediário do ciclo de Krebs, também pode receber um grupamento amino por ação de uma enzima, a aspartato aminotransferase, originando outro aminoácido excitatório, o aspartato (PAGEAU et al., 2006). O glutamato também pode ser sintetizado através do ciclo glutamato/glutamina que ocorre em astrócitos. Este ciclo é considerado um mecanismo de reciclagem de glutamato, por meio do qual este aminoácido sofre um processo de desaminação, pela ação da enzima glutamina sintetase formando assim a glutamina (BRUSILOW et al., 2010). Em neurônios, o glutamato é estocado em vesículas de maneira independente de sódio, sua incorporação é possível devido a um potencial interno de membrana que é gerado por uma  $H^+$ -ATPase vacuolar, a qual medeia o transporte de prótons para o interior de uma vesícula ( para revisão, MASSON et al., 1999). Acrescentar como o glutamato entra na





**Figura 3** Representação esquemática das vias de síntese de glutamato em astrócitos e neurônios

Tanto no astrócito quanto no neurônio, o glutamato pode ser sintetizado a partir do  $\alpha$ -cetoglutarato ( $\alpha$ -CG), proveniente do ciclo de Krebs. A desidrogenase do ácido glutâmico (GDH) é a enzima responsável por catalisar esta reação. No astrócito, o glutamato pode seguir quatro destinos diferentes: voltar para o ciclo de Krebs como  $\alpha$ -cetoglutarato, reação catalisada pela própria GDH, ou pela aspartato aminotransferase (AAT); ser utilizado para a síntese de glutatona; ser substrato para a síntese da glutamina pela glutamina sintetase (GS); ou ser metabolizado para a formação de  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$ . O astrócito pode, ainda, liberar glutamina, e esta, uma vez captada pelo neurônio, gerar novas moléculas de glutamato pela reação catalizada pela enzima glutaminase ativada por fosfato (PAG). Adaptado de (PARDO et al., 2011)

### 1.4.2 Liberação e captação de glutamato

A liberação de glutamato pode ocorrer tanto por células neuronais quanto por células gliais (CURRIE; KELLY, 1981), através de mecanismos dependentes ou independentes de  $\text{Ca}^{2+}$  ou  $\text{Na}^+$ , que ocorrem tanto na liberação vesicular como por heterotrocadores (COHEN-KASHI-MALINA; COOPER; TEICHBERG, 2012)

### 1.4.3 Liberação vesicular

A liberação vesicular de glutamato requer uma sinalização rápida, geralmente o aumento da concentração de íons cálcio no citosol, que pode ser repetido em alta frequência e também inibido ou potencializado com o tempo (NI; PARPURA, 2009). Resumidamente, o ciclo compreende várias etapas que se iniciam quando as vesículas preenchidas com neurotransmissor ficam pré-ancoradas na zona ativa, região especializada da membrana pré-sináptica (LIGUZ-LECZNAR; SKANGIEL-KRAMSKA, 2007). O processo de ancoramento na membrana é realizado por um complexo proteico chamado SNARE (*Soluble Nethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*), que consiste na interação entre a proteína vesicular sinaptobrevina/VAMP (v-SNARE) e duas proteínas de membrana, SNAP-25 (*synaptosome associated protein, 25 KD*) e sintaxina (que, juntas formam o tSNARE) (LIGUZ-LECZNAR; SKANGIEL-KRAMSKA, 2007; MOTHET et al., 2005).

A fusão das vesículas à membrana pré-sináptica ocorre após um aumento intracelular de íons cálcio, provocado pela abertura de canais dependentes de voltagem, o que leva à liberação do conteúdo vesicular de neurotransmissor na fenda sináptica. A proteína sinaptotagmina é considerada como a provável proteína sensível a cálcio. O complexo SNARE pode ser desfeito pela atividade de uma ATPase denominada NSF (*Nethylmaleimide-sensitive factor*) que mantém um equilíbrio dinâmico entre as vesículas prontamente liberáveis e as pré-ancoradas à membrana (GODA, 1997; LONART & SÜDHOF, 2000). Após a exocitose as vesículas são rapidamente internalizadas por endocitose e recicladas, podendo ou não ser fusionadas em um endossoma para serem regeneradas, novamente preenchidas por neurotransmissor e repetir o ciclo (JAHN et al., 2003). Este sistema multiprotéico também pode sofrer modulação por outras vias enzimáticas que o tornam plástico de acordo com o estímulo. As mudanças sofridas podem levar à modificação da quantidade de neurotransmissor liberado e a consequente mudança de sensibilidade da região pós-sináptica. A fosforilação das proteínas envolvidas na exocitose forma a base da plasticidade pré-sináptica facilitando a neurotransmissão. Já foi demonstrado que as proteínas do complexo SNARE

podem ser fosforiladas por diferentes proteínas quinases como a Proteína Quinase dependente de  $\text{Ca}^{2+}$  /Calmodulina tipo II (CaMKII), Caseína Quinase, Proteína Quinase dependente de  $\text{Ca}^{2+}$  /Fosfolípido (PKC) e Proteína Quinase dependente de AMP cíclico (PKA) (LIN & SCHELLER, 2000).

#### **1.4.4 Liberação e recaptação por transportadores e outros mecanismos**

A maior parte do glutamato que chega ao espaço extracelular é de origem citoplasmática, ou seja, não vesicular. Essa liberação ocorre por mecanismos independentes do influxo de íons  $\text{Ca}^{2+}$ , observados na presença de bloqueadores de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  dependentes de voltagem, na presença de tetrodotoxina que bloqueia canais de sódio e toxina botulínica tetânica, a qual danifica proteínas essenciais para a exocitose (ROSSETTO et al., 2001). Outros mecanismos para a liberação de glutamato no SNC incluem heterotrocadores como D-aspartato, L-aspartato e L-cisteato e transportadores de cistina (sistema  $\text{Xc}^-$ ) (COHEN-KASHI-MALINA; COOPER; TEICHBERG, 2012) além da liberação por transporte reverso, que ocorre em situações de despolarização (GONZÁLEZ; KAZANIETZ; ROBINSON, 2002).

A liberação de glutamato para o espaço extracelular também pode ser realizada por células gliais. Já foi demonstrado que astrócitos liberam diversos neurotransmissores, incluindo o glutamato, por diferentes vias entre as quais: exocitose  $\text{Ca}^{+2}$  dependente, transporte reverso, antiporter cistina-glutamato, receptor  $\text{P2X}_7$ , canais de ânions e Conexina/Panexinas (para revisão, MALARKEY, 2009).

A sinalização por glutamato, assim como por qualquer outro neurotransmissor, deve poder ser interrompida quando necessário, e sua concentração na fenda sináptica e no espaço extracelular deve ser muito bem regulada, pois em excesso pode levar a uma superexcitação celular causando o fenômeno de excitotoxicidade (CAUDLE; ZHANG, 2009). Como não há evidências de metabolismo de aminoácidos excitatórios como o glutamato e o aspartato fora da célula, esses neurotransmissores devem ser retirados de todo

o fluido extracelular através de um mecanismo de captação promovido por transportadores presentes tanto em neurônios como nas células da glia sendo o astrócito, no entanto, o principal responsável pelo processo de retirada do glutamato do meio extracelular (SCHOUSBOE; WAAGEPETERSEN, 2005).

Até o momento, cinco transportadores de glutamato de alta afinidade (assim chamados por possuírem um Km na faixa de poucos micromolares) foram clonados, alguns neuronais, outros gliais distribuídos por todo o SNC. São eles: Transportadores de Aminoácidos Excitatórios tipo 1 (EAAT1), análogo em humano ao Transportador de Glutamato/Aspartato (GLAST) de roedor, EAAT2 (KANE et al., 1999), análogo ao Transportador de Glutamato tipo 1 (GLT-1) de camundongo, EAAT3 análogo ao Carreador de Aminoácidos excitatórios em ratos (EAAC1), EAAT4 e EAAT5 (JIANG; AMARA, 2011). Todas essas proteínas promovem o transporte tanto de L como o de D-glutamato, assim como também de L- e D-aspartato dependentes de íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  (DANBOLT, 2001)

Os EAATs estão distribuídos com maior densidade em áreas de liberação do glutamato. O EAAT1/GLAST e EAAT2/GLT-1 são encontrados em células gliais associadas a sinapses, em número, os principais transportadores responsáveis pela captação de glutamato no SNC (SIMARD; NEDERGAARD, 2004) Estudos mostraram que culturas puras de astrócitos expressam basicamente GLAST, sendo a expressão de GLT-1 bastante reduzida (ANDERSON; SWANSON, 2000), embora astrócitos cultivados na presença de neurônios expressem tanto GLAST quanto GLT-1 (DUAN et al., 1999).

O processo de captação de aminoácidos excitatórios é guiado pelo gradiente eletroquímico através da membrana celular. O processo é eletrogênico e ocorre com a ligação do neurotransmissor ao transportador que o conduzirá para o interior da célula através de um processo dirigido pelo gradiente eletroquímico, com a entrada de íons  $\text{Na}^+$  e de um próton, e a saída de um  $\text{K}^+$  (DANBOLT, 2001). A cada molécula de glutamato captada, uma molécula de ATP é usada, o que classifica o transporte como ativo secundário, pois necessita do gradiente de  $\text{Na}^+$  gerado pela  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$ . A

estequiometria é diferente para cada tipo de transportador, o EAAT1 necessita de três íons  $\text{Na}^+$ , os EAAT2 e 3 de três íons  $\text{Na}^+$  e um  $\text{H}^+$  e os EAAT4 e 5 de dois íons  $\text{Na}^+$  para o interior da célula, daí serem caracterizados como transportadores de glutamato dependentes de sódio (DANBOLT, 2001)

Todos os transportadores de glutamato são sensíveis à temperatura e possuem caráter reversível, podendo atuar tanto na captação quanto na liberação de glutamato (SHIGERI; SEAL; SHIMAMOTO, 2004). Outra característica importante é a capacidade que alguns transportadores como os EAATs 4 e 5 têm de gerar um influxo de íons  $\text{Cl}^-$ , sendo tal influxo termodinamicamente independente do transporte e vice-versa (DEHNES et al., 1998).

O transporte de glutamato pode ser inibido por diversos agentes farmacológicos, como por agonistas de receptores KA, que bloqueiam especificamente EAAT2/GLT-1 (NANAO et al., 2005), L-trans-pirrolidina-2,4-dicarboxilato (trans-PDC), que inibe competitivamente todos os transportadores (MAKI; ROBINSON; DICHTER, 1994); threo-3-hidroxi-aspartato (THA), que inibe também competitivamente todos os EAATs, com exceção do EAAT5 (ANDERSON; SWANSON, 2000) e o DL-threo- $\beta$ -benzoxiaspartato (TBOA), que é um inibidor não competitivo dos EAATs (SHIMAMOTO et al., 1998)

Outra forma de transporte glutamatérgico se dá através de heterotrocadores independentes de sódio, a exemplo do sistema  $\text{Xc}^-$  que medeia a troca de cistina por glutamato na membrana plasmática de forma dependente de  $\text{Cl}^-$  (BRIDGES; NATALE; PATEL, 2012). Muitos pesquisadores assumem que este processo exerça um papel passivo, quase insignificante, na regulação do glutamato extracelular, pois parece que nesse sistema não há energia disponível significativa, no entanto, alguns estudos sugerem que tal suposição não seja verdadeira. De fato segundo Oliveira e colaboradores, (OLIVEIRA et al., 2010), em retina, cerca de 50% do transporte de glutamato é mediado pelo sistema independente de sódio.

### 1.4.5 Receptores de glutamato

Os receptores de glutamato são classificados em duas grandes famílias: ionotrópicos e metabotrópicos (RIEDEL; PLATT; MICHEAU, 2003). Os receptores ionotrópicos são canais de íons que precisam de um ligante para serem ativados. Eles se dividem em duas categorias, NMDA e não-NMDA. Os receptores metabotrópicos, por sua vez, são receptores acoplados a uma proteína G (HOLLMANNE HEINEMANN, 1994; SCHOEPFER et al., 1994; BORGES e DINGLEDINE, 1998; NAKANISHI et al., 1998; OZAWA et al., 1998; DINGLEDINE et al., 1999).

Os receptores ionotrópicos são formados por múltiplas subunidades funcionais, sendo de forma geral, tetrâmeros. Possuem três domínios transmembrana e um domínio que se insere na membrana, mas não a atravessa completamente, voltando então ao citoplasma. A organização diferenciada das subunidades pode produzir canais diferentes com funções variadas. A presença ou ausência de aminoácidos específicos carregados no interior do poro do receptor pode modular a sua permeabilidade ao  $\text{Ca}^{2+}$  e ao  $\text{Na}^{+}$ , que estão em maior concentração no meio extracelular, e os aminoácidos variam de acordo com as subunidades encontradas em cada caso (WOLLMUTH, 1996). A ativação desse receptor depende da ligação do agonista, que promoverá uma mudança conformacional da molécula, permitindo que o canal se abra e ocorra um fluxo iônico.

Existem duas famílias de receptores ionotrópicos de glutamato, que foram nomeadas de acordo com os seus agonistas farmacológicos seletivos. Uma delas é ativada pelo análogo do glutamato, o N-metil-D-aspartato (NMDA) e compreende as subunidades NR1, NR2(A-D) e NR3(A-B), formando tetrâmeros. Esta família é chamada de receptores NMDA. Porém, duas subunidades podem formar receptores homoméricos, como por exemplo, as subunidades NR1, que formam um receptor funcional com características clássicas de NMDA, e as subunidades NR2 que formam um receptor sem funcionalidade (MORIYOSHI et al., 1991; NAKANISHI, 1992; HOLLMANN e HEINEMANN, 1994; BRANDSTÄTTER et al., 1998). Os

receptores NMDA são ativados lentamente (10-50 milissegundos) e geram ações duradouras, precisando de um tempo maior ainda para se desativar. Sua ativação ocorre a partir da ligação de alta afinidade de um agonista, que pode ser o glutamato, o aspartato ou o NMDA, e de um co-agonista, glicina ou D-serina, gerando um influxo de  $\text{Ca}^{2+}$ , preferencialmente, e de  $\text{Na}^+$  (WOLOSKER et al., 1999; JOHNSON e ASCHER, 1987; MacDERMOTT et al., 1986). Durante o repouso, o poro do receptor NMDA encontra-se bloqueado pelo íon  $\text{Mg}^{2+}$ . É preciso que haja uma prévia despolarização, causada pela ativação de receptores não-NMDA para deslocar o  $\text{Mg}^{2+}$  do interior do poro, visto que esse bloqueio é voltagem-dependente, para que então o receptor NMDA possa ser completamente ativado.

A outra família é ativada pelo ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico (AMPA) e pelo cainato. Dependendo da sua preferência por AMPA ou por cainato esses receptores podem ser subdivididos entre receptores AMPA (GluR1-4) e receptores kainato (GluR5-8, KA1 e KA2), porém essa ativação não é completamente seletiva, visto que o AMPA pode ativar alguns receptores cainato e vice-versa (KEINÄNEN et al., 1990; PATNEAU and MAYER, 1990; HERB et al., 1992).

Os receptores AMPA e KA estão amplamente distribuídos no SNC e realizam a transmissão sináptica excitatória rápida. São receptores de baixa afinidade, permeáveis principalmente ao  $\text{Na}^+$  ou  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$ , abrindo seus poros prontamente frente à exposição de glutamato, embora sejam rapidamente dessensibilizados (TANG et al., 1989; TRUSSEL, 1993; PATNEAU e MAYER, 1990). Os receptores AMPA se recuperam mais rapidamente da dessensibilização do que os receptores KA, e, podem ser bloqueados pela adição de ciclotiazida, para receptores AMPA, e concanavalina A, para receptores KA (TRUSSEL et al., 1993; FLETCHER e LODGE, 1996).

A família de receptores metabotrópicos de glutamato compreende oito subunidades de receptores (mGluR1-8) que são divididos em três grupos: Grupo I (mGluR1 e mGluR5), Grupo II (mGluR2 e mGluR3) e Grupo III (mGluR4, mGluR6, mGluR7 e mGluR8). O grupo I é acoplado positivamente à

fosfolipase C (PLC), levando a um aumento de cálcio intracelular e à produção de inositol trifosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG), enquanto os grupos II e III estão acoplados negativamente à adenilil ciclase (AC), causando uma redução dos níveis intracelulares de AMPc (SCHOEPP et al., 1992; HASSEL e DINGLEDINE et al., 2006; PILC e OSSOWSKA, 2007).

Em 1994, ao analisar o hipotálamo de ratos submetidos à privação de água durante dois dias, Meeker e colaboradores encontraram um aumento da densidade de receptores NMDA e metabotrópicos de glutamato no núcleo supra óptico e na região anterior do hipotálamo (MEEKER et al., 1994). Embora ainda haja controvérsias quanto à existência ou não de receptores NMDA em astrócitos, todos os outros tipos de receptores de glutamato já foram encontrados nestas células (BUSNARDO et al., 2012; LEE; HAYDON, 2007; NISWENDER; CONN, 2010).

Em diversos experimentos e condições patológicas, como hipóxia e isquemia, por exemplo, foi mostrado que além da liberação de glutamato, ocorre também a liberação de adenosina (CHEN; GRAHAM; STONE, 1992; LATINI; PEDATA, 2001). Além disso, tem sido reportada uma interação dos receptores de adenosina com receptores tanto ionotrópicos como metabotrópicos de glutamato (SHAHRAKI; STONE, 2003).

