



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

LUANA CARVALHO MARTINS

**O TRANSPORTADOR X_{CC}^- MEDEIA A CAPTAÇÃO DE GLUTAMATO
INDEPENDENTE DE SÓDIO EM CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS GLIAIS
DA CÓCLEA DE CAMUNDONGOS NEONATOS**

BELÉM-PA

2022

LUANA CARVALHO MARTINS

**O TRANSPORTADOR X_{CC}^- MEDEIA A CAPTAÇÃO DE GLUTAMATO
INDEPENDENTE DE SÓDIO EM CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS GLIAIS
DA CÓCLEA DE CAMUNDONGOS NEONATOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular 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.

Orientadora: Prof^a. Dr^a Karen Renata Herculano Matos Oliveira

BELÉM-PA

2022

LUANA CARVALHO MARTINS

**O TRANSPORTADOR X_{CC}^- MEDEIA A CAPTAÇÃO DE GLUTAMATO
INDEPENDENTE DE SÓDIO EM CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS GLIAIS
DA CÓCLEA DE CAMUNDONGOS NEONATOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular 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.

Orientadora: Prof^a. Dr^a Karen Renata Herculano Matos Oliveira

Banca Examinadora:

Prof^a Dr^a Karen Renta Herculano Matos Oliveira (Orientadora)

Prof. Dr. Anderson Manoel Herculano Oliveira da Silva

Prof. Dr. Givago da Silva Souza

RESUMO

A cóclea é um órgão sensorial do sistema auditivo cujas sinapses excitatórias são mediadas por L-Glutamato. Uma vez que o glutamato possui repercussões fisiológicas e patológicas na cóclea, ressalta-se o papel crucial de mecanismos de transporte de glutamato capazes de regular a concentração extracelular desse neurotransmissor a fim de manter a função auditiva. Dentro desse contexto, neste estudo buscamos investigar a atividade e expressão de sistemas de transporte de glutamato em modelo *in vitro* de culturas primárias de células gliais cocleares obtidas de camundongos neonatos da linhagem Balb/C. Para isso, determinamos o transporte de glutamato dependente e independente de sódio por meio de ensaios de captação e liberação de glutamato cujas concentrações extracelulares foram quantificadas por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a um detector de fluorescência. Por fim, as células foram submetidas ao ensaio de imunofluorescência para marcação do transportador de glutamato independente de sódio X_{CG}^- . Em nossos resultados, demonstramos que as células gliais cocleares apresentam um sistema de transporte de glutamato mediado pelo transportador X_{CG}^- . Tais dados sugerem um possível papel deste transportador no controle das concentrações extracelulares de glutamato e regulação do estado redox, que podem auxiliar na preservação da função auditiva.

Palavras-chave: Transporte de glutamato, cóclea, células gliais, sistema X_{CG}^-

SUMMARY

The cochlea is a sensory organ of the auditory system whose excitatory synapses are mediated by L-Glutamate. Since glutamate has physiological and pathological repercussions on the cochlea, the crucial role of glutamate transport mechanisms capable of regulating the extracellular concentration of this neurotransmitter in order to maintain auditory function is highlighted. Within this context, in this study we sought to investigate the activity and expression of glutamate transport systems in an in vitro model of primary cultures of cochlear glial cells obtained from newborn mice of the Balb/C lineage. For this, we determined the sodium dependent and independent glutamate transport by means of glutamate uptake and release assays whose extracellular concentrations were quantified using High Performance Liquid Chromatography coupled to a fluorescence detector. Finally, the cells were subjected to immunofluorescence assay for XCG sodium-independent glutamate transporter labeling. In our results, we demonstrate that cochlear glial cells have a glutamate transport system mediated by the XCG- transporter. Such data suggest a possible role of this transporter in the control of extracellular concentrations of glutamate and regulation of the redox state, which may help to preserve auditory function.

Keywords: glutamate transport, cochlea, glial cells, XCG⁻ system

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: A via auditiva.....	14
Figura 2: Excitotoxicidade mediada por glutamato na via auditiva periférica.....	17
Figura 3: Estrutura e função do transportador X_{CG}^-	21
Figura 4: Esquema representativo dos procedimentos para o ensaio de liberação de glutamato.....	27
Figura 5: Esquema representativo dos procedimentos para o ensaio de captação de glutamato.....	28
Figura 6: Esquema representativo do método para detecção de aminoácidos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) acoplado ao detector de fluorescência.....	27
Figura 7: Fotomicrografia representativa de cultura de células gliais da cóclea.....	32
Figura 8: Avaliação da captação de glutamato na presença e ausência de sódio em cultura de células gliais obtidas do tecido coclear de camundongos neonatos.....	33
Figura 9: Avaliação da atividade diferencial do transporte de glutamato independente de sódio em (A) cultura primária de células gliais cocleares e (B) em cultura primária de astrócitos corticais.....	34
Figura 10: Efeito de α AA na captação de glutamato independente de sódio em células gliais da cóclea.....	35
Figura 11: Efeito de α AA e cisteína na captação de glutamato independente de sódio em células gliais da cóclea.....	36
Figura 12: Efeito da cisteína na liberação de glutamato independente de sódio em células gliais da cóclea.....	37
Figura 12: Células gliais da cóclea marcadas com anticorpo secundário anti-xCT (marcação citoplasmática, verde) e marcação com DAPI (marcação nuclear, azul).....	38

LISTA DE ABREVIÇÕES

4F2HC Subunidade de ancoragem do transportador X_{CG}^- à membrana plasmática

ANOVA Análise de variância
BDNF Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro
Cálcio Ca^{+2}
CGCs Células Gliais da Cóclea
CLAE Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
EAATs Transportadores de Aminoácidos Excitatórios
EROs Espécies Reativas de Oxigênio
GABA Ácido gama-aminobutírico
GlnS Glutamina sintetase
GLAST Transportador de Glutamato e Aspartato
GSH Glutathiona
GS Glutathiona Sintetase
iGluRs Receptores Ionotrópicos de Glutamato
mGluRs Receptores Metabotrópicos de Glutamato
NGE Neurônios do Gânglio Espiral
Ntf3 Neurotrofina 3
NGF Fator de Crescimento do Nervo
SNC Sistema nervoso central
TCA Ácido Tricloroacético
X_{AG}⁻ Transportadores de Glutamato Dependentes de Sódio
X_{CG}⁻ Transportador de Glutamato Independentes de Sódio
xCT Subunidade Transportadora do transportador de cistina e glutamato X_{CG}⁻
γ-GCS Gama-glutamilcisteína sintetase

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me dar saúde para continuar seguindo e me permitir conhecer pessoas incríveis que iluminam minha trajetória.

Agradeço à minha orientadora, Prof^a Dr^a Karen Oliveira, que me inspira todos os dias a buscar mais conhecimento e nunca me deixa esquecer da beleza de fazer ciência. Obrigada por ter me apresentado o método científico, por ter confiado a mim esse 'projeto de vida', e pela admirável dedicação que a senhora tem com todos nós.

Agradeço ao Prof. Dr. Anderson Herculano, por sempre me instigar cientificamente com discussões sobre o projeto e por nos ensinar a ter orgulho de fazer ciência de qualidade na Amazônia.

Aos professores do LNE, em especial à Prof^a Luana Leão, que nos repassou valiosos ensinamentos de bancada e manejo de animais que foram essenciais para obtenção dos resultados deste trabalho.

Aos meus grandes parceiros científicos, Mateus Santos Silva, Sávio Lima Bastos, Caroline Lima, Renato Santos de Lima e Emerson Feio Pinheiro por todas as discussões, ajuda em experimentos e em textos, e acima de tudo pelos momentos de alegria vividos nestes últimos anos.

Agradeço à minha família que, mesmo sem saber direito o que faço, se orgulha sempre pelas minhas conquistas. Em especial, sou eternamente grata à minha mãe Ivana de Santana Carvalho e meu pai Adelzito Barbosa Martins, que foram meus primeiros exemplos de determinação e coragem, e com quem aprendi a sonhar. Espero um dia conseguir retribuir toda a dedicação e esforço que vocês fizeram para que não me faltassem oportunidades.

Ao meu namorado e companheiro de todas as horas, Raphael Mendes, a quem sou muito grata por me acompanhar e me apoiar em todas as atividades acadêmicas que me disponho a fazer, mesmo quando precisa me buscar 23h no laboratório em dia de experimento. Obrigada por acreditar em mim, por sempre celebrar minhas conquistas e me estimular a fazer o melhor que posso, desde que nos conhecemos a vida ficou mais leve.