## **1.5 Adenosina**

A adenosina (Ado) é um ribonucleosídeo constituído por uma base púrica (adenina) ligada a uma pentose (D-ribose) e é encontrada em todos os tecidos do corpo. Ela desenvolve um papel modulador no SNC tanto em condições fisiológicas quanto em condições patológicas, capaz de regular a liberação de neurotransmissores e modular a sinalização sináptica (CUNHA, 2001). De modo geral, a adenosina atua como um mensageiro intercelular, embora não seja considerada um neurotransmissor clássico, já que não é estocada em grânulos sinápticos ou liberada de forma quântica em resposta a



potenciais de ação. Um dos papéis mais conhecidos deste nucleosídeo no SNC é o seu efeito neuroprotetor (WARDAS, 2002), que pôde ser observado em experimentos que demonstraram que a adenosina impede a morte de neurônios induzida pela troca do meio de cultura (PAES-DE-CARVALHO et al., 2005).

A adenosina extracelular pode derivar tanto de neurônios pré-sinápticos como pós-sinápticos (SPERLÁGH; VIZI, 2011) e também de células gliais (LOVATT et al., 2012), exercendo suas funções modulatórias através da ativação de receptores específicos os quais são classificados como:  $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$  e  $A_3$  (FREDHOLM et al., 2001). Todos eles são pertencentes à superfamília de receptores acoplados a proteína G (FREDHOLM, 2010). Quando estimulados, os receptores  $A_{2A}$  e  $A_{2B}$  levam a uma ativação da adenilil ciclase, aumentando a concentração intracelular de AMPc (LI et al., 2001). Já os receptores  $A_1$  e  $A_3$  inibem a adenilil ciclase (BJÖRKLUND et al., 2008), levando a uma diminuição no AMPc e um aumento na concentração de  $Ca^{2+}$  intracelular ( $[Ca^{2+}]_i$ ), por uma via que envolve a ativação da fosfolipase C (BIBER et al., 1997).

Cada receptor possui uma ação característica, mediando diferentes eventos. Uma propriedade dos receptores de adenosina é que cada um pode ser ativado por diferentes níveis de concentração de adenosina (FREDHOLM et al., 2001) e estão descritos em diferentes populações neuronais e gliais (SCHULTE; FREDHOLM, 2000). Com isso, a concentração de adenosina no meio extracelular, sob diferentes condições, será o diferencial para a ativação de um ou outro receptor. A afinidade da adenosina por seus receptores em humanos foi determinada experimentalmente, e os seguintes valores de EC50 foram obtidos:  $A_1$ , 0.31  $\mu$ M;  $A_{2A}$ , 0.7  $\mu$ M;  $A_{2B}$ , 24  $\mu$ M;  $A_3$ , 0.29  $\mu$ M (FREDHOLM, 2010). Esses valores mostram que os receptores  $A_1$ ,  $A_{2A}$  e  $A_3$  podem ser ativados por concentrações fisiológicas, enquanto o receptor do tipo  $A_{2B}$  requer concentrações patológicas de adenosina para que seja ativado.

### **1.5.1 Mecanismos de Síntese, Liberação e Metabolismo de Adenosina.**

A adenosina pode ser sintetizada tanto no meio intra quanto no meio extracelular (figura 4), no entanto, as enzimas responsáveis pela conversão do precursor 5'-monofosfato de adenosina (5'-AMP) em adenosina são diferentes nestes compartimentos. A forma citoplasmática da enzima em questão é chamada de 5'-nucleotidase e, a forma extracelular, de 5'-ectonucleotidase (MACKIEWICZ et al., 2003). Desta forma, a adenosina pode ser sintetizada através da quebra de nucleotídeos de adenina, como o ATP (trifosfato de adenosina), ADP (difosfato de adenosina) que são convertidos em AMP (monofosfato de adenosina) pelas enzimas ectoATP difosfoidrolase (ATP-Dase) (PLESNER, 1995). Além disso, a adenosina citosólica pode sofrer translocação através de um transportador bidirecional discutido mais adiante.

Outra possível fonte de adenosina no SNC é via de liberação de AMPc (monofosfato cíclico de adenosina) para o meio extracelular através de um transportador dependente de energia não específico. O AMPc é convertido a AMP pela ectofosfodiesterase (Ecto-PDE) no meio extracelular (JACKSON et al., 2007). A adenosina pode ainda ser formada pela hidrólise da S-adenosilhomocisteína (SAH) pela enzima SAH hidrolase. Essa enzima geraria adenosina e homocisteína a partir da SAH, entretanto, essa via não possui uma grande importância na produção deste nucleosídeo (ZIMMERMAN et al., 1980).

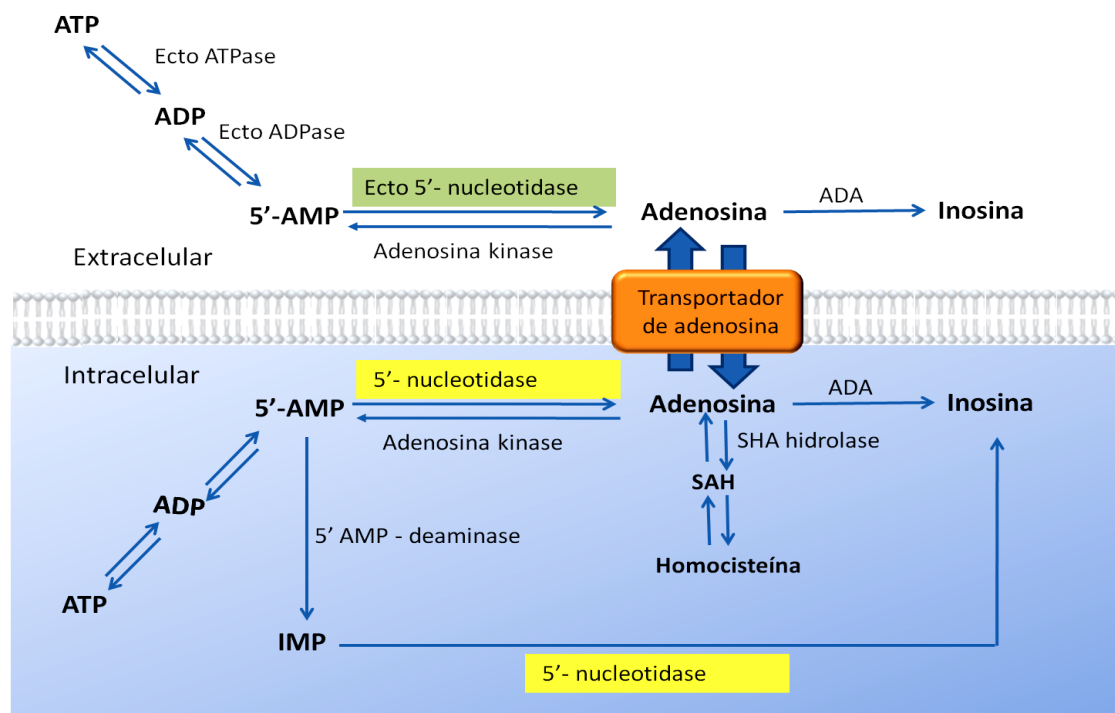


Figura 4 Representação esquemática da regulação da síntese e metabolismo de adenosina nos meios intra e extracelular. (modificado de G. Schulte, 2002)

A liberação de adenosina é realizada por transportadores localizados na membrana celular tanto de neurônios como de células da glia. Esta liberação pode ser modulada por diversos fatores, como alteração na concentração dos substratos metabólicos e na concentração intracelular de adenosina. Ela pode ser estimulada por altas concentrações de  $K^+$ , por agonistas glutamatérgicos e por estímulo elétrico (LATINI e PEDATA, 2001). Uma vez que astrócitos podem manter contato com milhares de sinapses, é concebível que a liberação astrocitária tenha um importante papel na modulação de sinapses mediada por adenosina.

A remoção de adenosina extracelular é realizada em parte pela recepção, por meio do transportador bidirecional, seguida por sua fosforilação a AMP pela enzima adenosina cinase, e em parte por sua degradação a inosina pela enzima adenosina deaminase. Embora a adenosina deaminase seja principalmente encontrada no meio citosólico, já foi descrita, em vários tecidos, inclusive no tecido nervoso, na forma de uma ectoenzima (FRANCO et al., 1986). Inibidores da adenosina deaminase, como por exemplo, eritro-9-(2-

hidroxi-3-inonil) adenosina (EHNA), aumentam, a concentração extracelular de adenosina em diferentes condições experimentais (SCIOTTI & VAN WYLENet al.,1993; PHILLIS et al.,1991). A maior parte da degradação de adenosina é, no entanto, intracelular

### **1.5.2 Transporte de Adenosina**

Os transportadores de adenosina são classificados em dois grupos: transportadores equilibrativos (ENT), que transportam adenosina de acordo com o gradiente de concentração e os transportadores concentrativos (CNT) que transportam a adenosina contra o seu gradiente de concentração e de forma dependente de um gradiente de  $\text{Na}^+$ . Neste caso, a adenosina é co-transportada juntamente com este íon para dentro da célula, que configura um transporte ativo secundário (THORN; JARVIS, 1996). Esses transportadores são bidirecionais, promovendo não só a liberação, mas também a captação de adenosina. Os ENTs podem ainda ser divididos em sensíveis e insensíveis a NBMPR (nitrobenziltioinosina), um inibidor destes transportadores (JARVIS & YONG, 1986). No sistema nervoso central foi demonstrado uma grande quantidade de RNAm para os transportadores equilibrativos, principalmente RNAm de transportadores sensíveis a NBMPR (DUAN et al., 1999).

### **1.5.3 Receptores e Sinalização adenosinérgica**

A classificação dos subtipos de receptores de adenosina é baseada no efeito oposto que o agonista tem na produção de AMPc nos diversos tipos de tecidos: inibitórios para  $A_1$  e  $A_3$  e excitatório para  $A_2$  (CUNHA, 2001) Receptores  $A_2$  são subdivididos em  $A_{2A}$  e  $A_{2B}$ , isso porque receptores  $A_{2A}$  estimulam a produção de AMPc em baixas concentrações de adenosina (0,1 – 1,0  $\mu\text{M}$ ) enquanto que  $A_{2B}$  são ativados em altas concentrações de adenosina (> 10  $\mu\text{M}$ ) (SCHULTE; FREDHOLM, 2002).

Quando estimulados, os receptores  $A_{2A}$ , e  $A_{2B}$  acoplados a proteína  $G_s$ , ativam a adenilil ciclase, aumentando a concentração intracelular de AMPc a partir do ATP (FEOKTISTOV; BIAGGIONI, 1997; OLANREWAJU et al., 2000), Já a ativação de receptores  $A_1$  e  $A_3$ , acoplados a proteína  $G_{i/o}$ , inibem a atividade da adenilil ciclase (**figura 5**), levando a diminuição dos níveis de AMPc (LIANG; JACOBSON, 1998; LINDEN, 1991; REBOLA et al., 2005)

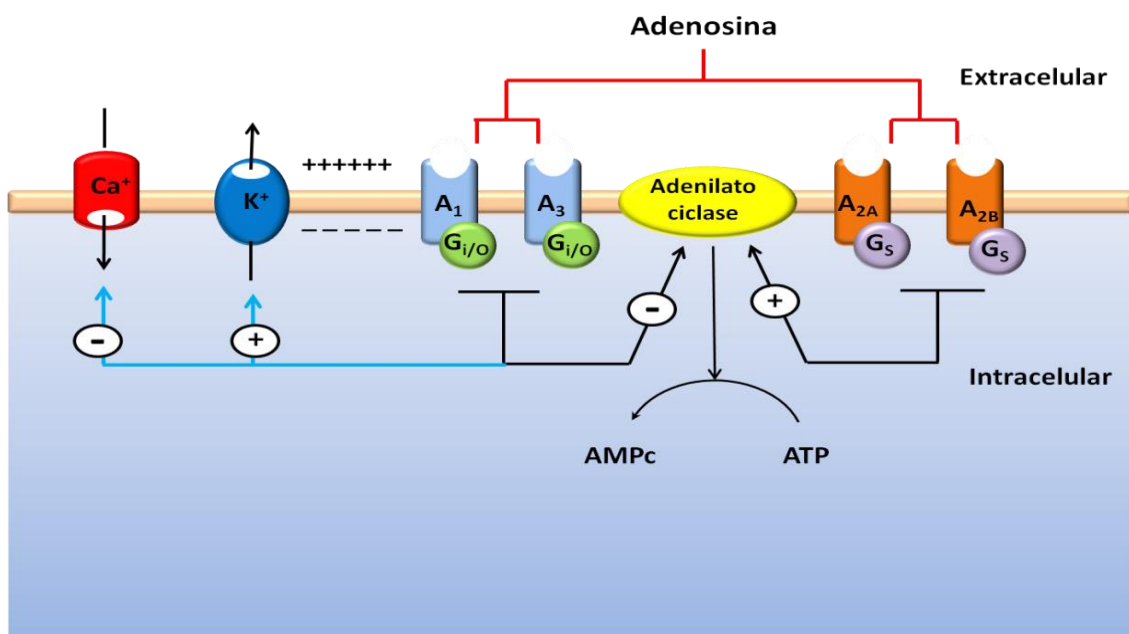


Figura 5 Esquema simplificado da ação da adenosina em seus receptores

Esquema simplificado da ação da adenosina em seus receptores ativando a proteína G - receptores  $A_{2A}$  e  $A_{2B}$ , quando ligados à adenosina, ativam proteína  $G_s$  estimulando a enzima adenilil ciclase e promovendo um aumento dos níveis de AMPc a partir de ATP. Receptores  $A_1$  e  $A_3$ , quando ligados à adenosina, ativam proteína  $G_{i/o}$  inibindo a enzima adenilil ciclase e com isso, a produção de AMPc.

Há também uma via de transdução de sinal através de canais iônicos, em que os receptores  $A_1$  pré-sinápticos ativados levam a abertura de canais de  $K^+$ , aumentando a condutância desse íon, e o fechamento de canais de  $Ca^{2+}$  do tipo N (MOGUL et al., 1993). Ambos os efeitos contribuem para a inibição da liberação de neurotransmissores, como o glutamato, por resultar na hiperpolarização dos terminais pré-sinápticos (BIBER et al., 1997; REBOLA et al., 2003).

De todos os receptores de adenosina o  $A_1$  é o mais abundante (DIXON et al., 1996). Um dos principais papéis deste receptor em diferentes tipos celulares é referente à habilidade que ele tem de reduzir o metabolismo celular (ZHONG et al., 1998). Distribuídos por todo o SNC, os receptores  $A_1$  são encontrados tanto em neurônios, quanto em astrócitos, microglia e oligodendrócitos (BIBER et al., 1997; GEBICKE- HAERTER et al., 1996; OTHMAN et al., 2003), e localizam-se abundantemente nos terminais pré e pós-sinápticos (TETZLAFF et al., 1987).

A adenosina endógena ativa tanto o receptor  $A_1$  quanto  $A_{2A}$  e esses receptores podem coexistir em uma mesma célula (CORREIA-DE-SÁ et al., 1991). O padrão de atividade elétrica, a fonte extracelular de adenosina, bem como sua concentração determinam que tipo de receptor será preferencialmente ativado. Assim, estímulos de alta frequência favorecem a liberação de ATP, e formação de adenosina extracelular, ativando preferencialmente receptores  $A_{2A}$ , enquanto estímulos de baixa frequência favorecem a liberação de adenosina e preferencialmente a ativação de receptor  $A_1$  (CORREIA-DE-SÁ et al., 1996). Além disso, trabalhos mostram que em baixas concentrações de adenosina extracelular há um predomínio da ativação de receptor  $A_1$ , enquanto em altas concentrações, a adenosina exerce sua modulação via ativação de receptores  $A_{2A}$  (CORREIA-DE-SÁ & RIBEIRO, 1996).

A adenosina pode ser liberada em resposta a estímulos como aumento do  $K^+$ , estimulação elétrica, agonistas glutamatérgicos, hipóxia, hipoglicemia e isquemia (LATINI & PEDATA, 2001). No hipotálamo, tem sido mostrado que a adenosina influencia na regulação da temperatura, na homeostase do sono e nas secreções endócrinas (OBRIETAN et al., 1995). No entanto, pouco se sabe sobre seu efeito no que se refere à regulação glutamatérgica em resposta a eventos de hiperosmolaridade.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar o possível papel modulador da adenosina sobre os níveis de glutamato extracelular induzido pelo estímulo hiperosmótico em cultura de astrócitos hipotalâmicos

### **2.2 Objetivos específicos**

- Observar o efeito do estímulo hiperosmótico nos níveis de glutamato extracelular na cultura de astrócitos hipotalâmicos
- Verificar o efeito da hiperosmolaridade na liberação de adenosina por cultura de astrócitos do hipotálamo
- Observar o efeito do glutamato na liberação de adenosina por cultura de astrócitos hipotalâmicos
- Investigar o efeito da substituição do sódio por concentrações equimolares de manitol, com a finalidade de avaliar se o transporte de adenosina durante o estímulo hiperosmótico é dependente ou não de sódio
- Averiguar o efeito do pré - tratamento com adenosina nos níveis de glutamato extracelular após exposição ao tampão hiperosmótico
- Observar o efeito de drogas agonistas e antagonistas do receptor A1 de adenosina nos níveis de glutamato extracelular após estímulo hiperosmótico

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Cultura de astrócitos hipotalâmicos

Para a cultura de astrócitos do hipotálamo foram utilizados 6 a 8 ratos da linhagem *Wistar* com 1 a 2 dias de nascidos (CEPAE-UFGA 140-13). Os animais foram decapitados e as cabeças imediatamente colocadas em uma placa de petri contendo meio livre de cálcio e magnésio (CMF-Meio Livre de Cálcio) gelado e em seguida levadas para a câmara de fluxo laminar para dissecação.

Os encéfalos foram cuidadosamente removidos da caixa craniana e colocados em uma segunda placa de Petri, novamente contendo CMF gelado. A partir daí, o hipotálamo de cada um dos encéfalos foi dissecado com limites definidos pelo nível imediatamente rostral ao quiasma óptico até os corpúsculos mamilares, as bordas laterais do *tuber cinereum* e pela parte superior do terceiro ventrículo (figura 6)



Figura 6 Vista ventral do encéfalo de ratos recém-nascidos (P1 a P2) mostrando a delimitação para a remoção do hipotálamo para a obtenção da cultura de astrócitos

O tecido hipotalâmico foi então transferido para um tubo cônico juntamente com 1 mL de tripsina a 1%. Após 5 minutos sob a ação da enzima,



o tecido foi dissociado mecanicamente através de sucessivas aspirações com uma pipeta. Após a dissociação do tecido, foram adicionados 2 mL de meio DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium) enriquecido com 10 % de soro bovino fetal (FBS) para que a ação da enzima fosse inativada. Para garantir a adesão mais rápida das células no fundo da placa, um volume reduzido (100 $\mu$ L) da suspensão concentrada de células foi distribuído em uma placa de 24 poços. Em seguida foram acrescentados mais 400  $\mu$ L de DMEM 10% de FBS para completar o volume necessário para o crescimento das células.

A placa foi mantida em estufa a 37°C, em uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Após um período de 24 horas, o meio de cultura foi trocado com o objetivo de remover restos celulares presentes. Sucessivas trocas de meio foram efetuadas a cada quatro dias para remover células que normalmente ficam aderidas sobre os astrócitos (neurônios, micróglia e oligodendrócitos), além de renovar os nutrientes para as células, até que a cultura se tornasse confluenta.

### **3.2 Estímulo hiperosmótico**

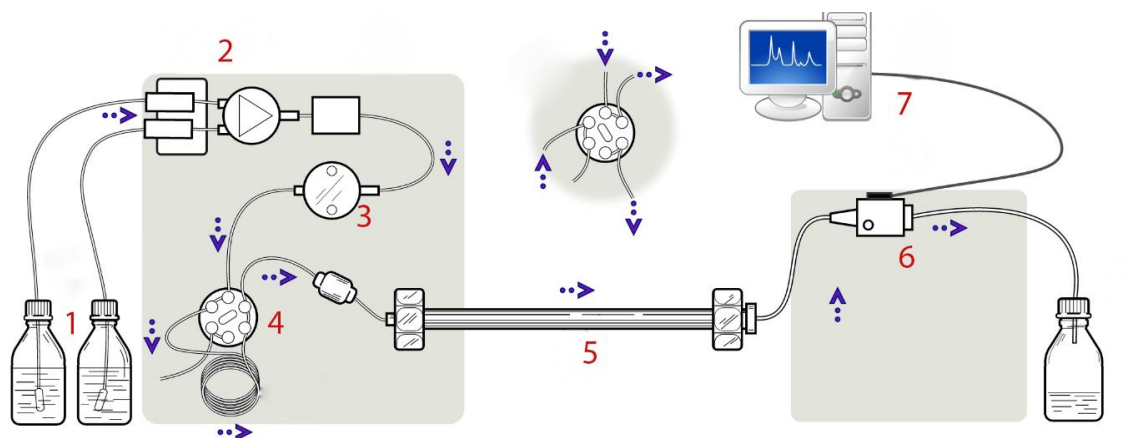
Após um período de 14 dias, a cultura foi submetida à hiperosmolaridade através da incubação dos astrócitos com uma solução salina de Hank (pH 7,4) contendo 128 mM de cloreto de sódio (NaCl), 4mM de cloreto de potássio (KCl), 1mM de cloreto de magnésio(MgCl<sub>2</sub>), 2mM de cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>), 12mM de glicose e 20mM de HEPES. Normalmente, a osmolaridade deste tampão é aproximadamente 300mOsm/L, para o estímulo, foram adicionados mais 20 mM de NaCl à preparação (ou 40mM de manitol quando houve substituição do sódio), obtendo assim, uma solução com 340 mOsm/L

A placa de cultura foi dividida nos grupos: ISO (tampão Hank: 300mOsm/L) e HIPER (tampão Hank: 340 mosm/L), ambos mantidos em incubação nos tempos de 3, 5, 10, 15 minutos, com 500 $\mu$ L do tampão referente a cada grupo, a 37 °C. Após esse período, o meio de incubação foi coletado

dos poços e transferido para um microtubo para dosagem de glutamato e adenosina.

### 3.3 Dosagem de glutamato através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

O método de CLAE é capaz de promover a separação dos constituintes de uma determinada amostra de acordo com sua natureza, da fase móvel e da fase estacionária. De forma resumida, a amostra é introduzida na coluna cromatográfica preenchida com uma fase estacionária, e uma fase móvel (solvente). Uma bomba impulsiona a fase móvel pelo sistema e, no trajeto a fase móvel arrasta a amostra até a coluna, local onde ocorrerá a separação dos compostos de acordo com o grau de polaridade dos componentes da amostra. Após a separação, os componentes passam pelo detector, o qual emite um sinal que será convertido em dados digitais.



**Figura 7** Representação esquemática de um Sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

(1) Solvente, (2) válvula de gradiente, (3) Bomba de pressão, (4) Alça de injeção da amostra, (5) Coluna analítica, (6) Detector, (7) Sistema de aquisição de dados.

### 3.3.1 Reagentes e Soluções Analíticas

Em todos os experimentos foram utilizados água ultrapura (Sistema Mili-Q Milipore, USA) e metanol grau HPLC. Foram preparadas também soluções analíticas de estoque de ácido glutâmico e homoserina (padrão interno), ambos na concentração de 1 g/mL.

### 3.3.2 Condições cromatográficas

Foi utilizado Cromatógrafo líquido de alta eficiência da marca Shimadzu, equipado com bomba (LC20-AT), detector de fluorescência (RF-10Axl), degaseificador (DGA-20A5), módulo comunicador (CBM-20A), injetor de amostras Rheodyne com alça de injeção de 20  $\mu$ L, coluna cromatográfica (Shimadzu, Shim-Pack VP-ODS, dimensão 250 x 4,6 mm), um sistema de aquisição de dados LC-Solution, e uma microsseringa de 50  $\mu$ l (*Hamilton*).

A fase móvel foi composta por duas fases, uma que chamamos de **Fase A** (95% de tampão acetato, 5% de metanol e 12,3 mL de álcool isopropílico) e **Fase B** (70% de metanol e 30% de água ultra pura). A corrida se iniciou com a fase móvel composta por 100% de Fase A, alcançando a relação 70% A/ 30% B em dez minutos de corrida, 50% A/ 50% B em vinte minutos de corrida e 100% de Fase A em 25 minutos. O fluxo da fase móvel foi de 1,2 mL/min e os comprimentos de onda, de excitação e emissão, foram de 340 e 460 nm, respectivamente.

### 3.3.3 Preparo das Amostras

Para evitar danos à coluna cromatográfica e para isolar o máximo possível as moléculas de glutamato presentes na amostra, aplicamos uma etapa de precipitação de proteínas, para isso foram adicionados 20  $\mu$ L de ácido tricloroacético (TCA) 1% a 500  $\mu$ L da amostra, seguida de agitação em agitador *vortex* e centrifugação a 5000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi

transferido para microtubo e mantido a uma temperatura de  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  até o momento das análises. Para a análise,  $20\text{ }\mu\text{L}$  do padrão interno (homoserina) foram adicionados a  $300\text{ }\mu\text{L}$  da amostra e homogeneizados em seguida. O padrão interno foi utilizado com o intuito de melhorar a precisão e exatidão da análise

#### **3.3.4 Derivatização**

Uma vez que a molécula de glutamato não é naturalmente fluorescente, tivemos que modifica-la para que pudesse ser detectada pelo método de fluorescência. Utilizamos então uma solução derivatizante composta de: Orto-ftaldeído (OPA)  $13\text{ mg}$ , N-acetil-cisteína  $16,3\text{ mg}$  e metanol  $300\text{ }\mu\text{L}$ . O Orto-ftaldeído reage com grupos aminos primários na presença de grupamento tiol (N-acetil-cisteína), que em meio alcalino gera um produto fluorescente chamado isoindol o qual pode ser medido. Durante todo tempo de uso a solução derivatizante foi protegida da luz e mantida em um recipiente com gelo

Antes da injeção no equipamento,  $60\text{ }\mu\text{L}$  da amostra em temperatura ambiente foram misturadas a  $40\text{ }\mu\text{L}$  de tampão borato ( $60\text{ mL}$  de Ácido Bórico  $0,1\text{ M}$  e  $40\text{ mL}$  NaOH  $1\text{ M}$ ) e  $5\text{ }\mu\text{L}$  de solução derivatizante. A solução resultante foi homogeneizada em vórtex e injetada no sistema cromatográfico após  $5$  minutos de reação.

#### **3.3.5 Curva de calibração**

Antes de qualquer dosagem de glutamato foi obtida uma curva de calibração a partir de soluções padrões de glutamato nas seguintes concentrações:  $6.25$ ,  $12.5$ ;  $25$  e  $50\text{ }\mu\text{M}$ . Cada uma delas foi analisada em triplicata e submetida ao mesmo procedimento das amostras incluindo o processo de derivatização. Os resultados foram plotados em gráfico de dispersão do qual se obteve a equação da reta utilizada para o cálculo das quantidades de glutamato presente nas amostras.

### **3.4 Dosagem de Adenosina pelo Método de CLAE**

Para avaliar os níveis extracelulares de adenosina, tivemos que padronizar um método simples para detecção deste nucleosídeo por CLAE em nosso laboratório. A validação de métodos analíticos desenvolvidos, ou mesmo, a validação de modificações e ajuste de métodos já publicados devem incluir todas as etapas necessárias para mostrar que os resultados obtidos são confiáveis e reprodutíveis. Para isso, foram adotadas as medidas preconizadas no guia de validação de métodos analíticos publicado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2010)

#### **3.4.1 Reagentes e Soluções Analíticas**

Para o método utilizamos água ultrapura (Sistema Mili-Q Milipore, USA), metanol e Adenosina  $\geq 99\%$  de pureza (Sigma Chemical).

#### **3.4.2 Condições cromatográficas**

Foi utilizado um equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência da marca Shimadzu, equipado com bomba (LC20-AT), detector de ultra-violeta (SPD-20A), degaseificador (DGA-20A5), módulo comunicador (CBM-20A), injetor de amostras Rheodyne com alça de injeção de 20  $\mu\text{L}$ , coluna cromatográfica (Shimadzu, Shim-Pack VP-ODS, dimensão 250 x 4,6 mm), um sistema de aquisição de dados LC-Solution, e uma microseringa de 50  $\mu\text{l}$  (*Hamilton*).

A fase móvel foi uma solução composta por 70% de metanol e 30% de água Milli-Q. A coluna foi equilibrada e eluída sob condições isocráticas

utilizando um fluxo de 0,8 mL/min e a detecção foi realizada em comprimento de onda de 257nm com um tempo total de corrida de 10 minutos.

### **3.4.3 Preparo da solução padrão**

As soluções de estoque de adenosina foram preparadas independentemente em duplicata, pela dissolução de 2,67 mg em 1 mL água ultrapura para se obter uma concentração de 10 mM cada. A partir desta solução mãe foi retirada uma alíquota de 1 mL que foi diluída para a concentração de trabalho 1 mM. Diluições seriadas geraram as seguintes concentrações usadas para preparar os pontos da curva de calibração: 200; 100; 50; 25; 10; 5; 1 e 0.5  $\mu$ M, todos eles analisados em triplicata.

### **3.4.4 Validação do método cromatográfico para quantificação de adenosina**

Os parâmetros utilizados para validar a quantificação de adenosina por CLAE foram:

#### ❖ Tempo de retenção

Este parâmetro foi utilizado para definir o período para eluição da molécula de adenosina desde o ato da injeção até a saída do ponto máximo do pico do sistema. Para isso utilizamos uma concentração inicial de 100  $\mu$ M de adenosina diluída em água mili-Q.

#### ❖ Seletividade

A seletividade de um método instrumental de separação como o de CLAE, é a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias em análise na presença de componentes que podem interferir com a sua determinação em uma amostra complexa, ou seja, avalia o grau de interferência de espécies como outras moléculas ativas, excipientes, impurezas e produtos de degradação, bem como outros compostos de propriedades similares que possam estar, porventura, presentes. Isso garante que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse.

Para determinar a seletividade, comparamos o cromatograma de uma concentração padrão de adenosina diluída no tampão de incubação de amostras (Hank 300mosm/L) com o cromatograma da injeção somente do tampão de incubação Hank, com o intuito de garantir que nenhum interferente do tampão eluisse no mesmo tempo de retenção da adenosina.

#### ❖ Linearidade da curva de calibração

Determinamos a linearidade da curva para avaliar se os resultados obtidos pelo detector foram diretamente proporcionais às concentrações do padrão, sendo as concentrações dos padrões escolhidas com base nos resultados esperados para os níveis extracelulares de adenosina. A curva de calibração define, adequadamente, a relação que existe entre as concentrações da amostra analisada e a resposta obtida pelo equipamento. A construção da curva foi feita mediante a correlação da altura do pico do cromatograma e a concentração do padrão analisado, sendo a curva composta por 10 pontos (25.0, 10.0, 7.5, 5.0, 2.5, 1, 0.5, 0.25, 0.05, 0.01  $\mu\text{M}$ ), cada um deles analisado em triplicata. Essa correlação foi expressa matematicamente como uma equação da reta denominada curva analítica. A estimativa dos coeficientes desta curva foi efetuada a partir do método da regressão linear.

#### ❖ Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ)

Para determinarmos o LD do método utilizamos diluições seriadas de adenosina até obtermos aquela que podia ser detectada, mas não necessariamente quantificada. Já o LQ representou a maior concentração de adenosina que pôde ser medida e quantificada com certo grau de confiabilidade. No nosso caso, adotamos que deveria ser pelo menos cinco vezes maior que qualquer ruído com o mesmo tempo de retenção presente na amostra branca (apenas tampão ou solvente) (FDA, 2001)

#### ❖ Precisão

A precisão representa o grau de dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas (RIBANI et al., 2004). Neste caso foi determinada em condições de repetibilidade no qual resultados independentes foram obtidos usando o mesmo equipamento, mesmo método, para a mesma amostra, no mesmo laboratório, pelo mesmo operador, em curto intervalo de tempo.

A precisão foi expressa como o desvio padrão (DP) ou desvio padrão relativo (DPR) utilizando a equação:

$$DPR (\%) = \frac{(DP \times 100)}{CMD}$$

$$\text{Onde: } DP = \sqrt{\frac{\sum(C_i - CMD)^2}{n-1}}$$

$C_i$  = concentração determinada;

$CMD$  = concentração média determinada;

$n$  = número de medições.



De acordo com o manual de métodos publicado pela ANVISA (2010), o valor máximo aceitável não deve ser superior a 5%.

❖ Estabilidade dos padrões e das amostras

Para garantir resultados confiáveis e reprodutíveis, as amostras, os padrões e os reagentes usados devem ter um período razoável de estabilidade (por exemplo um dia, uma semana, um mês, dependendo da necessidade). A estabilidade das amostras e padrões é importante em termos de temperatura e tempo. Se uma solução não for estável em temperaturas ambientes, a diminuição da temperatura pode aumentar a estabilidade das amostras e padrões. Com relação ao tempo, estabilidade de dias ou meses é mais desejável. Entretanto em alguns casos, as soluções precisam ser preparadas cada vez que forem realizadas as análises. Em certos tipos de amostras, faz-se necessário avaliar a estabilidade da substância para determinar o tempo de estocagem das amostras. Tempos longos de estocagem de amostras biológicas, por exemplo, aumentam a probabilidade de degradação dos compostos de interesse, com subsequente formação de metabólitos. Conhecendo a estabilidade, as análises podem ser completadas antes de ocorrer a degradação (RIBANI et al., 2004)

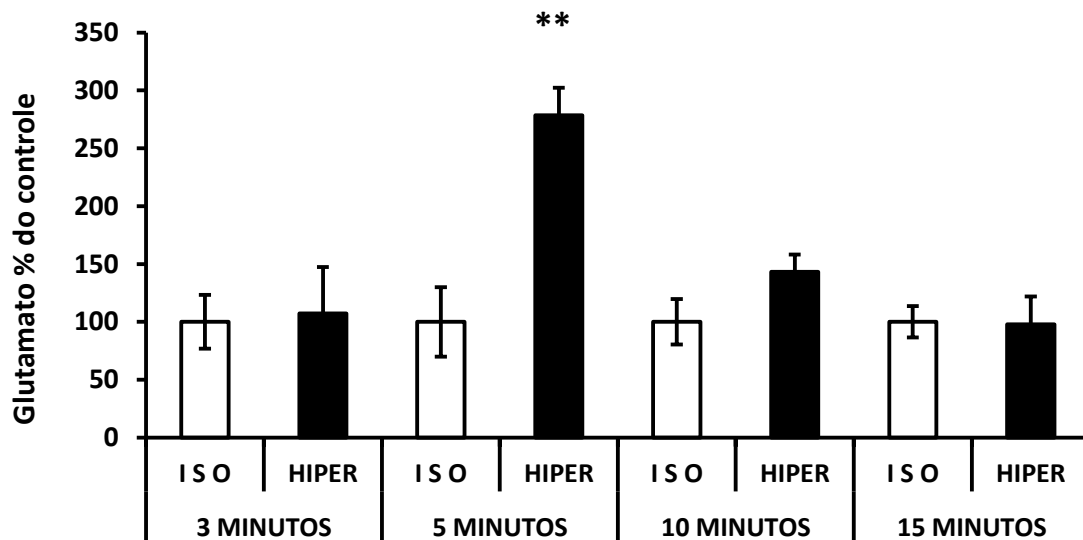
### **3.5 Análise Estatística**

Os resultados foram processados pelo programa BioEstat 5.0 e expressos como média aritmética e desvio padrão da média. Foi utilizado o teste ANOVA - um critério, com pós - teste de Tukey para comparar os resultados de todos os tratamentos ao controle. Os valores foram considerados significativos quando  $p < 0.05$ .