Agradeço aos meus sogros, Marília Haydée Mendes e Alcides Dias Júnior, por me abrigarem em sua casa quando mais necessitei de um ambiente adequado

para escrever este texto. Obrigada por todo o apoio e momentos agradáveis, espero um dia conseguir retribuí-los.

Agradeço à Ana Ascensão, Brenda Lacerda, Caio Alves, Catarina Pinho, Julieny Cardoso, Maria Clara Barros, Glenda Dias, Mateus Silva, Rodrigo Petry, Sávio Bastos, Thony Mota, Wallacy Morikawa, aos meus amigos de graduação e de vida que se fazem presentes mesmo com as dificuldades de tempo de cada um.

Agradeço à Amanda Cereja, Diana Ferreira, Gabriela Assad, Ingrid Nogueira, Jéssica Azevedo, Kamila Passos, Lara Sousa, Ludmila Rocha, Luiza Zahluth, Pietra Alves, Vinicius Sousa e Vitória Batista, amigos que fiz há mais de 10 anos e que estão comigo até hoje, obrigada por compreenderem a minha ausência em determinados momentos e por sempre se fazerem presentes de alguma forma para me dar apoio e me escutar.

Agradeço à minha melhor amiga, Luanne Lima, por sua amizade, paciência, companheirismo e por sempre me ajudar a ver as coisas da melhor maneira, mesmo quando o cansaço tentava me abater. Obrigada por ser a melhor de todas.

Agradeço ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular, à Universidade Federal do Pará, CNPQ e CAPES por todo apoio acadêmico e financeiro.

Por fim, a todos que participaram de alguma forma participaram deste início de trajetória acadêmica, muito obrigada!

Dedico aos meus pais, Adelziro Barbosa Martins e Ivana de Santana Carvalho. E ao meu avô, Lourenço Carrera de Carvalho (*in memoriam*).

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1. CÉLULAS GLIAIS NO SISTEMA AUDITIVO PERIFÉRICO	12
1.2. NEUROTRANSMISSÃO GLUTAMATÉRGICA E A VIA AUDITIVA	16
2. OBJETIVOS	24
2.1. OBJETIVO GERAL	24
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1 CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS GLIAIS DA CÓCLEA	25
3.2 CULTURA PRIMÁRIA DE ASTRÓCITOS CORTICAIS	25
3.3 DROGAS E REAGENTES	26
3.1. AVALIAÇÃO DO TRANSPORTE DE GLUTAMATO	26
3.1.1. ENSAIO DE LIBERAÇÃO DE GLUTAMATO	26
3.1.2 ENSAIO DE CAPTAÇÃO DE GLUTAMATO	27
3.1.3 DOSAGEM DE GLUTAMATO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)	28
3.2 DOSAGEM DE PROTEÍNA	29
3.3 ENSAIO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA	30
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	30
4. RESULTADOS	31
4.1 CÉLULAS GLIAIS DA CÓCLEA APRESENTAM UM MECANISMO DE CAPTAÇÃO DE GLUTAMATO INDEPENDENTE DE SÓDIO	31
4.2 O TRANSPORTADOR X_{CG}^- MEDEIA O TRANSPORTE DE GLUTAMATO INDEPENDENTE DE SÓDIO EM CÉLULAS GLIAIS DA CÓCLEA	33
4.3 CÉLULAS GLIAIS COCLEARES EXPRESSAM O TRANSPORTADOR DE GLUTAMATO INDEPENDENTE DE SÓDIO X_{CG}^-	36
5. DISCUSSÃO	38
5.1 TRANSPORTE DE GLUTAMATO EM CÉLULAS GLIAIS DA CÓCLEA	38
5.2 ATIVIDADE DIFERENCIAL DO TRANSPORTADOR X_{CG}^-	39
5.3 O TRANSPORTADOR X_{CG}^- MEDEIA O TRANSPORTE DE GLUTAMATO EM CÉLULAS GLIAIS DA CÓCLEA	41
6. CONCLUSÃO	44
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
ANEXO I	58
ANEXO II	59

1. INTRODUÇÃO

O sistema nervoso é formado por dois principais tipos celulares, neurônios e células gliais. Por muito tempo, os neurônios foram reconhecidos como os principais elementos celulares envolvidos na transmissão e processamento da informação neural. Por outro lado, as células gliais eram consideradas somente como células que ofereciam suporte metabólico aos neurônios, sem uma participação ativa na transmissão sináptica. No entanto, os avanços nos estudos das células gliais têm alterado a visão desse tipo celular como coadjuvante no sistema nervoso (ARAQUE; NAVARRETE, 2010a; BARRES, 1989).

No sistema nervoso central (SNC), constituído pelo cérebro e medula espinhal, os principais tipos gliais são os astrócitos e oligodendrócitos. Os astrócitos apresentam-se em maior quantidade no SNC e possuem prolongamentos que interagem de maneira complexa entre os corpos celulares e as fibras neuronais. Por sua vez, os oligodendrócitos são células que envolvem os axônios dos neurônios e tem como principal função a produção de bainha de mielina, que torna possível a transmissão rápida de sinais elétricos no cérebro (ALLEN; LYONS, 2018; BARRES, 2008). As funções das células gliais no SNC têm sido investigadas, principalmente, em relação à sua participação na sinapse. Nesse contexto, Haydon et al (2002) mostraram que as elevações de cálcio nos astrócitos estimulam a liberação de diferentes substâncias neuroativas chamadas gliotransmissores, os quais modulam a excitabilidade neuronal e a transmissão sináptica. De forma semelhante, Perea et al (2005a) mostraram que as células gliais apresentam uma excitabilidade celular mediada por cálcio que pode ser desencadeada através da ativação de receptores de neurotransmissores expressos pelos astrócitos. Em conjunto, esses estudos contribuíram para a introdução do conceito de 'sinapse tripartite', no qual é bem aceito que as células gliais podem sentir, retroalimentar e antecipar eventos bioquímicos mediados por neurotransmissores (ARAQUE; NAVARRETE, 2010b; HAYDON, 2000; PEREA; NAVARRETE; ARAQUE, 2009; PEREA; SUR; ARAQUE, 2014).

Apesar de existir uma extensa literatura que aborda as funções e

implicações fisiológicas e patológicas das células gliais do SNC, são escassas as informações mais detalhadas acerca da neurobiologia das células gliais periféricas (JESSEN, 2004). No Sistema Nervoso Periférico, os principais representantes das células gliais são as Células de Schwann, que envolvem os axônios, junto às Células Satélites que circundam o corpo celular dos neurônios (JESSEN; MIRSKY, 2005; PANNESE, 2010). Por muito tempo, a função predominante atribuída a essas células, sobretudo às células de Schwann, se refere à produção de mielina e ao consequente ajuste fino da transmissão elétrica nas redes neuronais (CHRAST; CASTELO-BRANCO, 2021). Em relação às Células Gliais Satélite, apesar de suas funções serem pouco investigadas, há evidências demonstrando que a ativação desse tipo celular contribui para a fisiopatologia da dor crônica (HANANI; SPRAY, 2020).

Apesar do progresso em relação às células gliais do SNC, em regiões periféricas como no sistema auditivo - onde as células gliais apresentam-se em grande quantidade - ainda faltam evidências que demonstrem a contribuição ativa desses tipos celulares em relação à modulação da neurotransmissão.

1.1. CÉLULAS GLIAIS NO SISTEMA AUDITIVO PERIFÉRICO

O sistema auditivo dispõe de uma via de sinalização ascendente que se inicia com a percepção dos estímulos sonoros pela cóclea na via auditiva periférica, e se propagam pelas vias auditivas centrais até o córtex auditivo, onde as informações sonoras são interpretadas (Figura 1; APPLER; GOODRICH, 2011). O tecido coclear é uma estrutura em formato de espiral envolvida por uma camada óssea que formando três compartimentos preenchidos por fluidos: a escala timpânica, a escala vestibular e a escala média (Dror e Avraham, 2009; Ryan e Bauer, 2016). A cóclea abriga o Órgão de Corti, uma região banhada por endolinfa composta por diversos tipos celulares, entre eles as Células Ciliadas Internas (CCIs) e as Células Ciliadas Externas (CCEs). As CCIs realizam a transdução de estímulos sonoros e propagam o sinal por meio de sinapses aferentes com Neurônios do Gânglio Espiral (NGEs).