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Níveis de glutamato extracelular após estímulo hiperosmótico

A dosagem dos níveis extracelulares de glutamato mostrou que o estímulo hiperosmótico induziu aumento significativo dos níveis de glutamato em 5 minutos de exposição, o que não aconteceu no período anterior de 3 minutos (3 min=  $107 \pm 40\%$   $p > 0.05$ ; 5 min=  $278 \pm 23\%$   $p < 0.01$ ) assim como nos tempos seguintes (10 min.=  $143 \pm 14\%$   $p > 0.05$ , e 15 min.=  $98 \pm 24\%$   $p > 0.05$ ).



**Figura 8** Níveis de glutamato extracelular após estímulo hiperosmótico em cultura de astrócitos hipotalâmicos.

ISO: tampão HANK 300mOsm/L; HIPER: tampão HANK 340 mOsm/L. n=6, ANOVA,\*\*  $P < 0.01$  em relação ao tempo correspondente do controle ISO.

#### 4.2 Níveis extracelulares de adenosina após estímulo hiperosmótico

Uma vez que a adenosina já é bem caracterizada na literatura como um importante modulador do SNC, buscamos avaliar se o estímulo hiperosmótico era capaz de induzir sua liberação para o meio extracelular. Para isso, medimos os níveis deste nucleosídeo nos meios de incubação utilizando o método de CLAE padronizado em nosso laboratório. Os resultados (figura 9) mostraram que os níveis extracelulares de adenosina se elevavam a partir do décimo minuto de incubação (3 min. =  $1.0 \pm 0.1 \mu\text{g/ml}$   $p > 0.05$ ; 5 min. =  $1.26 \pm 0.11 \mu\text{g/ml}$   $p > 0.05$ ; 10 min. =  $1.6 \pm 0.1 \mu\text{g/ml}$   $p \leq 0.01$ ; 15 min. =  $2.1 \pm 0.12 \mu\text{g/ml}$   $p \leq 0.01$ . n = 6).

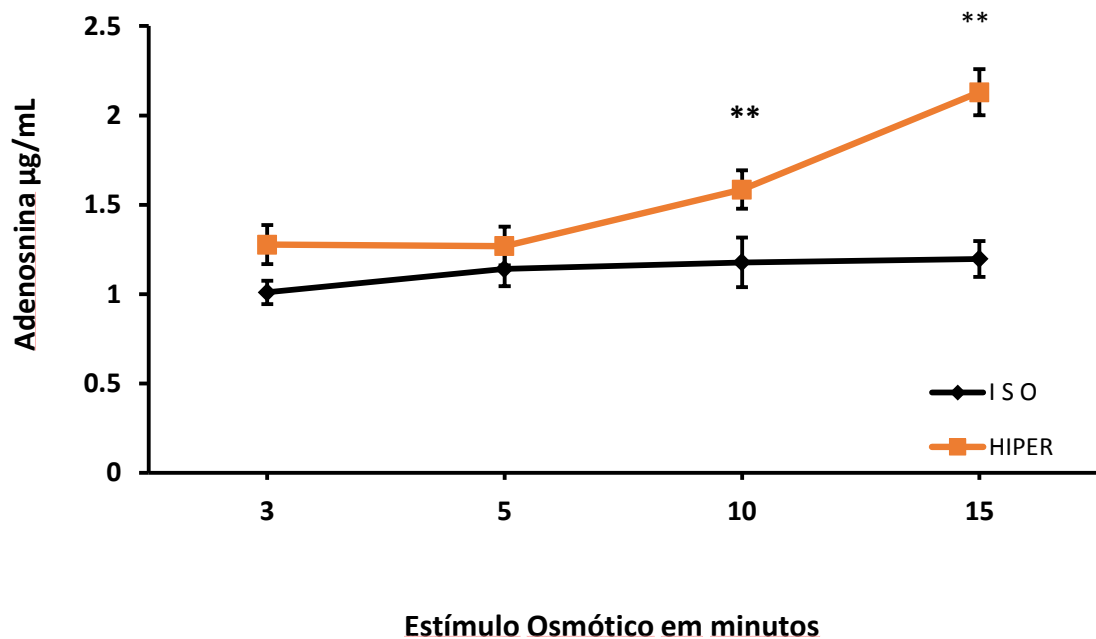


Figura 9 Níveis extracelulares de Adenosina após estímulo hiperosmótico em cultura de astrócitos hipotalâmicos. ISO: tampão HANK 300mOsm/L; HIPER: tampão HANK 340 mOsm/L. n=6, ANOVA, \*\*  $P < 0.01$  em relação ao tempo correspondente do controle ISO.

### 4.3 Sobreposição dos níveis extracelulares de adenosina e glutamato após estímulo hiperosmótico

Para melhor observar o efeito do estímulo hiperosmótico na liberação temporal de glutamato e adenosina, sobreposamos os dois resultados (figura 10) evidenciando a relação inversa entre os dois após os períodos de incubação. Notamos que em cinco minutos, quando há liberação de glutamato, ainda não há elevação de adenosina, e que em seguida, em dez minutos, quando os níveis de glutamato retornam para os valores basais, temos um aumento dos níveis extracelulares de adenosina que permanece em quinze minutos, levantando a hipótese de que a adenosina estaria sendo liberada para manter os níveis ideais de glutamato durante eventos de hiperosmolaridade.

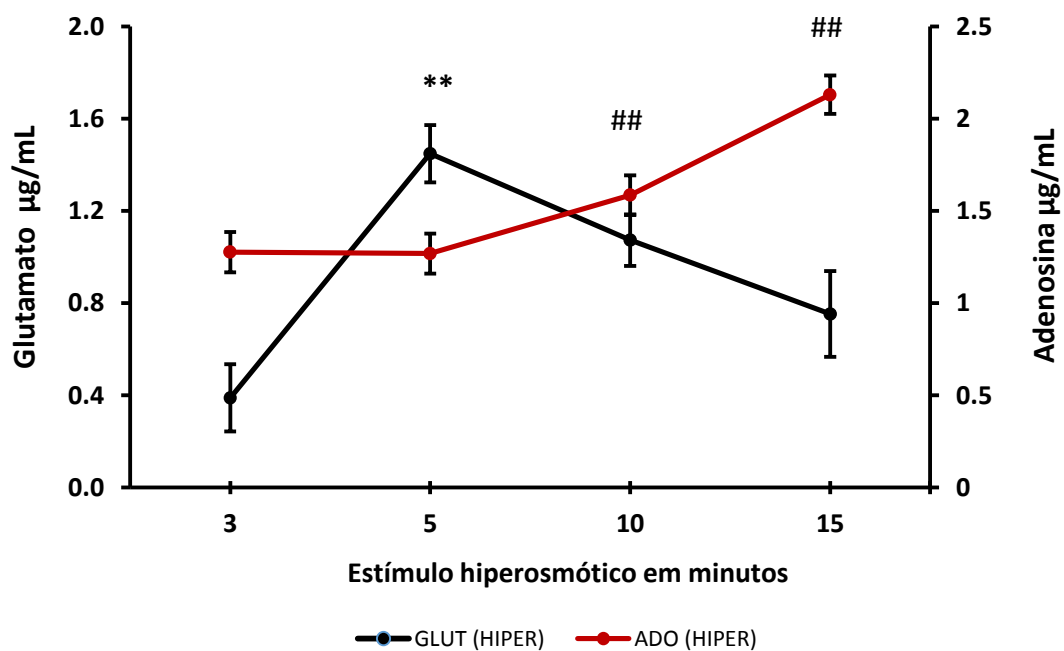
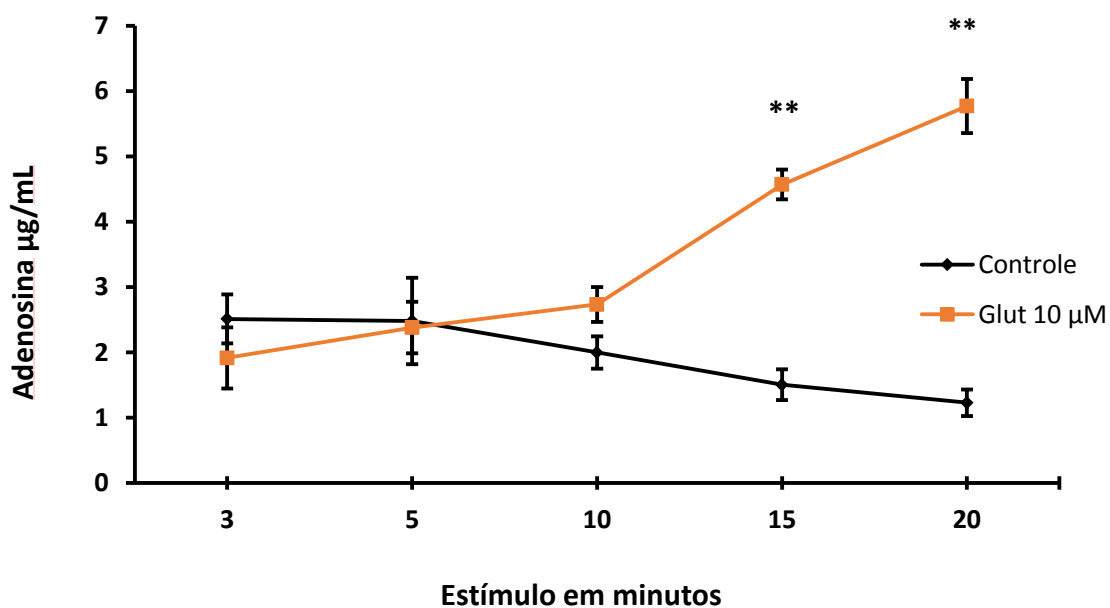


Figura 10 sobreposição dos níveis extracelulares de glutamato e adenosina. A linha preta representa o glutamato e a linha vermelha a adenosina \*\* $p \leq 0.01$  versus basal do glutamato; ##  $p \leq 0.01$  versus basal da adenosina. ANOVA,  $n=6$ .

#### 4.4 Efeito do glutamato na liberação de adenosina

Para verificar se a liberação de adenosina mostrada da figura 10 poderia ser resultante do estímulo glutamatérgico, incubamos os astrócitos com glutamato a 10  $\mu$ M por 3, 5, 10 e 15 minutos. Como resultado (figura 11) tivemos o aumento da liberação de adenosina após 15 minutos de ativação dos receptores glutamatérgicos (3min.=  $1.9 \pm 0.4$   $p > 0.05$ , 5min.=  $2.3 \pm 0.40$   $p > 0.05$ , 10min.=  $2.7 \pm 0.2$   $p > 0.05$ , 15 min.=  $4.6 \pm 0.2$   $p \leq 0.01$ ) que se manteve elevado nos 20 minutos de exposição (20min.=  $5.8 \pm 0.4$ ,  $p \leq 0.01$ ). Este dado nos levou a suspeitar que a liberação de glutamato em cinco minutos de estímulo hiperosmótico poderia ser um sinal para a liberação de adenosina que ocorre no décimo minuto.



**Figura 11:** Adenosina extracelular após incubação com 10  $\mu$ M de glutamato nos tempos 3, 5, 10, 15 e 20 minutos. n=6, ANOVA, \*\*  $p \leq 0,01$  em relação ao tempo correspondente do controle ISO.

#### 4.5 Efeito da substituição do sódio por manitol promovendo a hiperosmolaridade nos níveis extracelulares de glutamato.

Para verificar se a liberação de glutamato mostrada na figura 8 é dependente do íon sódio ou resultante da tensão superficial na membrana celular do astrócito, devido aumento da osmolaridade do compartimento extracelular, substituímos o sódio por manitol, o qual é capaz de promover hiperosmolaridade na mesma intensidade que o sódio. Nossos resultados mostraram que a incubação com tampão Hank com sódio como agente promotor da hiperosmolaridade (sódio HIPER) manteve o efeito mostrado na figura 8 com valores de  $150 \pm 2.3\%$  e  $p \leq 0.01$  quando comparado ao controle ISO  $100 \pm 7.8\%$ . Entretanto, não tivemos o mesmo efeito utilizando o Manitol como agente promotor da hiperosmolaridade (MANITOL HIPER), sendo os valores de glutamato extracelular mantidos em  $110 \pm 11\%$  sem diferença estatística quando comparado ao controle ISSO (figura 12).

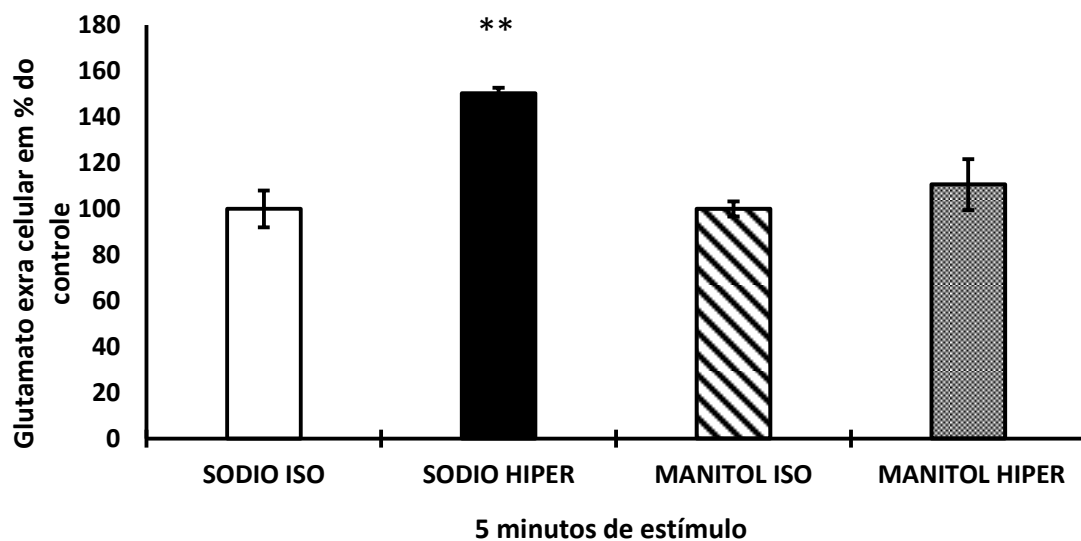


Figura 12: Níveis extracelulares de glutamato após estímulo hiperosmótico promovidos por sódio e manitol. ISO: tampão HANK 300mOsm/L; HIPER: Tampão HANK hiperosmótico após acréscimo de sódio, 340 mOsm/L; MANITOL: tampão HANK com manitol substituindo o sódio 300mOsm/L; MANITOL HIPER: tampão HANK sem sódio com manitol promovendo hiperosmolaridade 340mOsm/L. \*\* $p \leq 0.01$  em relação ao controle ISO, ANOVA,  $n=6$ .

#### 4.6 Efeito da substituição do sódio por manitol promovendo hiperosmolaridade nos níveis extracelulares de adenosina

Assim como com o glutamato, a substituição do sódio por manitol para gerar o estímulo hiperosmótico não induziu o aumento os níveis extracelulares de adenosina (figura 13). Em 10 minutos o resultado de exposição da cultura ao tampão HANK com sódio (HIPER) apresentou valor de  $6.24 \pm 0.5 \mu\text{g/mL}$  com  $p \leq 0.01$  quando comparado ao controle ISO ( $4.6 \pm 0.15 \mu\text{g/mL}$ ), reproduzindo o efeito mostrado na figura (). Já no estímulo hiperosmótico com manitol substituindo o sódio - MANITOL (HIPER), os níveis de adenosina foram de  $5.14 \pm 0.1 \mu\text{g/mL}$ , sem diferença estatística quando comparado ao controle ISO. Além disso, o acréscimo de manitol ao tampão HANK com sódio para promover hiperosmolaridade 340mOsm/L, induziu valores de  $5.7 \pm 0.1 \mu\text{g/mL}$  com  $p \leq 0.05$  quando comparado ao controle ISO

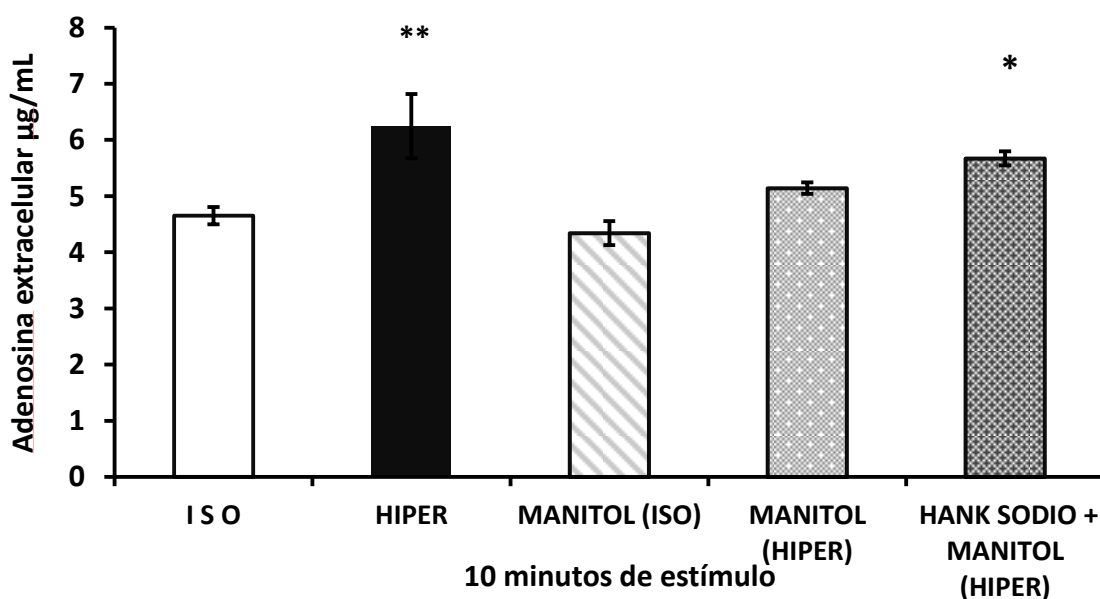


Figura 13 Níveis extracelulares de adenosina após estímulo hiperosmótico com sódio e manitol. ISO: tampão HANK 300mOsm/L; HIPER: Tampão HANK 340 mOsm/L; MANITOL: tampão HANK com manitol s/ sódio 300mOsm/L; MANITOL HIPER: tampão HANK com manitol 340mOsm/L s/sódio; HANK SÓDIO + MANITOL (MANITOL promovendo hiperosmolaridade 340 mOsm/L).n=6, ANOVA, \*\* $p \leq 0.01$ , \*  $p \leq 0.05$  em relação ao controle ISO



#### 4.7 Efeito do NMDA nos níveis extracelulares de adenosina após estímulo hiperosmótico

Uma vez que há estudos que mostram que após longos períodos de privação de água ocorre um aumento na expressão de receptor NMDA no hipotálamo, incubamos a cultura de astrócitos hipotalâmicos por 10 minutos com concentrações crescentes (0.1, 1.0 2 10  $\mu\text{M}$ ) de NMDA. No entanto, nenhuma das concentrações utilizadas foi capaz de promover o aumento dos níveis extracelulares de adenosina (0.1  $\mu\text{M}$ :  $4.5 \pm 0.5$   $p > 0.05$ , 1  $\mu\text{M}$ :  $4.47 \pm 0.2$   $p > 0.05$ , 10  $\mu\text{M}$ :  $5.1 \pm 0.46$   $p > 0.05$ ,  $n=6$ )

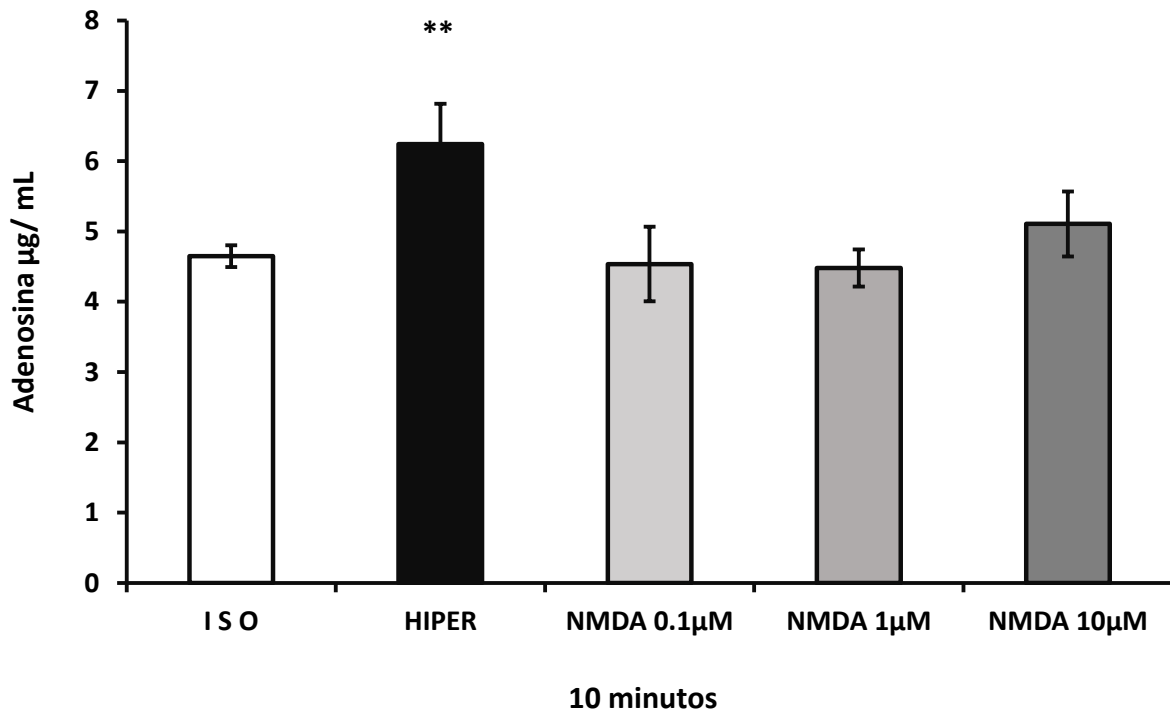


Figura 14 Níveis de adenosina extracelular após estímulos hiperosmótico em 10 minutos de incubação com NMDA nas concentrações de 0.1, 1 e 10  $\mu\text{M}$  em cultura de astrócitos hipotalâmicos.  $n=6$ , ANOVA,  $**p < 0.01$ , em relação ao controle ISO.

#### 4.8 Efeito do Dipiridamol nos níveis extracelulares de glutamato após estímulo hiperosmótico

Para avaliar o efeito da retirada da adenosina do compartimento extracelular durante o estímulo hiperosmótico, utilizamos o dipiridamol a  $10 \mu\text{M}$ , concentração suficiente para saturar por completo os transportadores de adenosina. A seguir, medimos os níveis de glutamato em 10 e 15 minutos de estímulo, períodos em que este neurotransmissor retorna aos níveis basais mostrado na figura 8. Os resultados da análise por CLAE (figura 15) mostraram que o dipiridamol (DIPIR) em meio isotônico promoveu uma diminuição dos níveis extracelulares de glutamato tanto em 10 ( $55 \pm 5.4\%$  versus controle ISO em 10 minutos  $100 \pm 16\%$ ) quanto em 15 minutos ( $50 \pm 5\%$  versus controle ISO em 15 minutos  $100 \pm 14\%$ ). Além disso, quando em meio hipertônico, o dipiridamol impediu que os níveis extracelulares de glutamato retornassem aos valores basais nos dois períodos, mantendo os valores de HIPER + DIPIR (10 minutos) em  $259 \pm 9.7\%$  quando comparado ao controle ISO (10 minutos) e os valores de HIPER + DIPIR (15 minutos) em  $197 \pm 20\%$  quando comparado ao controle ISO (15 minutos).

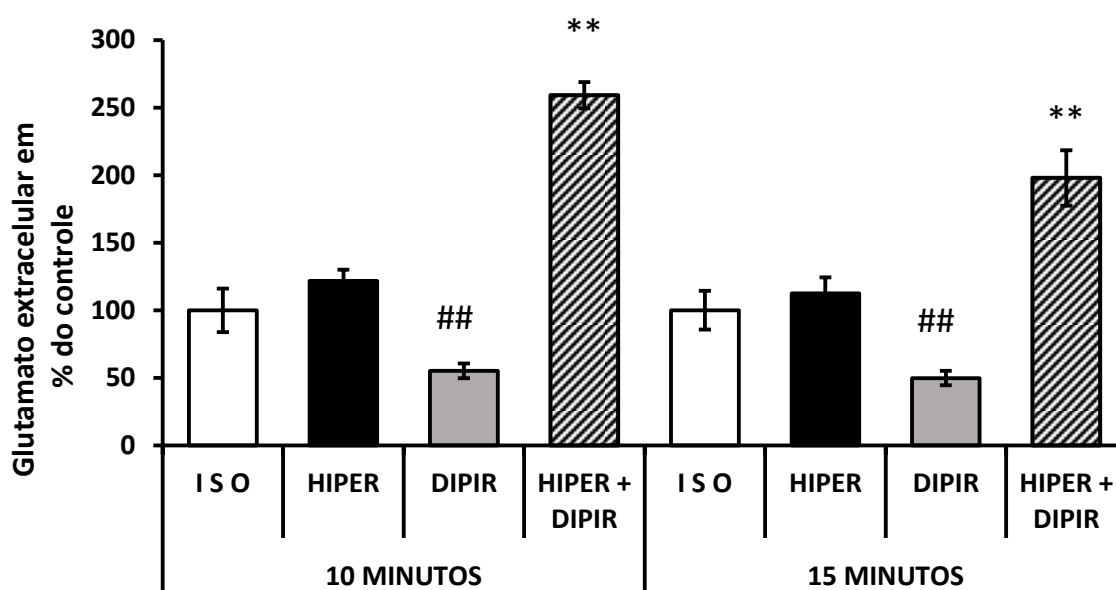


Figura 15 níveis de glutamato extracelular após estímulo hiperosmótico por 10 e 15 minutos em astrócitos hipotalâmicos pré incubados com Dipiridamol a  $10 \mu\text{M}$ . \*\* $p \leq 0.01$ . ANOVA, n=6.

#### 4.9 Efeito da adenosina nos níveis extracelulares de glutamato após estímulo hiperosmótico

Uma vez que em nossos resultados a adenosina só se encontrava elevada após dez minutos de hiperosmolaridade, investigamos qual seria o seu efeito caso estivesse aumentada em cinco minutos após o estímulo, momento em que já ocorre a elevação dos níveis extracelulares de glutamato. Para isso, incubamos a cultura de astrócitos previamente com 0,1 $\mu$ M de adenosina durante 30 minutos. A quantificação dos níveis extracelulares de glutamato (figura 16) mostrou que a adenosina preveniu a liberação deste aminoácido induzido por estímulo hiperosmótico, mantendo os valores em 94.4  $\pm$  13.8% no quinto minuto, sem diferença significativas com os valores basais de 100% e apresentando  $p \leq 0.01$  quando comparado ao estímulo hiperosmótico sem pré incubação com adenosina (HIPER). Além disso, a incubação com adenosina em condições isotônicas promoveu diminuição dos níveis extracelulares de glutamato estatisticamente significativa quando comparada ao controle (ISO + Ado 0,1  $\mu$ M 61.2 $\pm$ 6.9%).

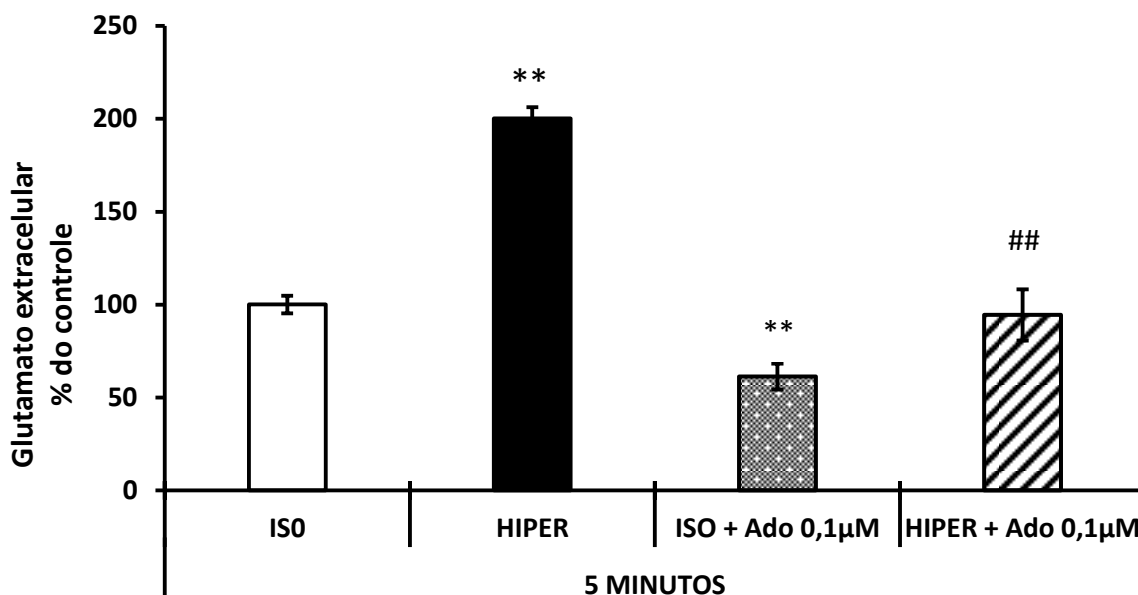


Figura 16 Níveis de glutamato extracelular em porcentagem do controle após cinco minutos de incubação com meio hiperosmótico (HIPER)340mOsm/L em cultura de astrócitos hipotalâmicos pré incubada com adenosina (Ado) a 0,1  $\mu$ M. \*\* $p \leq 0.01$  versus controle ISO; ##  $p \leq 0.01$  versus HIPER. ANOVA.n=6.

#### 4.10 Efeito do Agonista A1 R-PIA nos níveis extracelulares de glutamato após estímulo hiperosmótico

A partir daí, seguimos com a farmacologia para identificar o provável receptor de adenosina envolvido no processo. A literatura relata que os receptores de adenosina relacionados com a diminuição dos níveis extracelulares de glutamato são o A1 e o A3. No entanto, somente o receptor do tipo A1 foi encontrado no hipotálamo. Com isso, utilizamos o R-PIA a 10  $\mu$ M, um agonista seletivo deste receptor para averiguar seu efeito na liberação de glutamato durante os cinco minutos de estímulo hiperosmótico. Nossos resultados (figura 17) mostraram que o R-PIA, preveniu a liberação de glutamato promovida por estímulo hiperosmótico mantendo os níveis de glutamato em  $81 \pm 5.29\%$  sem diferença estatística quando comparado ao controle ISO  $100 \pm 18.86\%$ . Já no estímulo HIPER sem o R-PIA os níveis de glutamato se mantiveram elevados em  $158 \pm 16.91\%$  em comparação com o controle ISO.

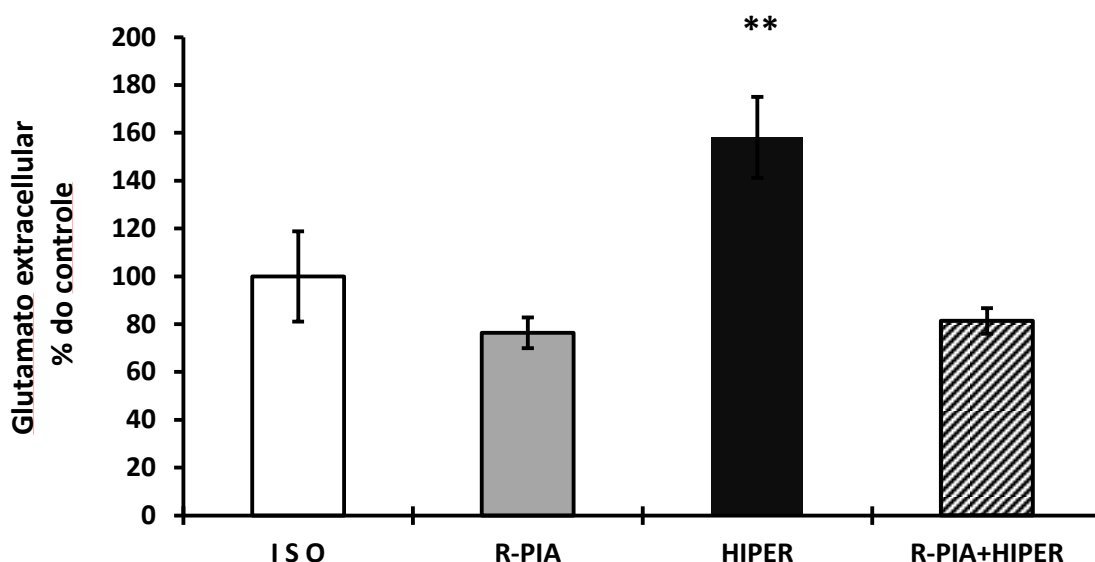


Figura 17 Níveis de glutamato extracelular em porcentagem do controle após cinco minutos de estímulo hiperosmótico 340 mOsm/L (HIPER) em cultura de astrócitos hipotalâmicos pré – incubada com R-PIA. \*\* $p \leq 0.01$  versus controle ISO. ANOVA; n=6.

#### 4.11 Efeito do CPT nos níveis extracelulares de glutamato após estímulo hiperosmótico

Utilizamos também o CPT, um antagonista do receptor A1 de adenosina, 30 minutos antes do estímulo hiperosmótico. Os resultados (figura 18) mostraram que o CPT impediu que os níveis de glutamato extracelular retornassem aos valores basais após 10 minutos de estímulo como normalmente acontece sem o uso do antagonista (figura 8), mantendo os valores significativamente elevados de 5 minutos em  $265 \pm 18.9\%$  quando comparado ao controle ISO de 5 minutos  $100 \pm 10.7\%$ ; de 10 minutos em  $285 \pm 14.5\%$  comparado ao controle ISO de 10 minutos  $100 \pm 17.7\%$  e o de 15 minutos em  $251 \pm 21.3\%$  comparado ao controle ISO de 15 minutos  $100 \pm 17.7\%$ .