Aproximadamente 90-95% dos Neurônios do Gânglio Espiral (NGEs) periféricos são mielinizados pelas células gliais cocleares, representadas pelas

células de Schwann e Células Satélite que envolvem os axônios e corpo celular dos NGEs, respectivamente. Ao longo de toda a via auditiva, os NGEs estão em contato próximo com as células gliais, responsáveis pela produção de várias camadas de mielina fortemente compactadas que são essenciais para a transmissão rápida e sincronizada de potenciais de ação (KOHRMAN et al., 2021). Estudos recentes sugerem que a desregulação das células gliais no nervo auditivo periférico implica em condições patológicas graves como perdas auditivas induzidas por sons de alta intensidade e por perdas auditivas relacionadas à idade (AFFORTIT et al., 2021; AKIL et al., 2015; EL-BADRY; MCFADDEN, 2009; PANGANIBAN et al., 2018; WAN; CORFAS, 2017). Diante disso, são necessárias mais investigações sobre a fisiologia e a possível participação desses tipos celulares na função auditiva em condições fisiológicas ou patológicas.

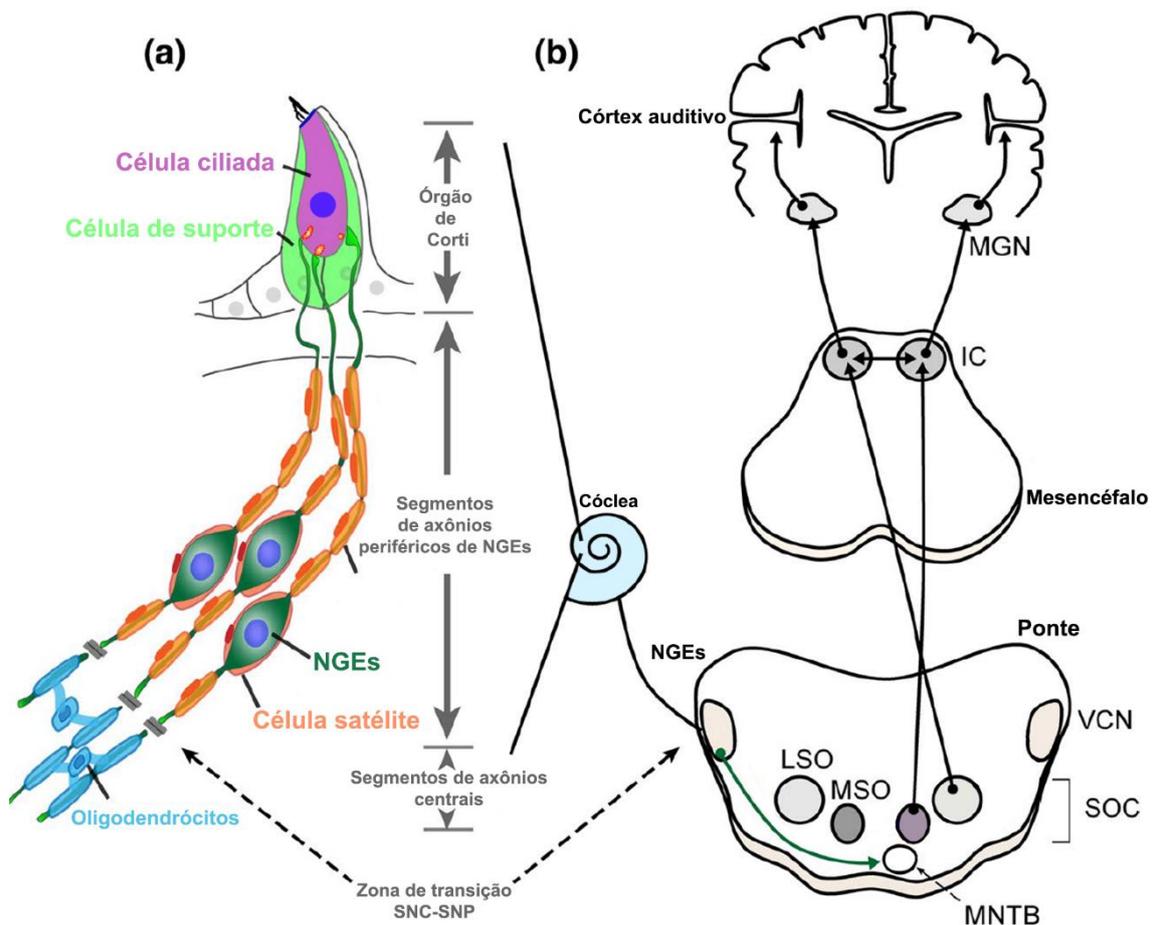


Figura 1: A via auditiva. (a) Representação esquemática do sistema auditivo periférico, incluindo células de suporte próximas a células ciliadas e células gliais associadas a neurônios ganglionares que compõem o nervo auditivo. (b) Representação esquemática da via auditiva central que leva as informações sonoras da cóclea até o córtex. (adaptado de KOHRMAN et al., 2021).

Na cóclea, alguns estudos demonstraram que a perda transitória de células de Schwann mielinizantes podem prejudicar o processamento sonoro (BUDAK et al., 2021; WAN; CORFAS, 2017). O mecanismo pelo qual a perda de células gliais impacta a função auditiva ainda não está elucidado, reforçando a necessidade de investigações que busquem compreender a maquinaria celular associada às células gliais e suas implicações no processamento sonoro.

Além disso, as células de Schwann e células Satélite são importantes para a plasticidade no sistema auditivo. Hurley et al., (2007) mostraram que após a indução de perda de células ciliadas há uma degeneração contínua de NGEs, porém, as células de Schwann que envolvem esses neurônios

apresentam a capacidade de se desdiferenciar e re-mielinizar novos NGEs. De modo semelhante, Wise et al., (2017) demonstraram que a desdiferenciação das Células de Schwann após injúria, foi acompanhada pela formação de processos gliais que apresentavam prolongamentos que se estendiam aparentemente em uma tentativa de interagir com NGEs residuais. Em outros gânglios sensoriais, já foi visto que as células satélites também são capazes de se regenerar e induzir a proliferação espontânea e regeneração de células satélites, no entanto esse papel não é tão claro no sistema auditivo periférico (AVRAHAM et al., 2020). Nesse contexto, essa capacidade de recuperação rápida dos nervos periféricos após injúrias denota a plasticidade das células de Schwann e mostra a interação complexa entre as células gliais e os axônios de NGEs.

Somado a isso, estudos mais recentes destacam um papel crucial das Células de Schwann para o desenvolvimento de NGEs, uma vez que estão envolvidas na migração, maturação e sobrevivência neuronal. As células de Schwann produzem inerentemente pequenas quantidades de fatores neurotróficos, incluindo as neurotrofinas BDNF, Ntf3, neurotrofina-4/5 e NGF para promover ou garantir a sobrevivência neuronal (HANSEN, et al., 2001; MATTHEW J. PROVENZANO, SARAH A. MINNER, KAITLIN ZANDER, J. JASON CLARK, CATHERINE J. KANE, STEVEN H. GREEN, 2012; PETTINGILL; MINTER; SHEPHERD, 2008). Nesse contexto, Whitlon et al., (2009) observaram que as células de Schwann podem influenciar o estado de diferenciação e crescimento dos neurônios e controlar a orientação dos axônios, proporcionando um ambiente favorável ao crescimento. Além da produção de fatores neurotróficos, essas células também produzem e secretam proteínas da matriz extracelular, como laminina e fibronectina, e expressam moléculas de adesão celular em sua superfície (FROSTICK; KEMP, 1998; REYNOLDS; WOOLF, 1993). Ressalta-se, por fim, que a mielinização do circuito auditivo coincide com o desenvolvimento funcional do sistema auditivo, reforçando um importante papel dessas células na fisiologia coclear (LONG, 2018). Conforme descrito, as funções mais conhecidas das células gliais no sistema auditivo periférico dizem respeito principalmente à mielinização, plasticidade e à produção de neurotrofinas, no entanto, pouco se sabe sobre o papel dessas células em relação ao transporte de

neurotransmissores na via auditiva.