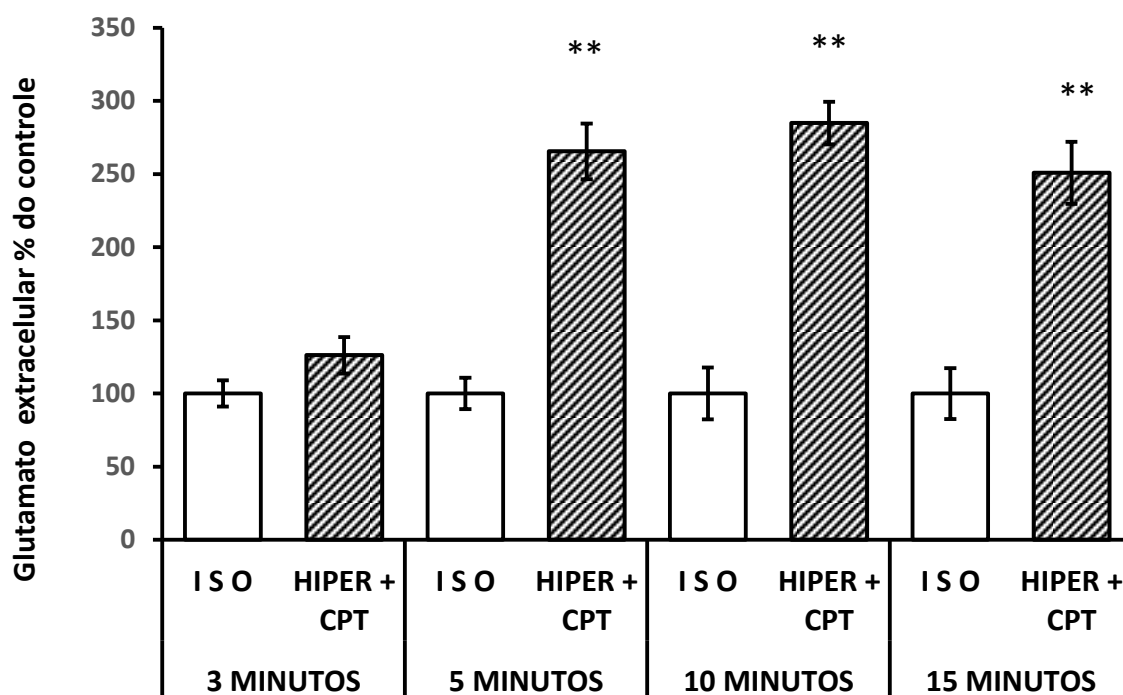


Figura 18 Níveis de glutamato extracelular após estímulo hiperosmótico em astrócitos pré incubados com CPT por 3, 5 10 e 15 minutos. \*\* $p \leq 0.01$ , em relação ao controle ISO correspondente de cada tempo, ANOVA. N=6

#### 4.12 Níveis extracelulares de glutamato e adenosina após estímulo hiperosmótico em cultura de astrócitos corticais

Para investigar se os resultados obtidos com a cultura de astrócitos hipotalâmicos se reproduziam em outras regiões do cérebro, utilizamos uma cultura de astrócitos corticais para produzir o estímulo hiperosmótico e medimos os níveis de glutamato e adenosina nos meios de incubação. Porém, diferente do que acontece no hipotálamo, os níveis extracelulares de glutamato e adenosina mantiveram valores semelhantes ao do controle em todos os tempos analisados (figuras 19 e 20)

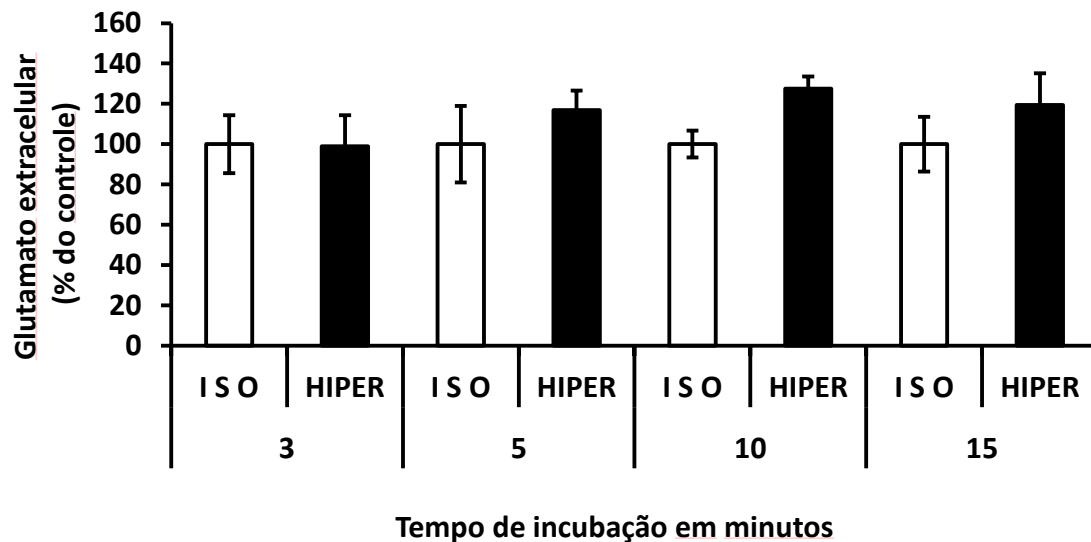


Figura 19 níveis extracelulares de glutamato após 3, 5, 10 e 15 minutos de estímulo hiperosmótico em astrócitos corticais. ANOVA, n=6

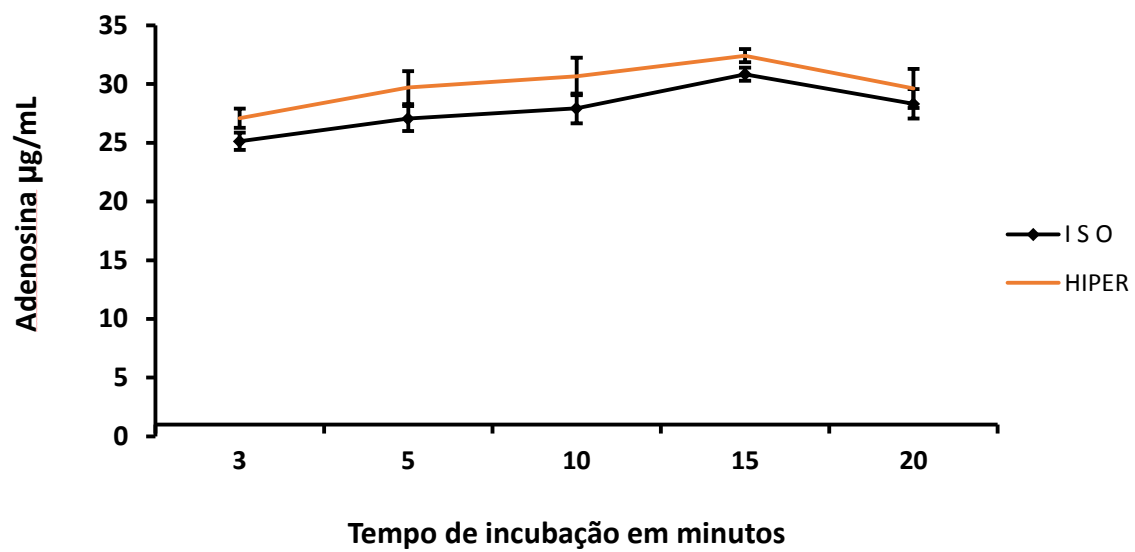


Figura 20 Níveis extracelulares de adenosina após 3, 5, 10 e 15 minutos de estímulo hiperosmótico em astrócitos corticais. ANOVA, n=6

## 5 DISCUSSÃO

Este estudo fez uma abordagem temporal da resposta de astrócitos mantidos em cultura considerando a liberação de glutamato e adenosina em ambiente hiperosmótico. Como mostrado nos resultados, o estímulo hiperosmótico induziu um aumento significativo dos níveis extracelulares de glutamato nos primeiros cinco minutos de incubação. Este dado está de acordo com alguns estudos prévios que mostram a liberação de glutamato por astrócitos hipotalâmicos durante o estímulo hiperosmótico (CAO et al., 2008; JIANG et al., 2011; YUAN et al., 2010). Segundo YUAN et al., (2010) as junções comunicantes do tipo conexina 43 (Cx43) podem estar envolvidas neste processo. Embora este seja um importante achado, pouco se conhece sobre os mecanismos envolvidos no controle da liberação de glutamato induzida pelo estímulo hiperosmótico.

No presente estudo demonstramos que a liberação de glutamato mediada por astrócitos submetidos a estímulo hiperosmótico se eleva nos primeiros minutos e retorna para os valores basais após períodos de estimulação mais longos, figura 8. Resultados semelhantes foram observados por Jiang *et.al* (2011) que relataram que o estímulo hiperosmótico promoveu aumento dos níveis extracelulares de glutamato já no terceiro minuto, permanecendo elevado até o décimo quinto minuto de estímulo. Embora o estímulo hiperosmótico utilizado no referido trabalho tenha sido quimicamente diferente do utilizado em nosso estudo, ambos os resultados apoiam a hipótese de que os astrócitos podem representar importantes células envolvidas no controle hidroeletrólítico no hipotálamo. Os resultados apresentados em nosso estudo vão além do que foi explorado por Jiang et al (2011), pois observamos que a liberação de glutamato pelas células astrocitárias parece sofrer um mecanismo de regulação autócrina considerando que os níveis deste neurotransmissor diminuem significativamente com o tempo mesmo o astrócito estando submetido a ambiente hiperosmótico.

De fato, a liberação de glutamato por astrócitos em meio hipertônico ainda é motivo de discussão. Autores como Verbalis (2010) questionam o fato



de que em condições hiperosmóticas a célula libere o glutamato, já que juntamente com outros aminoácidos e açúcares, este neurotransmissor é considerado um osmólito orgânico. Sendo assim, ao diminuir de volume durante eventos de hipertonicidade, a célula manteria o glutamato no meio intracelular para facilitar o influxo de água, em um processo denominado *Aumento Regulatório de Volume*, cujos mecanismos ainda não estão totalmente elucidados, mas que parecem ser altamente controlados. A resposta bifásica do astrócito mostrada em nossos resultados, revelou que esta célula é capaz de regular a liberação do glutamato em resposta ao estímulo hiperosmótico, havendo em um primeiro momento, uma grande liberação deste neurotransmissor que foi rapidamente suprimida, sugerindo a participação de um mecanismo regulador desta liberação. Em comparação a outros estudos já publicados, tanto a intensidade quanto a duração do estímulo utilizado em nosso trabalho foram menores. Enquanto é comum se encontrar trabalhos utilizando horas ou até mesmo dias de estímulo (ARIEFF; GUISSANO, 1976), encontramos resultados já com cinco minutos de incubação, o que sugere um mecanismo mais refinado do astrócito na resposta ao aumento da osmolaridade do meio extracelular. Isso está de acordo com dados da literatura que mostram que no SON, o estímulo hiperosmótico aumenta a expressão de proteína FOS nas células gliais mas não nos neurônios magnocelulares (LUDWIG et al., 1996). Outro estudo importante que fundamenta nossa hipótese, mostra que a ativação neuronal pelo estímulo hipertônico depende da ativação prévia do astrócito (YUAN et al., 2010). Sugerindo que a resposta do astrócito ao aumento da osmolaridade se dá de forma mais rápida que a do neurônio. E poderia ser, de certa forma mais eficiente, se levarmos em consideração a posição estratégica destas células, as quais têm um contato mais íntimo com os vasos sanguíneos.

De forma geral nossos resultados suportam a hipótese que o astrócito responde ao estímulo hiperosmótico liberando glutamato para o meio extracelular. Esta liberação parece ser regulada negativamente por fatores liberados pelo próprio astrócito. Neste sentido, a literatura demonstra que entre os vários componentes capazes de regular a liberação de glutamato, o sistema purinérgico aparece com considerável destaque. É bem conhecido que

astrócitos liberam tanto adenosina quanto ATP quando estimulados. Assim, procuramos avaliar se o estímulo hiperosmótico seria capaz de induzir a liberação de adenosina em cultura de astrócitos. Considerando que o ATP sofre uma rápida ação de ectonucleotidases e que os astrócitos apresentam uma elevada expressão de receptores purinérgicos do tipo A1, a adenosina quando liberada poderia ser um regulador da liberação de glutamato induzida por estímulo hiperosmótico em astrócitos. De fato, nossos resultados demonstraram pela primeira vez que astrócitos liberam adenosina quando submetidos a ambiente hiperosmótico, sendo esta liberação caracterizada como dependente de sódio (figura 9).

Interessantemente, essa liberação se inicia em dez minutos de estímulo, coincidindo com os tempos em que o glutamato retorna para os valores basais (figura 10). Já é bem descrito na literatura que a adenosina é capaz inibir a liberação de glutamato em diversas condições (ARRIGONI et al., 2001; FIELDS; BURNSTOCK, 2006; LATINI; PEDATA, 2001; TOMÉ; SILVA; CUNHA, 2010). Desta forma, nossos achados nos levaram a sugerir que a adenosina poderia estar sendo liberada pelo astrócito como um mecanismo capaz de conter a liberação do neurotransmissor, permitindo o *input* excitatório sem o risco do fenômeno de excitotoxicidade promovido pelo excesso de glutamato no meio extracelular, ou ainda, para recuperar o volume perdido em decorrência da hipertonicidade do meio como proposto por Verbalis (VERBALIS, 2010).

Assim como o estímulo hiperosmótico o tratamento com glutamato também induziu a liberação de adenosina (figura 11). Com isso, acreditamos que a liberação de adenosina, durante o aumento da osmolaridade do meio, seja resultante da ativação prévia de receptores glutamatérgico que ocorre em cinco minutos quando há liberação de glutamato neste período. Diversas evidências já relatam que a liberação de adenosina pode ser estimulada após tratamento com agonistas glutamatérgicos (ZAMZOW; BOSE; PARKINSON, 2009; ZAMZOW; XIONG; PARKINSON, 2008). Em tecido nervoso retiniano, por exemplo, já foi demonstrado que tanto a ativação de receptores AMPA, como NMDA ou cainato induzem a liberação de purinas (PAES-DE-CARVALHO et al., 2005). No hipocampo e em neurônios corticais a liberação

endógena de adenosina também pôde ser estimulada após ativação de receptores NMDA (CHEN; GRAHAM; STONE, 1992; CRAIG; WHITE, 1993). Embora já tenha sido mostrado que durante longos períodos de privação de água, ocorre um aumento na expressão de receptores NMDA no hipotálamo (MEEKER et al., 1994), em nossos resultados, a incubação com NMDA não exerceu nenhum efeito na liberação de adenosina, figura 14. A expressão de receptores NMDA em astrócitos humanos já foi demonstrada em estudo recente (LEE et al., 2010) no entanto, a presença de receptores NMDA funcionais em astrócito de roedores ainda permanece controversa (DZAMBA; HONSA; ANDEROVA, 2013). Outra possível hipótese que poderia explicar nosso resultado é a de que o receptor envolvido na liberação de adenosina em condições de hiperosmolaridade seja do tipo não NMDA (cainato e AMPA), ou ainda pertencente ao grupo de receptores metabotrópicos de glutamato.

Classicamente a literatura demonstra que o glutamato pode induzir a liberação de ATP tanto em astrócitos humanos (WERRY; LIU; BENNETT, 2006) como no de ratos (JEREMIC et al., 2001). Desta forma, o glutamato liberado pelo estímulo hiperosmótico mostrado em nosso modelo, poderia induzir a liberação do próprio ATP e exercer o mesmo efeito sobre os níveis de glutamato através da ativação do receptor P2Y (MENDOZA-FERNÁNDEZ; ANDREW; BARAJAS-LÓPEZ, 2000) ou ainda, sofrer a ação de ecto-nucleotidases até formar a adenosina, detectada no método de CLAE. Nossos resultados, no entanto, mostraram que o dipiridamol, um inibidor do transportador de nucleosídeo (MEESTER et al., 1998), impediu que os níveis extracelulares de glutamato retornassem aos valores basais à partir do décimo minuto, figura 15, confirmando que o efeito observado sobre o glutamato é, de fato, resultante da ação da adenosina endógena, liberada via transportador, e não do ATP ou de algum produto do seu metabolismo.

Tem sido reportado na literatura que o transportador de adenosina do tipo equilibrativo - ENT (independente de sódio) está muito mais presente no SNC que o do tipo concentrativo - CNT (dependente de sódio), encontrado mais comumente em órgãos como o rim, duodeno, jejuno e íleo (LU et al., 2004). Entretanto, Anderson *et al.* mostraram haver predominantemente a presença de transportadores tipo CNTs dependentes de sódio no hipotálamo

(ANDERSON et al., 1996). Esta evidência se afirmou em nossos resultados, os quais mostraram que a substituição do sódio por manitol nos tampões de incubação, não exerceu nenhum efeito sobre os níveis de adenosina (figura 13), sugerindo que os CNTs podem ter um papel chave na resposta astrocítica durante estímulo hiperosmótico promovido pelo sódio.

Do ponto de vista fisiológico, sabemos que os níveis endógenos de adenosina são capazes de determinar a ativação de um ou de outro receptor. Trabalhos anteriores demonstraram que a adenosina, na concentração utilizada em nossos experimentos ( $0,1\mu\text{M}$ ), tem maior afinidade por receptores do tipo A1 (CUNHA, 2001), desta forma, o efeito inibitório mostrado em nossos resultados, figura 14, se reafirma em inúmeros estudos que têm associado a ativação deste receptor a efeitos pré-sinápticos que levam à diminuição da liberação de glutamato (LINDEN, 1991). Em astrócitos do hipotálamo, este receptor vem sendo associado ao controle da ingestão de alimentos. Recentemente, foi proposto que estas células funcionariam como uma espécie de interruptor que controlaria o comportamento de busca por alimentos, aparentemente por meio da variação dos níveis extracelulares de adenosina que, através do receptor A1, modularia neurônios AGRP (*Agouti-related protein*) no núcleo arqueado hipotâmico, uma população de neurônios que liberam o Neuropeptídeo Y, associado à sensação de fome (YANG; QI; YANG, 2015).

A ativação específica de receptores A1 através da incubação com R-PIA em nosso modelo (figura 17), impediu a liberação de glutamato mediada pelo estímulo hiperosmótico, assim como o uso do antagonista A1, CPT, mostrado na figura 18, fez com que o glutamato fosse continuamente liberado para o meio extracelular durante os períodos de estímulo. Juntos, esses dados nos mostram que o astrócito tem um papel fundamental na resposta ao aumento da osmolaridade do compartimento extracelular, através da liberação de glutamato, capaz de estimular a liberação de adenosina. Esta, por sua vez, atua em receptores do tipo A1, promovendo a diminuição da liberação deste neurotransmissor. Vê-se aí, um claro efeito de retro regulação negativa no astrócito que pode ter sido por muito tempo negligenciado.