1.2. NEUROTRANSMISSÃO GLUTAMATÉRGICA E A VIA AUDITIVA

Já é bem descrito que a transmissão sináptica na via auditiva periférica é mediada principalmente pelo glutamato, um importante neurotransmissor excitatório que é constantemente liberado pelas células ciliadas internas de forma multivesicular e ativa receptores de glutamato em neurônios ganglionares (GLOWATZKI; FUCHS, 2002). No SNC, após ser liberado, o glutamato pode atingir uma concentração de até 1mM na fenda sináptica e ativar seus receptores ionotrópicos (iGluRs) e metabotrópicos (mGluRs) sendo em seguida removido da fenda sináptica por meio da atividade de transportadores de alta afinidade expressos, majoritariamente, na membrana de astrócitos (CLEMENTS et al., 1992; VANDENBERG; RYAN, 2016). No entanto, o desbalanço na liberação e/ou na captação de glutamato pode desencadear a excitotoxicidade glutamatérgica, caracterizada pela ativação excessiva de receptores ionotrópicos de glutamato permeáveis a íons e canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem (DONG; WANG; QIN, 2009). O aumento de cálcio intracelular leva a uma sobrecarga de cálcio nas mitocôndrias, gerando um desbalanço oxidativo e subsequente morte celular (VERMA; LIZAMA; CHU, 2022).

No sistema auditivo periférico, estímulos sonoros de alta intensidade induzem um inchaço neuronal, que pode levar à degeneração e sinaptopatia coclear mediadas pela excitotoxicidade glutamatérgica (Figura 2; DING et al., 2021; HICKMAN et al., 2020; MA et al., 2021). Corroborando com isso, alguns trabalhos demonstraram que a utilização de antagonistas de receptores de glutamato protege neurônios contra a excitotoxicidade glutamatérgica, sugerindo que a excitotoxicidade induzida pelo glutamato pode estar relacionada a patologias auditivas (BASILE et al., 1996; PUEL et al., 1994). Nesse contexto, ressalta-se a necessidade de sistemas de transporte na via auditiva capazes de limitar a atividade glutamatérgica exacerbada e proteger os neurônios que compõem a via auditiva dos danos excitotóxicos.

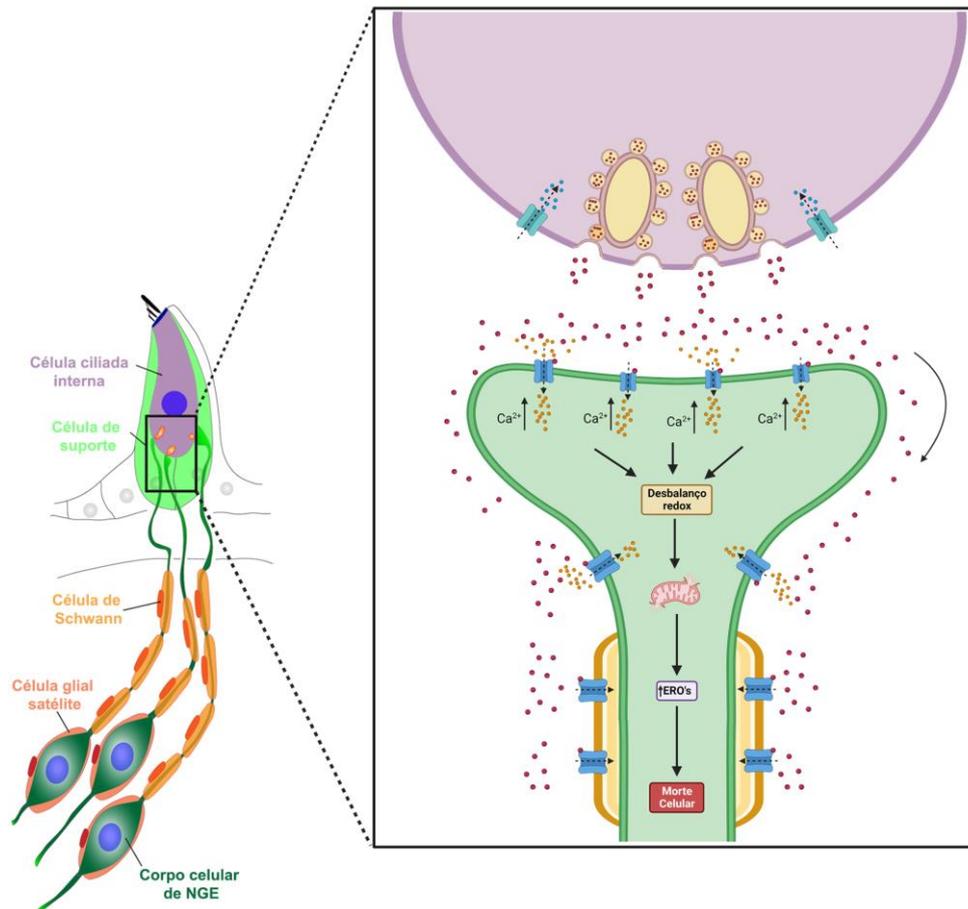


Figura 2: Excitotoxicidade mediada por glutamato na via auditiva periférica. (a) Representação esquemática do sistema auditivo periférico, incluindo células de suporte próximas a células ciliadas e células gliais associadas a neurônios ganglionares que compõem o nervo auditivo. (b) Ampliação da sinapse entre as células ciliadas e os neurônios ganglionares, demonstrando um aumento na liberação multivesicular de glutamato que induz a ativação excessiva de receptores de glutamato em NGEs e dá início à excitotoxicidade glutamatérgica e morte celular. (adaptado de Kohrman et al., (2021))

No SNC, grande parte dos transportadores de glutamato são expressos em células gliais e fazem parte do processo de metabolização do glutamato que ocorre por duas principais vias: 1) O glutamato é convertido a glutamina por meio da ação da enzima glutamina sintetase. A glutamina, por sua vez, pode ser imediatamente liberada e captada por neurônios, onde serve como precursor para a síntese de neurotransmissores, como glutamato e GABA. 2) Uma parcela significativa de glutamato é metabolizada a α -cetoglutarato, um intermediário do ácido tricarboxílico (TCA) que resulta na produção de uma significativa quantidade de ATP (SCHOUSBOE et al., 2014).

De forma similar ao que é visto no SNC, no sistema auditivo periférico, as células de suporte que se localizam ao redor das células ciliadas são reconhecidas por seu papel na captação e metabolização de glutamato por meio do ciclo glutamato-glutamina (GALE; JAGGER, 2012). Apesar de muitos estudos apontarem para um protagonismo desse tipo celular na captação de glutamato na sinapse aferente coclear, poucas investigações foram feitas acerca do papel das células gliais que envolvem os neurônios ganglionares ao longo de toda a via auditiva periférica (KOHRMAN et al., 2021; LI-DONG et al., 2008; WAN; CORFAS; STONE, 2013). Eybalin, et al. (1996), demonstraram que células de Schwann e Células Satélite expressam GlnS, enzima que catalisa a conversão de glutamato em glutamina. Furness, et al. (1997) observaram a expressão do transportador de glutamato GLAST, que no SNC é o principal responsável pela remoção de glutamato extracelular (LEHRE; DANBOLT, 1998). Tais resultados sugerem uma possível participação das células gliais na captação e metabolização de glutamato por meio de sistemas de transporte, os quais podem contribuir para a regulação das concentrações extracelulares de glutamato ao longo da via auditiva.