Uma vez observado o papel do astrócito na resposta ao estímulo hiperosmótico no hipotálamo, verificamos se este efeito se reproduzia em outras regiões do cérebro, utilizando o mesmo estímulo em uma cultura de astrócitos corticais. Nossos resultados mostraram que após o estímulo hiperosmótico, o astrócito do córtex encefálico, não liberou nem glutamato nem adenosina em nenhum dos tempos analisados, figuras (19 e 20). O que nos levou a sugerir que o astrócito hipotalâmico possa ter especialização funcional na resposta ao estímulo hiperosmótico. Essa especialização astrocítica já vem sendo descrita alguns em estudos. Kasymov *et al.*, (2013), por exemplo, mostraram que o astrócito do tronco cerebral e do córtex apresentam padrões diferentes na resposta às mudanças de pH. Eles notaram que em pH baixo, o astrócito proveniente do tronco cerebral aumenta a exocitose de vesículas contendo ATP, enquanto que os do córtex não são afetados pela acidificação do meio extracelular. Além disso, a diversidade fenotípica do astrócito pode ser resultado do próprio microambiente em que estas células se desenvolveram. Ao contrário do córtex, o hipotálamo apresenta regiões ricas em capilares fenestrados, que faz com que as células ali presentes tenham um contato mais íntimo com a corrente sanguínea e, por este motivo, tenham desenvolvido a capacidade de responder mais facilmente a mudanças ocorridas no plasma. Ainda neste contexto, considerando que em nosso método utilizamos células de ratos recém-nascidos, podemos inferir que o astrócito do hipotálamo já apresenta, desde então, a programação bioquímica necessária para responder a diferenças na osmolaridade dos fluidos, uma vez que não utilizamos qualquer fator que induzisse a especialização destas células.

Nossos resultados podem apoiar a hipótese defendida por alguns pesquisadores de que a célula osmorreceptora seja na verdade o astrócito, ao invés do neurônio. Alguns estudos já fazem referência à presença de células gliais especializadas, chamadas tanicitos, que têm a morfologia intermediária entre um astrócito e uma célula ependimária e que podem, segundo algumas publicações, estar relacionadas com o controle da alimentação e do balanço energético (BOLBOREA; DALE, 2013). Mais interessante ainda, há estudos propondo que estas células possuem características de quimiossensores, capazes de responder a variações da concentração de glicose, por exemplo, e

transmitir sinais para rede de conexões neurais hipotalâmicas e assim modular suas operações (RODRÍGUEZ et al., 2005). Embora não tenhamos feito nenhum estudo imunocitoquímico, o qual pudesse identificar se as células astrocíticas utilizadas em nosso trabalho, tinham alguma característica de tanicito, os diferentes resultados obtidos nos experimentos com córtex e hipotálamo, sugerem que a resposta ao aumento da osmolaridade mediado pelo sódio pode ser de uma célula especializada presente unicamente no hipotálamo.

## 6 Conclusões

A partir de nossos resultados pudemos concluir que o astrócito é capaz de responder ativamente ao aumento da osmolaridade extracelular, através da liberação de glutamato, que por sua vez pode induzir a liberação de adenosina, de maneira sódio dependente, e esta ativar receptores  $A_1$  presentes no próprio astrócito, que através de uma via inibitória restabelece os níveis de glutamato para valores basais.

## 7 REFERENCAIS

AGULHON, C. et al. What Is the Role of Astrocyte Calcium in Neurophysiology ? **Neuron**, v. 59, n. 6, p. 932–946, 2008.

ANDERSON, C. M. et al. Demonstration of the existence of mRNAs encoding N1/cif and N2/cit sodium/nucleoside cotransporters in rat brain. **Molecular Brain Research**, v. 42, n. 2, p. 358–361, 1996.

ANDERSON, C. M.; SWANSON, R. A. Astrocyte glutamate transport: Review of properties, regulation, and physiological functions . **Glia**, v. 32, n. 1, p. 1–14, 1 out. 2000.

ANTUNES-RODRIGUES, J. et al. Neuroendocrine control of body fluid metabolism. **Physiological reviews**, v. 84, n. 1, p. 169–208, jan. 2004.

ANVISA. **Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003**, 2010.

ARIEFF, A. I.; GUISSADO, R. Effects on the central nervous system of hypernatremic and hyponatremic states. **Kidney international**, v. 10, n. 1, p. 104–116, 1976.

ARRIGONI, E. et al. Adenosine-mediated presynaptic modulation of glutamatergic transmission in the laterodorsal tegmentum. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 21, n. 3, p. 1076–85, 1 fev. 2001.

BIBER, K. et al. Adenosine A1 receptor-mediated activation of phospholipase C in cultured astrocytes depends on the level of receptor expression. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 17, n. 13, p. 4956–64, 1 jul. 1997.

BJÖRKLUND, O. et al. Adenosine A1 and A3 receptors protect astrocytes from hypoxic damage. **European journal of pharmacology**, v. 596, n. 1-3, p. 6–13, 31 out. 2008.

BOLBOREA, M.; DALE, N. Hypothalamic tanycytes : potential roles in the control of feeding and energy balance. **Trends in Neurosciences**, v. 36, n. 2,



p. 91–100, 2013.

BOURQUE, C. W. Central mechanisms of osmosensation and systemic osmoregulation. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 9, p. 519–531, 2008.

BRIDGES, R. J.; NATALE, N. R.; PATEL, S. A. System xc- cystine/glutamate antiporter: an update on molecular pharmacology and roles within the CNS. **British journal of pharmacology**, v. 165, n. 1, p. 20–34, jan. 2012.

BRUSILOW, S. W. et al. Astrocyte Glutamine Synthetase in Hyperammonemic Syndromes Potential Target For Therapy. **Neurotherapeutics**, v. 7, n. 6, p. 452–470, 2010.

BUSNARDO, C. et al. Ionotropic glutamate receptors in hypothalamic paraventricular and supraoptic nuclei mediate vasopressin and oxytocin release in unanesthetized rats. **Endocrinology**, v. 153, n. 5, p. 2323–31, maio 2012.

CAO, R. et al. Hypertonic stimulation induces synthesis and release of glutamate in cultured rat hypothalamic astrocytes and C6 cells. **Neuroscience bulletin**, v. 24, n. 6, p. 359–66, dez. 2008.

CAUDLE, W. M.; ZHANG, J. Glutamate, excitotoxicity, and programmed cell death in Parkinson disease. **Experimental neurology**, v. 220, n. 2, p. 230–3, dez. 2009.

CHEN, Y.; GRAHAM, D. I.; STONE, T. W. Release of endogenous adenosine and its metabolites by the activation of NMDA receptors in the rat hippocampus in vivo. p. 632–638, 1992.

COHEN-KASHI-MALINA, K.; COOPER, I.; TEICHBERG, V. I. Mechanisms of glutamate efflux at the blood-brain barrier: involvement of glial cells. **Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 32, n. 1, p. 177–89, jan. 2012.

CRAIG, C. G.; WHITE, T. D. NMDA-evoked adenosine release from rat cortex does not require the intermediate formation of nitric oxide. **Neuroscience letters**, v. 158, n. 2, p. 167–9, 20 ago. 1993.

CUNHA, R. A. Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. **Neurochemistry international**, v. 38, n. 2, p. 107–25, fev. 2001.

CURRÁS-COLLAZO, M. C.; DAO, J. Osmotic activation of the hypothalamo-neurohypophysial system reversibly downregulates the NMDA receptor subunit, NR2B, in the supraoptic nucleus of the hypothalamus. **Brain research. Molecular brain research**, v. 70, n. 2, p. 187–96, 5 jul. 1999.

CURRIE, D. N.; KELLY, J. S. Glial versus neuronal uptake of glutamate. **The Journal of experimental biology**, v. 95, p. 181–93, dez. 1981.

DANBOLT, N. C. Glutamate uptake. **Progress in neurobiology**, v. 65, n. 1, p. 1–105, set. 2001.

DEHNES, Y. et al. The glutamate transporter EAAT4 in rat cerebellar Purkinje cells: a glutamate-gated chloride channel concentrated near the synapse in parts of the dendritic membrane facing astroglia. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 18, n. 10, p. 3606–19, 15 maio 1998.

DELGADO, T. C. Glutamate and GABA in Appetite Regulation. **Frontiers in endocrinology**, v. 4, n. August, p. 103, jan. 2013.

DIXON, K. et al. Tissue distribution of adenosine receptor mRNAs in the rat. *n. l* 996, 1996.

DUAN, S. et al. Glutamate induces rapid upregulation of astrocyte glutamate transport and cell-surface expression of GLAST. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 19, n. 23, p. 10193–200, 1 dez. 1999.

DZAMBA, D.; HONSA, P.; ANDEROVA, M. NMDA Receptors in Glial Cells: Pending Questions. **Current neuropharmacology**, v. 11, n. 3, p. 250–62, 2013.

FDA. Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation. In: [s.l: s.n.].

FEOKTISTOV, I.; BIAGGIONI, I. Adenosine A<sub>2B</sub> Receptors. **Pharmacological reviews**, v. 49, n. 4, p. 381–402, 1997.

FIELDS, R. D.; BURNSTOCK, G. Purinergic signalling in neuron-glia interactions. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 7, n. 6, p. 423–436, 2006.

FRANSEN, R.; KOOMANS, A. Adenosine and renal Sodium Handling: Direct Natriuresis and Renal Nerve-Mediated Antinatriuresis. **Journal of the American Society of Nephrology : JASN**, p. 1491–1497, 1995.

FREDHOLM, B. B. et al. International Union of Pharmacology . XXV . Nomenclature and Classification of Adenosine Receptors. v. 53, n. 4, p. 527–552, 2001.

FREDHOLM, B. B. Adenosine receptors as drug targets. **Exp Cell Res**, v. 316, n. 8, p. 1284–1288, 2010.

GONZÁLEZ, M. I.; KAZANIETZ, M. G.; ROBINSON, M. B. Regulation of the neuronal glutamate transporter excitatory amino acid carrier-1 (EAAC1) by different protein kinase C subtypes. **Molecular pharmacology**, v. 62, n. 4, p. 901–10, out. 2002.

HAMILTON, N. B.; ATTWELL, D. Do astrocytes really exocytose neurotransmitters? **Nature reviews. Neuroscience**, v. 11, n. 4, p. 227–38, abr. 2010.

HUANG, W.; LEE, S. L.; SJOQUIST, M. Natriuretic role of endogenous oxytocin in male rats infused with hypertonic NaCl. v. 268, n. 3, p. R634–R640, 1 mar. 1995.

HUSSY, N. et al. Osmotic regulation of neuronal activity: a new role for taurine and glial cells in a hypothalamic neuroendocrine structure. **Progress in neurobiology**, v. 62, n. 2, p. 113–34, out. 2000.

IREMONGER, K. J.; BENEDIKTSSON, A. M.; BAINS, J. S. Glutamatergic synaptic transmission in neuroendocrine cells : Basic principles and mechanisms of plasticity. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 31, n. 3, p. 296–306, 2010.

JACKSON, E. K. et al. Characterization of Renal Ecto-Phosphodiesterase. **Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 321, n. 2, p. 810–815, 2007.

JEREMIC, A. et al. ATP stimulates calcium-dependent glutamate release from cultured astrocytes. **Journal of Neurochemistry**, v. 77, n. 2, p. 664–675, 2001.

JIANG, J.; AMARA, S. G. New views of glutamate transporter structure and function: advances and challenges. **Neuropharmacology**, v. 60, n. 1, p. 172–81, jan. 2011.

JIANG, S. et al. Glutamate release through connexin 43 by cultured astrocytes in a stimulated hypertonicity model. **Brain research**, v. 1392, p. 8–15, 25 maio 2011.

JOHNSON, A K.; THUNHORST, R. L. The neuroendocrinology of thirst and salt appetite: visceral sensory signals and mechanisms of central integration. **Frontiers in neuroendocrinology**, v. 18, n. 3, p. 292–353, jul. 1997.

KANE, R. L. O. et al. Na<sup>+</sup>-dependent Glutamate Transporters (EAAT1, EAAT2, and EAAT3) of the Blood-Brain Barrier: A MECHANISM FOR GLUTAMATE REMOVAL. **J. Biol. Chem**, n. 274, p. 91–95, 1999.

KASYMOV, V. et al. Differential sensitivity of brainstem versus cortical astrocytes to changes in pH reveals functional regional specialization of astroglia. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 33, n. 2, p. 435–41, 2013.

KETTENMANN, H.; VERKHRATSKY, A. Neuroglia: the 150 years after. **Trends in neurosciences**, v. 31, n. 12, p. 653–9, dez. 2008.

KEW, J. N. C.; KEMP, J. A. Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. **Psychopharmacology**, n. 179, p. 4–29, 2005.

KUO, J.; HARIRI, O.; MICEVYCH, P. An Interaction of Oxytocin Receptors with Metabotropic Glutamate Receptors in Hypothalamic Astrocytes. **journal of Neuroendocrinology**, v. 21, n. 12, p. 1001–1006, 2010.

LATINI, S.; PEDATA, F. Adenosine in the central nervous system: release

mechanisms and extracellular concentrations. **Journal of neurochemistry**, v. 79, n. 3, p. 463–84, nov. 2001.

LEE, M.-C. et al. Characterisation of the expression of NMDA receptors in human astrocytes. **PloS one**, v. 5, n. 11, p. e14123, jan. 2010.

LEE, S.-Y.; HAYDON, P. G. Astrocytic glutamate targets NMDA receptors. **The Journal of physiology**, v. 581, n. Pt 3, p. 887–8, 15 jun. 2007.

LI, X. X. et al. Adenosine enhances glial glutamate efflux via A2a adenosine receptors. **Life sciences**, v. 68, n. 12, p. 1343–50, 9 fev. 2001.

LIANG, B. T.; JACOBSON, K. A. A physiological role of the adenosine A3 receptor: sustained cardioprotection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 12, p. 6995–9, 9 jun. 1998.

LIEN, Y. H.; SHAPIRO, J.; CHAN, L. Effects of Hypernatremia on Organic Brain Osmoles. v. 85, n. May, p. 1427–1435, 1990.

LIGUZ-LECZGAR, M.; SKANGIEL-KRAMSKA, J. Vesicular glutamate transporters (VGLUTs): the three musketeers of glutamatergic system. **Acta neurobiologiae experimentalis**, v. 67, n. 3, p. 207–18, jan. 2007.

LINDEN, J. Structure and function of A1 Adenosine receptors. **The FASEB Journal**, v. 5, p. 2668–2676, 1991.

LOVATT, D. et al. Neuronal adenosine release, and not astrocytic ATP release, mediates feedback inhibition of excitatory activity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 16, p. 6265–70, 17 abr. 2012.

LU, H. et al. Tissue Distribution of Concentrative and Equilibrative Nucleoside Transporters in Male and Female Rats and Mice. v. 32, n. 12, p. 1455–1461, 2004.

LUDWIG, M. et al. Direct hypertonic stimulation of the rat supraoptic nucleus increases c-fos expression in glial cells rather than magnocellular neurones. **Cell and Tissue Research**, v. 287, n. 1, p. 79–90, 1996.

MACKIEWICZ, M. et al. Enzymes of adenosine metabolism in the brain: diurnal rhythm and the effect of sleep deprivation. **Journal of Neurochemistry**, v. 85, n. 2, p. 348–357, 1 abr. 2003.

MAKI, R.; ROBINSON, M. B.; DICHTER, M. A. The glutamate uptake inhibitor L-trans-pyrrolidine-2,4-dicarboxylate depresses excitatory synaptic transmission via a presynaptic mechanism in cultured hippocampal neurons. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 14, n. 11 Pt 1, p. 6754–62, dez. 1994.

MALARKEY, E. B. & V. P. Mechanisms of glutamate release from astrocytes. **Neurochemistry international**, v. 52, n. 951, p. 142–154, 2009.

MART, E. D. et al. Adenosine Released by Astrocytes Contributes to Hypoxia-Induced Modulation of Synaptic Transmission. **Glia**, v. 45, p. 36–45, 2007.

MASSON, J. et al. Neurotransmitter Transporters in the Central. **American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 51, n. 3, p. 439–464, 1999.

MATYASH, V.; KETTENMANN, H. Heterogeneity in astrocyte morphology and physiology. **Brain research reviews**, v. 63, n. 1-2, p. 2–10, maio 2010.

MCCANN, S. M.; GUTKOWSKA, J.; ANTUNES-RODRIGUES, J. Neuroendocrine control of body fluid homeostasis. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica ... [et al.]**, v. 36, n. 2, p. 165–81, fev. 2003.

MCKINLEY, M. J. et al. Central osmoregulatory influences on thermoregulation. **Clinical and experimental pharmacology & physiology**, v. 35, n. 5-6, p. 701–5, maio 2008.

MEEKER, R. B. et al. Increased Hypothalamic Glutamate Receptors Induced by Water Deprivation. **Neuroendocrinology**, v. 60, n. 5, p. 477–485, 1994.

MEESTER, B. J. et al. Pharmacological analysis of the activity of the adenosine uptake inhibitor, dipyridamole, on the sinoatrial and atrioventricular nodes of the

guinea-pig. **British journal of pharmacology**, v. 124, n. 4, p. 729–741, 1998.

MENDOZA-FERNÁNDEZ, V.; ANDREW, R. D.; BARAJAS-LÓPEZ, C. ATP inhibits glutamate synaptic release by acting at P2Y receptors in pyramidal neurons of hippocampal slices. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 293, n. 1, p. 172–179, 2000.

MORSETTE, D. J. et al. Role of metabotropic glutamate receptors in vasopressin and oxytocin release. **Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol**, v. 281, n. R452-R458, 2012.

MOTHET, J.-P. et al. Glutamate receptor activation triggers a calcium-dependent and SNARE protein-dependent release of the gliotransmitter D-serine. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 15, p. 5606–11, 12 abr. 2005.

NANAO, M. H. et al. Structure of the kainate receptor subunit GluR6 agonist-binding domain complexed with domoic acid. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 5, p. 1708–13, 1 mar. 2005.

NI, Y.; PARPURA, V. Dual regulation of Ca<sup>2+</sup>-dependent glutamate release from astrocytes: vesicular glutamate transporters and cytosolic glutamate levels. **Glia**, v. 57, n. 12, p. 1296–305, set. 2009.

NISWENDER, C. M.; CONN, P. J. METABOTROPIC GLUTAMATE RECEPTORS: PHYSIOLOGY, PHARMACOLOGY AND DISEASE. **Ann Rev Pharmacol Toxicol**, n. 50, p. 295–322, 2010.

OBRIETAN, K. et al. Adenosine pre- and postsynaptic modulation of glutamate-dependent calcium activity in hypothalamic neurons. **journal of neurop**, v. 74, n. 5, p. 2150–2162, 1 nov. 1995.

OLANREWAJU, H. A et al. Adenosine A(2A) and A(2B) receptors in cultured human and porcine coronary artery endothelial cells. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 279, n. 2, p. H650–6, ago. 2000.

OLIVEIRA, K. R. M. et al. Pharmacological characterization of glutamate Na<sup>+</sup>-independent transport in retinal cell cultures: Implications in the glutathione metabolism. **Neurochemistry International**, v. 56, n. 1, p. 59–66, jan. 2010.

PAES-DE-CARVALHO, R. et al. Activation of glutamate receptors promotes a calcium-dependent and transporter-mediated release of purines in cultured avian retinal cells: possible involvement of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. **Neurochemistry international**, v. 46, n. 6, p. 441–51, maio 2005.

PAGEAU, K. et al. Glutamine Synthetase-Glutamate Synthase Pathway and Glutamate Dehydrogenase Play Distinct Roles in the Sink-Source Nitrogen Cycle in Tobacco 1. v. 140, n. February, p. 444–456, 2006.

PAL, N. VAN DEN; TROMBLEY, P. Q.; HAVEN, N. Glutamate Neurons in Hypothalamus Transmission Regulate Excitatory. v. 13, n. July, 1993.

PARDO, B. et al. Brain glutamine synthesis requires neuronal-born aspartate as amino donor for glial glutamate formation. **Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 31, n. 1, p. 90–101, jan. 2011.

PARPURA, V.; GRUBIŠIĆ, V.; VERKHRATSKY, A. Ca(2<sup>+</sup>) sources for the exocytotic release of glutamate from astrocytes. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1813, n. 5, p. 984–91, maio 2011.

PLESNER, L. Ecto-ATPases: Identities and Functions. **International Review of Cytology**, v. Volume 158, p. 141–214, 1995.

RAMSAY, D. J. The importance of thirst in maintenance of fluid balance. **BAILLIERS CLINICAL ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM**, v. 3, n. 2, p. 371–391, 1989.

REBOLA, N. et al. Decrease of adenosine A1 receptor density and of adenosine neuromodulation in the hippocampus of kindled rats. **European Journal of Neuroscience**, v. 18, n. 4, p. 820–828, ago. 2003.

REBOLA, N. et al. Different roles of adenosine A1, A2A and A3 receptors in



controlling kainate-induced toxicity in cortical cultured neurons.

**Neurochemistry International**, v. 47, n. 5, p. 317–325, out. 2005.

REES, D. A.; SCANLON, M. F.; HAM, J. Adenosine signalling pathways in the pituitary gland: one ligand, multiple receptors. **The Journal of endocrinology**, v. 177, n. 3, p. 357–64, jun. 2003.

RIBANI, M. et al. VALIDAÇÃO EM MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS E ELETROFORÉTICOS. In: **Quim. Nova**. [s.l: s.n.]. v. 27p. 771–780.

RIEDEL, G.; PLATT, B.; MICHEAU, J. Glutamate receptor function in learning and memory. v. 140, 2003.

RODRÍGUEZ, E. M. et al. Hypothalamic tanycytes: a key component of brain-endocrine interaction. **International review of cytology**, v. 247, p. 89–164, jan. 2005.

ROSSETTO, O. et al. Tetanus and botulinum neurotoxins : turning bad guys into good by research. **Toxicon**, v. 39, p. 27 41, 2001.

SCHOUSBOE, A.; WAAGEPETERSEN, H. S. Role of astrocytes in glutamate homeostasis: implications for excitotoxicity. **Neurotoxicity research**, v. 8, n. 3-4, p. 221–5, nov. 2005.

SCHULTE, G.; FREDHOLM, B. B. Human Adenosine A1, A2A, A2B, and A3 Receptors Expressed in Chinese Hamster Ovary Cells All Mediate the Phosphorylation of Extracellular-Regulated Kinase 1/2. **Molecular pharmacology**, v. 58, n. 3, p. 477–82, out. 2000.

SCHULTE, G.; FREDHOLM, B. B. Diverse inhibitors of intracellular signalling act as adenosine receptor antagonists. **Cellular signalling**, v. 14, n. 2, p. 109–13, fev. 2002.

SHAHRAKI, A.; STONE, T. W. Interactions between adenosine and metabotropic glutamate receptors in the rat hippocampal slice. **British journal of pharmacology**, v. 138, n. 6, p. 1059–68, mar. 2003.

SHIGERI, Y.; SEAL, R. P.; SHIMAMOTO, K. Molecular pharmacology of glutamate transporters, EAATs and VGLUTs. **Brain Research Reviews**, v. 45,

n. 3, p. 250–265, jul. 2004.

SHIMAMOTO, K. et al. DL-threo-b-Benzoyloxyaspartate, A Potent Blocker of Excitatory Amino Acid Transporters. **Molecular pharmacology**, v. 201, p. 195–201, 1998.

SIMARD, M.; NEDERGAARD, M. The neurobiology of glia in the context of water and ion homeostasis. **Neuroscience**, v. 129, n. 4, p. 877–96, jan. 2004.

SIRAGY, H. M.; LINDEN, J. Sodium Intake Markedly Alters Renal Interstitial Fluid Adenosine. **Hypertension**, v. 27, n. 3, p. 404–407, 1 mar. 1996.

SPERLÁGH, B.; VIZI, E. S. The Role of Extracellular Adenosine in Chemical Neurotransmission in the Hippocampus and Basal Ganglia : Pharmacological and Clinical Aspects. p. 1034–1046, 2011.

STRICKER, E. M.; HOFFMANN, M. L. Presystemic signals in the control of thirst , salt appetite , and vasopressin secretion. v. 91, p. 404–412, 2007.

THORN, J. A; JARVIS, S. M. Adenosine transporters. **General pharmacology**, v. 27, n. 4, p. 613–620, 1996.

TOMÉ, Â. R.; SILVA, H.; CUNHA, R. A. Role of The Purinergic Neuromodulation System in Epilepsy. p. 64–83, 2010.

VAN DEN HEUVEL, R. H. H. et al. Glutamate synthase: a fascinating pathway from L-glutamine to L-glutamate. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 61, n. 6, p. 669–81, mar. 2004.

VERBALIS, J. G. How does the brain sense osmolality? **Journal of the American Society of Nephrology : JASN**, v. 18, n. 12, p. 3056–9, dez. 2007.

VERBALIS, J. G. Brain volume regulation in response to changes in osmolality. **Neuroscience**, v. 168, n. 4, p. 862–70, 28 jul. 2010.

VOISIN, D. L.; BOURQUE, C. W. Integration of sodium and osmosensory signals in vasopressin neurons. **Trends in neurosciences**, v. 25, n. 4, p. 199–205, abr. 2002.

WARDAS, J. NEUROPROTECTIVE ROLE OF ADENOSINE IN THE CNS.

**Polish Journal of Pharmacology**, p. 313–326, 2002.

WATKINS, J. C.; JANE, D. E. The glutamate story. **British journal of pharmacology**, v. 147, p. 100–108, 2006.

WERRY, E. L.; LIU, G. J.; BENNETT, M. R. Glutamate-stimulated ATP release from spinal cord astrocytes is potentiated by substance P. **Journal of Neurochemistry**, v. 99, n. 3, p. 924–936, 2006.

YANG, L.; QI, Y.; YANG, Y. Astrocytes Control Food Intake by Inhibiting AGRP Neuron Activity via Adenosine A1 Receptors. **Cell Reports**, v. 11, n. 5, p. 798–807, 2015.

YUAN, H. et al. Acute hyperosmotic stimulus-induced Fos expression in neurons depends on activation of astrocytes in the supraoptic nucleus of rats. **Journal of neuroscience research**, v. 88, n. 6, p. 1364–73, 1 maio 2010.

ZAMZOW, C. R.; BOSE, R.; PARKINSON, F. E. N-methyl-D-aspartate-evoked Adenosine and inosine release from neuron requires extracellular calcium. **Neurochemical research**, v. 1, n. 87, p. 850–858, 2009.

ZAMZOW, C. R.; XIONG, W.; PARKINSON, F. E. Adenosine produced by neurons is metabolized to hypoxanthine by astrocytes. **Journal of Neuroscience Research**, v. 86, n. 15, p. 3447–3455, 2008.

ZIMMERMAN, T. P. et al. Adenosine analogs as substrates and inhibitors of S-adenosylhomocysteine hydrolase in intact lymphocytes. **Biochemistry**, v. 19, n. 10, p. 2252–2259, 1 maio 1980.

## Anexo I

### Validação da quantificação de Adenosina pelo método de CLAE

#### 1. Resultados

##### ❖ Tempo de Retenção

O tempo no qual o pico gerado pela injeção de adenosina no sistema CLAE foi entre 3 e 5 minutos. No total a corrida foi de 10 minutos e representou o tempo que o nucleosídeo ficou no sistema cromatográfico, quer na fase móvel quer na fase estacionária.

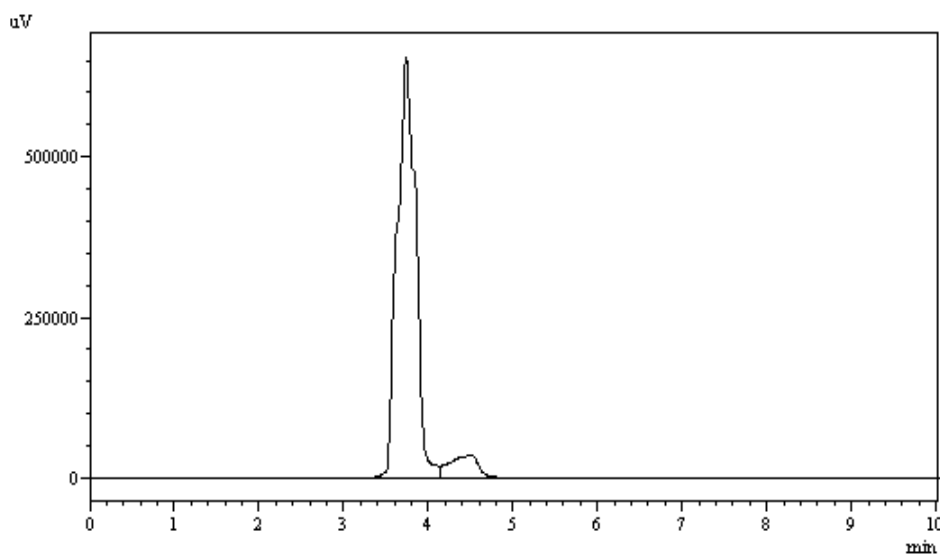


Figura 1 Cromatograma ilustrando o pico de adenosina gerado após a injeção de uma amostra padrão

### ❖ Seletividade

Para quantificar um determinado analito em diferentes tipos de amostras que, por vezes, podem ser bastante complexas e possuírem na sua constituição espécies interferentes, é muito importante averiguar se o método de análise que vai ser utilizado é seletivo para o analito em questão. Para isso, comparamos os cromatogramas de injeções apenas do tampão de incubação utilizado nos experimentos (HANK 300 mOsm/L), com um cromatograma do padrão de adenosina diluído neste tampão. Onde A, representa a altura do pico de adenosina, quando injetamos 2.5 µg do padrão solubilizado no tampão HANK, e B a altura de qualquer pico, no mesmo tempo de retenção da adenosina, quando injetamos apenas o tampão.

A	B
11540	-
12988	-
10769	-

*Tabela 1 – Altura do pico gerado após a injeção do padrão de adenosina (A) e do solvente HANK (B)*

Uma vez que a injeção apenas do tampão HANK, não gerou nenhum pico no mesmo tempo de retenção para adenosina, podemos dizer que nosso método é seletivo para este analito.

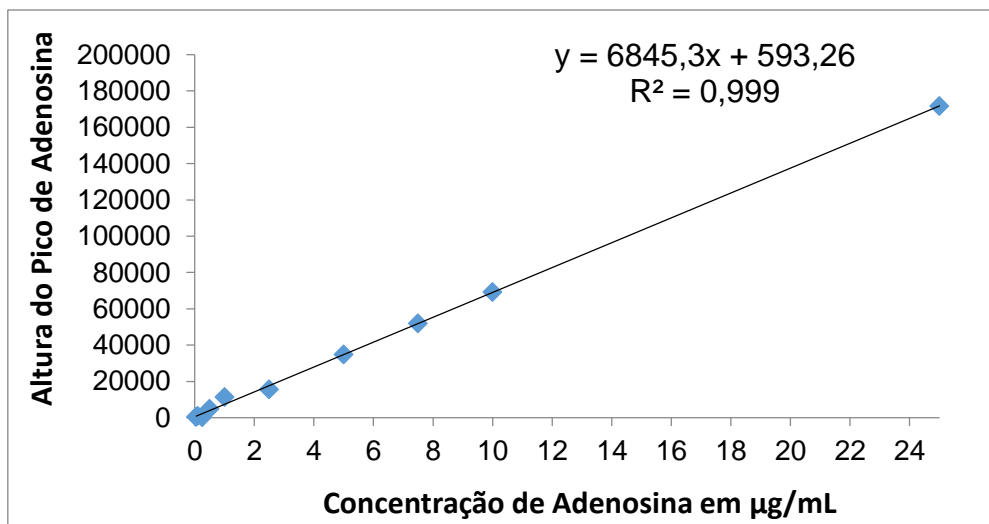
### ❖ Linearidade da curva de calibração

Para a avaliação da linearidade, realizamos uma curva de calibração que permitiu estabelecer a relação entre o sinal medido (altura do pico) e a concentração do na solução padrão de adenosina.

<b>Adenosina µg/mL</b>	<b>Média da Altura do Cromatograma</b>
0,05	379
0,1	949
0,25	2847
0,5	5691
1	11399
2,5	15540
5	34907
7,5	51995
10	69274
25	17163

*Tabela 1 – Diferentes concentrações de Adenosina injetados no Sistema CLAE e a respectiva média da altura do pico do cromatograma correspondente.*

Matematicamente, a estimativa dos coeficientes de uma curva analítica a partir de um conjunto de medições experimentais pode ser efetuada usando o método matemático conhecido como regressão linear. Além dos coeficientes de regressão, também é possível calcular, a partir dos pontos experimentais, o coeficiente de correlação ( $r$ ). Este parâmetro permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1.0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. Um coeficiente de correlação maior que 0.999 é considerado como evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão. A ANVISA recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99 e o INMETRO um valor acima de 0.90 (RIBANI et al., 2004). Em nossos resultados, o valor de  $r$  foi de 0.999, o que caracteriza o nosso método de dosagem de adenosina como um método linear.



*Figura 21- Curva de calibração gerada pela injeção seriada dos padrões de adenosina*

#### ❖ Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ)

Neste trabalho optamos por definir como limite de quantificação, o menor ponto da curva de calibração (0.05 µg/mL) e como limite de detecção, 1/3 deste ponto (0.01 µg/mL).

#### ❖ PRECISÃO

Para medir a exatidão do nosso método, utilizamos 3 níveis de concentração do padrão, dosados em quintuplicata em três dias consecutivos.

µg/mL	1º Dia			2º Dia			3º Dia		
	0.1	1	10	0.1	1	10	0.1	1	10
	0,081	1,433	10,034	0,059	1,443	10,125	0,055	1,408	9,525
	0,089	1,519	9,573	0,058	1,402	9,577	0,054	1,544	9,603
	0,084	1,423	9,767	0,058	1,394	10,139	0,054	1,531	9,452
	0,087	1,503	10,139	0,058	1,393	10,060	0,053	1,555	10,111
	0,082	1,552	9,577	0,058	1,421	9,428	0,053	1,530	9,570
MÉDIA	0,085	1,486	9,818	0,058	1,411	9,866	0,054	1,514	9,652
DESVPAD	0,003	0,056	0,260	0,001	0,021	0,337	0,001	0,060	0,262
DPR %	<b>3,9</b>	<b>3,8</b>	<b>2,6</b>	<b>1,1</b>	<b>1,5</b>	<b>3,4</b>	<b>1,7</b>	<b>4,0</b>	<b>2,7</b>

Tabela 2 Valores medidos após a injeção das amostras padrões, nas concentrações de 0.1, 1.0 e 10 µg/mL., das quais obtivemos o desvio padrão relativo (DPR%)

Uma vez, que os valores de DPR não ultrapassaram 5%, como recomendado pela ANVISA, podemos inferir que nosso método é preciso. Desta forma, levando em consideração todos os itens escolhidos para a validação de métodos em HPLC, pudemos assumir que em nosso o estudo, o método para quantificar adenosina foi devidamente validado.