No SNC, a principal via de captação de glutamato ocorre por meio de transportadores dependentes (X_{AG}^-) e independentes de sódio (X_{CG}^- ; DANBOLT, 2001). Os transportadores dependentes de sódio são conhecidos como transportadores de aminoácidos excitatórios (EAATs), e são responsáveis pela captação da maior parte do glutamato extracelular. Os EAATs apresentam 5 subtipos de transportadores (EAAT1-5) representados, em roedores, pelos transportadores GLAST, GLT-1, EAAC1, EAAT4 e EAAT5 (ROSE et al., 2018a). O sistema X_{AG} utiliza um gradiente de sódio e potássio para remover o glutamato da sinapse e do espaço extracelular circundante, de modo que a captação de glutamato por esses transportadores é acoplada ao influxo de três íons Na^+ , H^+ e o efluxo de um íon K^+ (LEVY; WARR; ATTWELL, 1998; OWE; MARCAGGI; ATTWELL, 2006; ZERANGUE; KAVANAUGH, 1996). A maior parte do glutamato é removida da fenda sináptica pelos transportadores GLAST e GLT-1, os quais contribuem com mais de 80% da captação total de glutamato no SNC, e ambas as proteínas são expressas principalmente em células gliais no cérebro adulto e na medula espinhal (VANDENBERG; RYAN, 2016). A alta capacidade de captação dos EAATs

evita que os receptores de glutamato sejam sobrecarregados por altas taxas de atividade excitatória, e limita a difusão de glutamato para fora das sinapses (BEART; O'SHEA, 2007; GONÇALVES-RIBEIRO et al., 2019)

Na cóclea, o GLAST é considerado o principal transportador responsável pela captação de glutamato na sinapse entre as células ciliadas e os neurônios ganglionares, sendo expresso majoritariamente nas células de suporte ao redor das células ciliadas (FURNESS; LEHRE, 1997; GLOWATZKI et al., 2006). Apesar de já ter sido descrita a expressão de GLAST em células de Schwann e Células Satélite, não foi investigada a contribuição funcional do transportador nesse tipo celular (FURNESS et al., 2002; FURNESS; LAWTON, 2003; TAKUMI et al., 1997). No entanto, uma diversidade de autores tem demonstrado que disfunções na captação de glutamato por meio do transportador GLAST estão relacionadas a patologias auditivas. Hakuba et al. (2000) observaram uma perda auditiva exacerbada após excessiva estimulação acústica em camundongos *knockout* para GLAST, o que sugere o papel protetor desse transportador no sistema auditivo. Além disso, dados recentes mostraram que a ausência do GLAST gera danos sinápticos em camundongos que não foram expostos à hiperestimulação acústica, reforçando o papel do transportador em um contexto fisiológico (TSERGA et al., 2020). Embora o sistema X_{AG} , representado pelo GLAST, apresente uma relevância para a regulação da transmissão sináptica glutamatérgica na cóclea, algumas evidências sugerem a existência de um outro sistema de transporte de glutamato, possivelmente mediado pelo transportador X_{CG}^- , que também pode contribuir para a manutenção da homeostase na via auditiva (CHEN; KUJAWA; SEWELL, 2010).

Os transportadores independentes de sódio são representados principalmente pelo sistema X_{CG}^- , uma família de transportadores que realizam o antiporte de glutamato e cistina de acordo com o gradiente na proporção de 1:1 (BRIDGES; NATALE; PATEL, 2012; DANBOLT, 2001). Embora o sistema X_{CG}^- transporte ambos os aminoácidos em ambas as direções, em condições fisiológicas o sistema X_{CG}^- geralmente importa cistina enquanto exporta glutamato (Figura 3; BANNAI, 1986; SATO et al., 2002). No SNC, alguns trabalhos demonstraram que o glutamato liberado pelo transportador X_{CG}^- pode

modular a neurotransmissão glutamatérgica por meio da ativação de receptores extra sinápticos, contribuindo para injúrias excitotóxicas (ARMADA-MOREIRA et al., 2020). Em contrapartida, a captação de cistina pelo X_{CC}^- faz com que sua atividade esteja atrelada à proteção do tecido contra o estresse oxidativo, uma vez que a cistina é utilizada pela maioria das células para sintetizar a glutathiona (GSH), um dos principais antioxidantes endógenos no cérebro (CALABRESE; MORGAN; RIEMER, 2017; CHO; BANNAI, 1990; FOURNIER et al., 2017; SEIB; PATEL; BRIDGES, 2011; SHIH et al., 2006). Nesse sentido, um conjunto de dados aponta para o envolvimento do sistema X_{CC}^- na (i) síntese de GSH e, assim, no aumento das defesas intracelulares contra o estresse oxidativo; (ii) na modificação do meio redox extracelular; e (iii) na regulação do nível de glutamato extracelular.

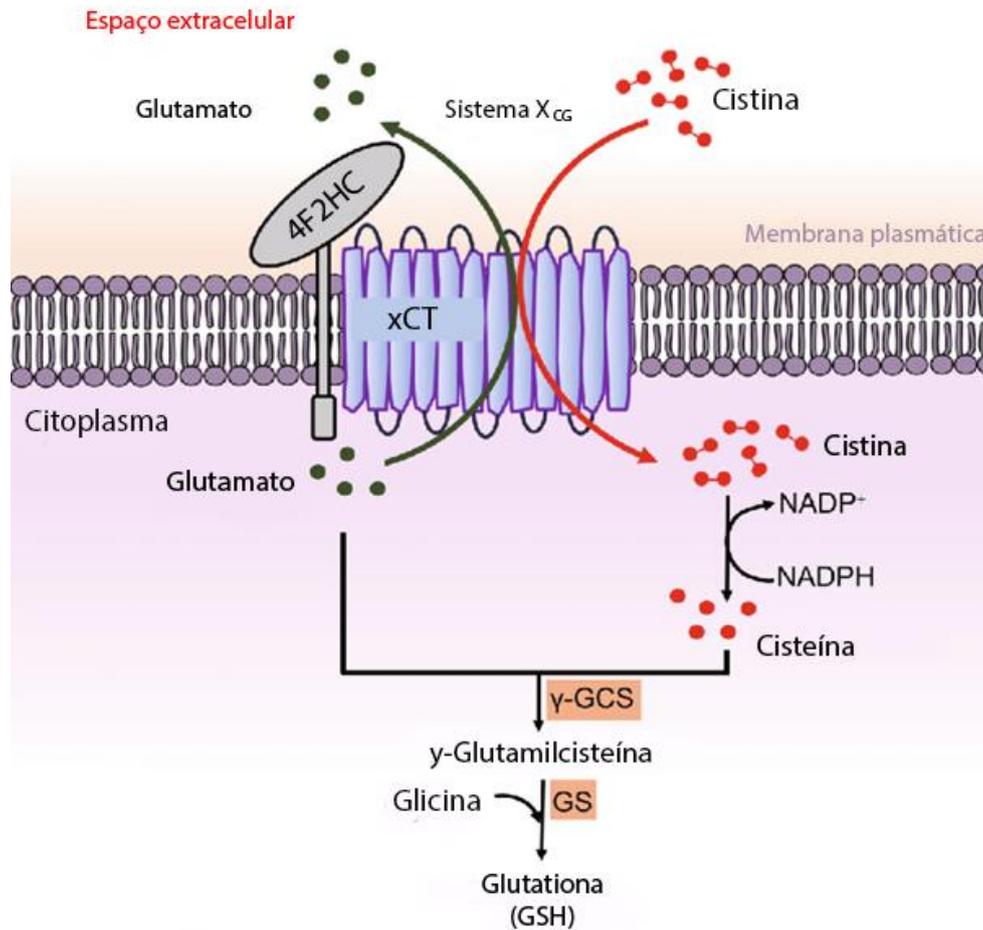


Figura 3: Estrutura e função do transportador XCG⁻. O sistema XCG⁻ funciona como um antiportador de cistina/glutamato que, geralmente, capta cistina enquanto libera glutamato. O transportador XCG⁻ é um heterodímero que consiste na subunidade xCT, que medeia a atividade antiportadora do sistema XCG⁻, e na subunidade 4F2HC, responsável por ancorar o xCT à membrana plasmática e manter a estabilidade da proteína xCT. A cistina extracelular é importada para a célula através do xCT e, em seguida, é convertida em cisteína através de uma reação de redução que consome NADPH. Subsequentemente, a cisteína é utilizada para sintetizar GSH através de um processo de duas etapas. A cisteína forma g-glutamilcisteína em conjugação com glutamato na primeira etapa catalisada por g-GCS. A segunda etapa envolve a adição de uma molécula de glicina para produzir GSH a partir da ação da GS. A síntese de GSH a partir de cisteína é necessária para manter o equilíbrio redox e a liberação não vesicular de Glu pelo transportador pode atuar potencialmente na sinalização neuronal (adaptado de Koppula, et al., 2021).

Distúrbios na homeostase do glutamato e no estado redox têm sido associadas a vários estados patológicos tanto no SNC quanto no SNP, podendo levar a mudanças generalizadas na atividade sináptica (CHEN; KUKLEY, 2020; FETONI et al., 2019; INQUIMBERT et al., 2012; LAU; TYMIANSKI, 2010; MAHMOUD et al., 2019; MATUTE; DOMERCQ; SÁNCHEZ-GÓMEZ, 2006a). No sistema auditivo, sabe-se que condições de estresse, como exposição ao ruído, anóxia e tratamento com drogas ototóxicas, geram um aumento da liberação de glutamato que resulta em excitotoxicidade, quadro que está clinicamente ligado à etiologia de uma série de distúrbios auditivos (BASILE et al., 1996; BOERO et al., 2021; FRYE; RYAN; KURABI, 2019; HENDERSON et al., 2006; KIM et al., 2019; ROBERTSON, 1983; YU et al., 2016). Chen et al., (2010) demonstraram que a inibição dos transportadores de glutamato dependentes de sódio *in vivo*, não altera a função coclear, sugerindo a participação de outros mecanismos de captação de glutamato na cóclea capazes de compensar a falta de atividade dos EAATs. O principal componente que poderia estar associado ao fenômeno descrito anteriormente é o transportador de glutamato independente de sódio X_{CG}^- . Nesse sentido, uma vez que o X_{CG}^- não pertence à família dos EAATs, sua funcionalidade não seria alterada diante da inibição desses transportadores, o que poderia justificar uma possível captação do excesso de glutamato extracelular por meio do X_{CG}^- e a minimização dos danos excitotóxicos e das alterações na função auditiva.

Uma vez que a cóclea apresenta sinapses glutamatérgicas constantemente ativas e um padrão de disparo neuronal contínuo, há uma alta suscetibilidade dessa região a danos excitotóxicos e estresse oxidativo mediados por glutamato que podem culminar em patologias auditivas (GUITTON; DUDAI, 2007; KIM et al., 2019; L. POIRRIER et al., 2010; MOSER; PREDOEHL; STARR, 2013; SEBE et al., 2017). Visto que já é bem descrito que transportador X_{CG}^- desempenha um papel particularmente significativo na manutenção da capacidade antioxidante endógena devido à síntese de GSH a partir da captação de cistina, é possível que o transportador seja crucial para manter o estado redox na cóclea (CONRAD; SATO, 2012).

Em modelo *ex vivo* do tecido coclear exposto a estresse oxidativo, foi demonstrado que houve uma regulação positiva da expressão da subunidade xCT, que é a proteína específica para o transportador de glutamato independente de sódio X_{CG}^- (CHEN et al., 2015; LI et al., 2015). Esses dados sugerem uma possível participação do sistema X_{CG}^- na cóclea, no entanto esses estudos ainda não são capazes de descrever a localização e funcionalidade desse transportador a nível celular.

A caracterização de sistemas de transporte de glutamato na cóclea mostra-se essencial para a melhor compreensão dos mecanismos subjacentes à desregulação glutamatérgica e o desbalanço oxidativo nessa região. Uma vez que as células gliais estão em contato íntimo com neurônios ao longo de toda a via auditiva, a expressão e a atividade do transportador de cistina-glutamato na glia coclear pode ser essencial para a regulação da transmissão sináptica e manutenção do estado redox no sistema auditivo periférico (KOHRMAN et al., 2021; LOCHER et al., 2014). Dessa forma, destaca-se a necessidade de caracterizar o papel das células gliais cocleares em relação à atividade de sistemas de transporte de glutamato.

Nesse sentido, o modelo *in vitro* de células gliais da cóclea apresenta-se como uma ferramenta essencial para a compreensão dos mecanismos de transporte de glutamato nesse tipo celular, uma vez que reproduz algumas das características do tecido observadas *in vivo* (HANSEN et al., 2001; WHITLON et al., 2009). Durante o período pós-natal, a cóclea de camundongos apresenta-se pouco calcificada, facilitando a dissecação e o isolamento do tecido de outras estruturas presentes na região. Embora as células gliais estejam próximas a uma diversidade de outros tipos celulares no tecido coclear, o protocolo de dissecação e purificação de células gliais da cóclea (adaptado de Hansen et al., 2001) garante uma alta quantidade de células gliais após 5-7 dias *in vitro*. Portanto, no presente trabalho buscamos avaliar a contribuição das células gliais da cóclea para o transporte de glutamato a partir da caracterização da expressão e atividade de sistemas de transporte de glutamato presentes nesse tipo celular.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Caracterizar a expressão e atividade do transportador de glutamato X_{CC}^- em células gliais obtidas do tecido coclear.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar quais sistemas de transporte de glutamato apresentam atividade em células gliais da cóclea;
- Estabelecer a contribuição do transporte de glutamato dependente e independente de sódio em células gliais cocleares;
- Avaliar a participação do transportador de glutamato X_{CC}^- no transporte de glutamato em células gliais da cóclea;
- Verificar a expressão do transportador X_{CC}^- em células gliais da cóclea.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS GLIAIS DA CÓCLEA

Neste estudo foram utilizados camundongos da linhagem Balb/C (P1-P2) adquiridos do Biotério do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal do Pará (UFPA). Todos os protocolos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) sob o protocolo (CEPAE 140-13). Os animais foram decapitados e foi realizada a dissecação da cóclea conforme descrito por Hansen, et al. (2001). Após a dissecação, os tecidos cocleares foram dissociados em 500uL de tripsina 0,05% durante 5 minutos e, em seguida, foi adicionado 1 mL de Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal (SBF) a fim de neutralizar a ação enzimática da tripsina. Posteriormente, realizamos a dissociação mecânica utilizando pipeta automática de 5000µL e, subseqüentemente, foram adicionados 4 mL de DMEM + 10% SBF. Foram utilizadas placas de 24 poços nas quais foi distribuído 250µL do homogenato de células e 350uL de DMEM +10% FBS por poço. As células foram cultivadas em meio DMEM + 10% FBS, mantidas durante 7 dias em estufa com 5% de CO₂ a 37°C e a troca de meio foi realizada a cada três dias até as células atingirem a confluência ideal para a realização dos ensaios (adaptado de Oliveira, et al., 2019).

3.2 CULTURA PRIMÁRIA DE ASTRÓCITOS CORTICAIS

Para a cultura primária de astrócitos, camundongos Balb/C neonatos (P0-P3) foram obtidos do Biotério Central do Instituto de Ciências Biológicas (Universidade Federal do Pará). Todos os protocolos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) sob o protocolo (CEPAE 140-13). O córtex dos animais foi dissecado em meio isento de cálcio e magnésio e dissociado mecanicamente com o auxílio de uma pipeta em DMEM+10% Soro Fetal Bovino. A suspensão de células resultante deste processo foi utilizada para plaqueamento em placas de 12 poços (3,5 cm²) a uma densidade de 1,5x10⁴ células por cm². As células foram então mantidas em DMEM+10% FBS em estufa de CO₂ (37°C – 5% CO₂/95% O₂). A primeira

troca de meio foi realizada 24 horas após o plaqueamento, e depois a cada 3-4 dias *in vitro*, e as células atingiram a confluência entre 12 e 15 dias *in vitro*.

3.3 DROGAS E REAGENTES

Para os ensaios de liberação e captação de glutamato foram utilizados os reagentes: **L-cisteína** (*(R)-2-Amino-3-mercaptopropionic acid*, 97% de pureza; CAS: 52-90-4), substrato para o transportador X_{CG}^- , e o antagonista seletivo do transportador X_{CG}^- , **ácido α -aminoadípico** (*DL- α -Amino adipic acid*), 98% de pureza; CAS: 542-32-5) ambos adquiridos de Sigma Aldrich - São Paulo. Para os ensaios de imunofluorescência, foram utilizados os anticorpos: anticorpo primário anti-xCT (Abcam; ab216876); anticorpo secundário anti-AlexaFluor488 (abcam; ab150077).

3.1. AVALIAÇÃO DO TRANSPORTE DE GLUTAMATO

3.1.1. ENSAIO DE LIBERAÇÃO DE GLUTAMATO

Após atingir a confluência total, as culturas foram submetidas ao ensaio de liberação de glutamato para posterior dosagem do neurotransmissor por cromatografia líquida de alta eficiência (MORAES et al., 2012). Para o ensaio de liberação de glutamato, as células foram lavadas com 500 μ L de Hank's balanced salt solution (HBSS) que consiste (em mM): NaCl 128, MgCl₂ 1, CaCl₂ 2, glicose 12 e HEPES 20, com pH ajustado para 7.4 com KOH 1N. Os grupos utilizados para o ensaio de liberação de glutamato foram: 1. NaCl, no qual as células foram incubadas com HBSS contendo NaCl; 2. LiCl, no qual as células foram incubadas com HBSS contendo LiCl; 3. Cys 500 μ M, no qual as células foram incubadas com 500 μ M de cisteína diluída em HBSS contendo LiCl. Após 20 minutos de incubação em estufa de CO₂ a 37°C o meio de incubação foi coletado e armazenado em -80°C para posterior preparo e dosagem das amostras por cromatografia líquida (Figura 4).

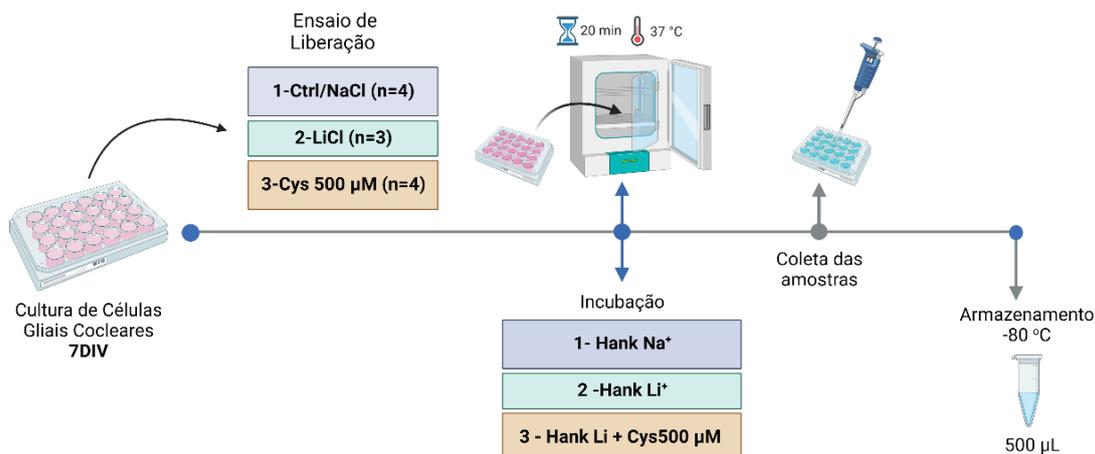


Figura 4: Esquema representativo dos procedimentos para o ensaio de liberação de glutamato. (1) Grupos experimentais; (2) Soluções de incubação; (3) Coleta das amostras; (4) Armazenamento das amostras. (Figura: Autoral; Ilustração produzida em BioRender.com).

3.1.2 ENSAIO DE CAPTAÇÃO DE GLUTAMATO

Por sua vez, para avaliar a captação de glutamato, os poços foram lavados com 500µL de Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) que consiste (em mM): NaCl 128, MgCl₂ 1, CaCl₂ 2, glicose 12 e HEPES 20, com pH ajustado para 7.4 com KOH 1N. Para os experimentos sem sódio, foi feita a substituição equimolar de NaCl por LiCl. No ensaio de captação de glutamato, a todas as soluções de incubação foi adicionada uma concentração de glutamato de 50µM (Moraes, et al., 2012). Os grupos experimentais utilizados para o ensaio de captação de glutamato em células gliais cocleares foram: 1. NaCl (incubação com HBSS contendo NaCl); 2. LiCl (incubação com HBSS contendo LiCl); 3. Cys 500µM (incubação com cisteína diluída em HBSS contendo LiCl); αAA 500µM (pré-incubação de 10 minutos com αAA 500µM diluído em HBSS contendo LiCl, seguido por incubação com HBSS contendo LiCl); e Cys 500µM + αAA 500µM, (pré-incubação de 10 minutos com αAA 500µM diluído em HBSS contendo LiCl, seguido por incubação com cisteína 500µM diluída em HBSS contendo LiCl). Após 20 minutos de incubação em estufa de CO₂ a 37°C o meio de incubação foi coletado e armazenado em -80°C para posterior preparo e dosagem das amostras por cromatografia líquida de alta eficiência (Figura 4). A captação de glutamato foi determinada através da quantificação da diferença entre as concentrações inicial e final de glutamato no meio de incubação.

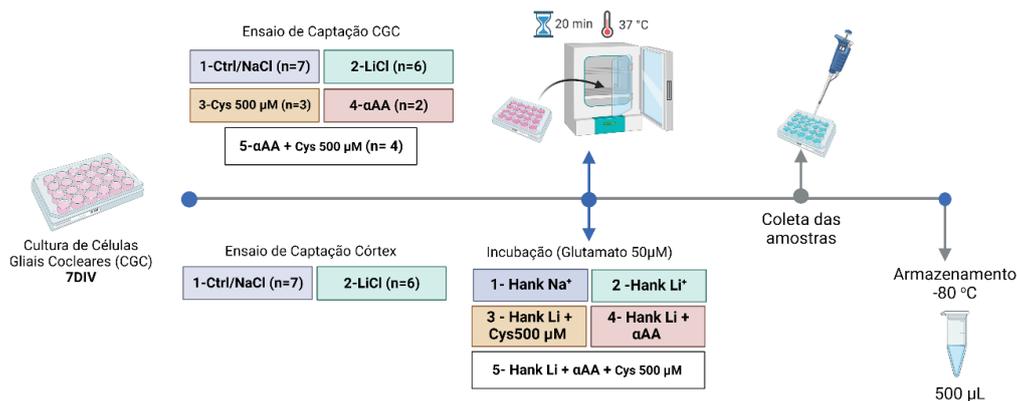


Figura 5: Esquema representativo dos procedimentos para o ensaio de captação de glutamato. (1) Grupos experimentais; (2) Soluções de incubação; (3) Coleta das amostras; (4) Armazenamento das amostras. (Figura: Autoral; Ilustração produzida em BioRender.com).

3.1.3 DOSAGEM DE GLUTAMATO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

Para a análise das amostras obtidas nos ensaios de liberação e captação, foi realizada a preparação das amostras e dosagem de glutamato em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE), como descrito por Moraes, et al (2012). Para a precipitação de proteínas nas amostras, foram adicionados 20 µL de ácido tricloroacético (TCA) 1% a 500 µL da amostra, seguida de agitação em agitador vortex e centrifugação a 5000 rpm por 10 minutos. Em seguida, foi realizada a coleta de 300uL do sobrenadante, adicionado 20 µL do padrão interno (homoserina) e homogeneizados em seguida, com o intuito de melhorar a precisão e exatidão da análise por CLAE. Por fim, as amostras foram misturadas com Tampão Borato (pH 9.5) e submetidas ao processo de derivatização com O-phtaldehyde, que tem como objetivo aumentar a sensibilidade da detecção pelo cromatógrafo (Moraes, et al 2012).

Após o processo descrito previamente, as amostras foram injetadas em um sistema de CLAE com gradiente para eluição da fase móvel A, composta por tampão acetato de sódio, metanol e propanol (95% de tampão acetato com pH 5,67; 5% de metanol e 12 mL de propanol para cada litro de fase A) e fase B, constituída por metanol 70 %, fluxo de 1 ml/min, eluição de 25 minutos, detector de fluorescência, comprimento de onda de excitação 340 nm e emissão de 460 nm. Por fim, os níveis de glutamato liberado e captado foram

quantificados utilizando como referência uma curva de calibração de glutamato previamente estabelecida.

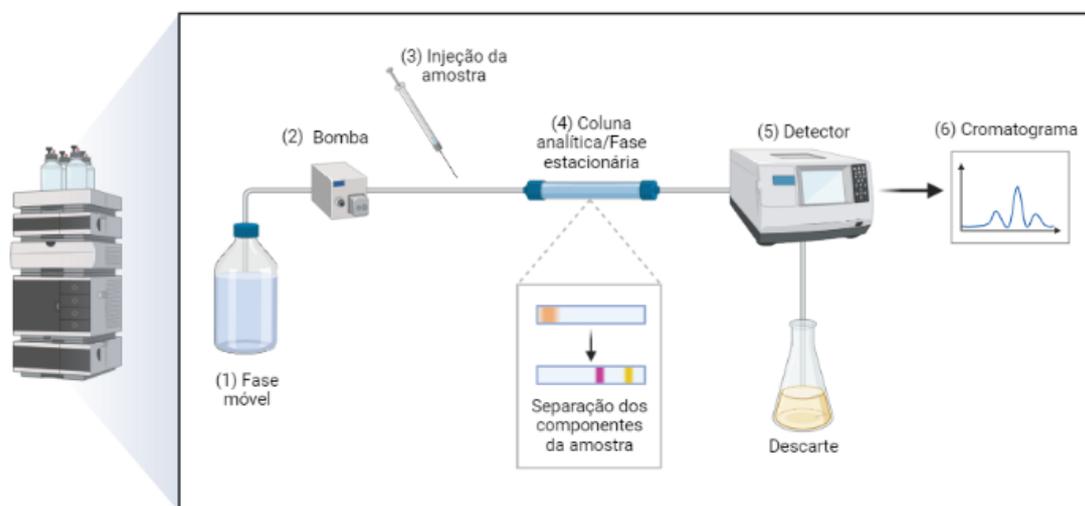


Figura 6: Esquema representativo do método para detecção de aminoácidos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao detector de fluorescência. (1) Fase móvel (2) Bomba de pressão, (3) Alça de injeção da amostra, (4) Coluna analítica/Fase Estacionária, (5) Detector, (6) Sistema de aquisição de dados. Figura: Autoral; Ilustração produzida em BioRender.com).

3.2 DOSAGEM DE PROTEÍNA

Após a retirada do meio de incubação, 300 μL de NaOH 1N foi adicionado aos poços e as células foram raspadas do fundo da placa com auxílio de pipeta automática. As amostras foram então armazenadas em microtubos e após 24h submetidas à dosagem de proteína pelo método descrito por Bradford (1976). Este método consiste na interação entre o corante azul de coomassie e as proteínas da amostra de modo que a reação provoca a mudança do corante da sua forma catiônica (coloração marrom) para a forma aniônica (coloração azul), de acordo com a quantidade de proteínas presente na reação. Durante o ensaio, pipetamos em triplicata na placa de 96 poços uma quantidade de 5 μL de cada amostra e 15 μL de água ultrapura por poço. Em seguida, foi adicionado aos poços 200 μL do reagente de Bradford (100mg de Coomassie Brilliant Blue, 50ml de etanol 95% e 100mL de ácido fosfórico 85%) e a reação ocorreu durante 5 minutos a temperatura ambiente. Em

seguida, a placa foi lida em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 595nm e as concentrações de proteína ($\mu\text{g/mL}$) foram determinadas pela comparação com uma curva padrão de albumina sérica bovina (BSA).

3.3 ENSAIO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA

Com o intuito de caracterizar a expressão do transportador de glutamato independente de sódio na cultura de células gliais, foi realizada a marcação com o anticorpo específico para o transportador X_{CG}^- . Após atingirem confluência ideal, as células foram lavadas com tampão fosfato (PBS 0,1M; pH 7,2) e fixadas em 1mL de metanol por três vezes com intervalos de 10 minutos a cada lavagem. As células foram incubadas durante 2 horas com a solução de bloqueio contendo 10% de soro de coelho e 2,5% de Triton X-100, 0,3 M de glicina, 1% de DMSO e 1% de soro bovino (BSA) diluídos em PBS (0,2M). Em seguida, as células foram incubadas com o anticorpo primário anti-xCT (1:500) durante 12 horas a 4°C e então submetidas à lavagens com PBS e incubadas durante duas horas, a 37°C, com o anticorpo secundário anti-AlexaFluor 488 (1:1000). Posteriormente, foi realizada a incubação com o marcador de núcleo celular DAPI (4,6-diamidina-2- fenilindol) durante dois minutos, em seguida as células foram colocadas em meio de montagem (Fluoroshield) e visualizadas em microscópio de fluorescência (Nikon - ECLIPSE Ni). A presença de células de Schwann na cultura de cóclea foi confirmada em dados publicados anteriormente por nosso grupo a partir da sobreposição de marcação entre os núcleos celulares marcados com DAPI e a proteína S100 (Oliveira et al., 2019).

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram apresentados como porcentagem do controle e a comparação entre dois grupos foi analisada por teste t-student não pareado. A comparação entre múltiplos grupos foi feita por Análise de Variância de uma via seguido do pós-teste de Tukey. Todos os dados foram normalizados por meio do teste de Shapiro-Wilk e as análises foram realizadas com o software GraphPad Prism versão 9.3.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA), considerando $*p < 0,05$ como significante.

4. RESULTADOS

4.1 CÉLULAS GLIAIS DA CÓCLEA APRESENTAM UM MECANISMO DE CAPTAÇÃO DE GLUTAMATO INDEPENDENTE DE SÓDIO

No presente estudo, utilizamos um modelo *in vitro* de cultura primária de células gliais da cóclea, utilizando um protocolo que no qual a maioria das células obtidas apresenta marcação positiva para S100 - uma proteína majoritariamente expressa em células gliais (Oliveira et al., 2019). Na figura 8 estão representadas as fotomicrografias representativas de culturas primárias da cóclea com 5 dias *in vitro* (Figura 7A) e 7 dias *in vitro* (Figura 7B) que demonstram a morfologia característica de células gliais durante o período de cultivo.

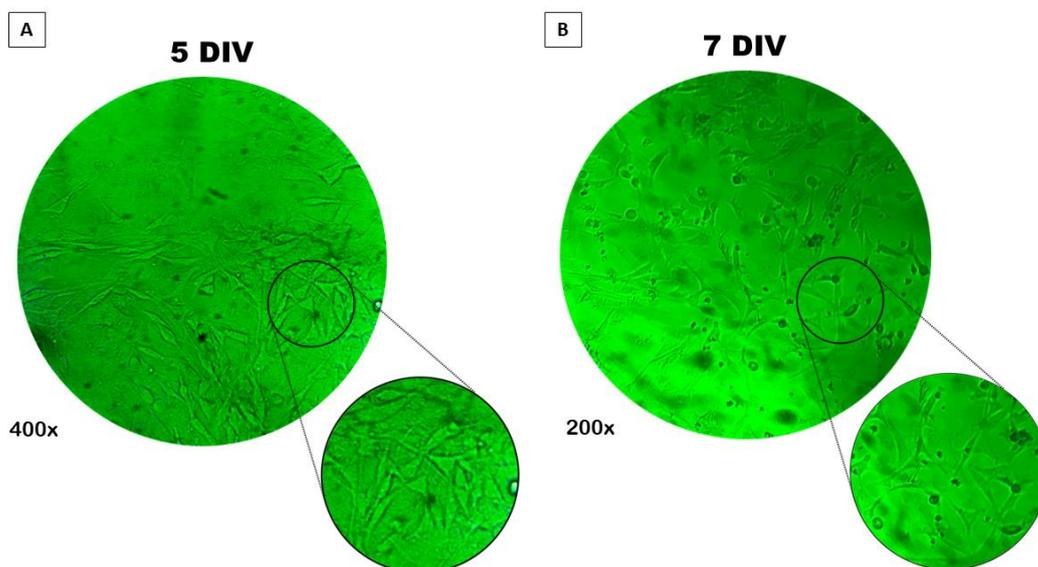


Figura 7: Fotomicrografia representativa de cultura de células gliais da cóclea com **A:** 5 dias *in vitro* (aumento de 400x). e **B:** 7 dias *in vitro* em B (aumento de 200x).

Considerando que a principal característica dos sistemas de transporte de glutamato é a dependência ou não de sódio, buscamos verificar a responsividade das células gliais em ambas as condições. Nesse sentido, após atingirem a confluência ideal, as células gliais cocleares foram submetidas ao ensaio de captação de glutamato na presença e ausência de sódio, sendo feita a substituição equimolar do Cloreto de Sódio (NaCl) por Cloreto de Lítio (LiCl) quando necessário. Em nossos resultados, observamos que $\approx 70\%$ do glutamato total foi captado no grupo LiCl (Figura 8; NaCl 100 ± 24.99 vs. LiCl 70.19 ± 12.69 , $df=11$, $p(\text{bilateral}) = 0,0179$), sugerindo a atividade de um

mecanismo de transporte de glutamato independente de sódio que parece contribuir de forma relevante para a captação total de glutamato na cóclea (Figura 8).

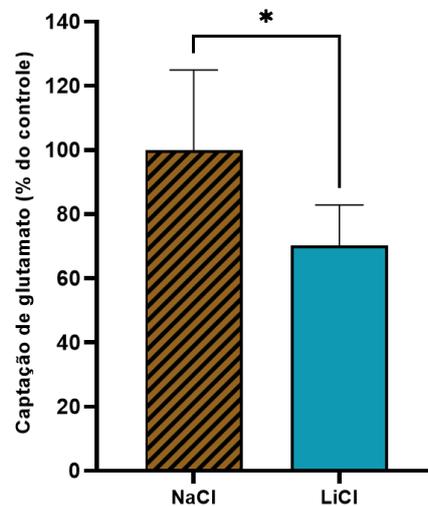


Figura 8: Avaliação da captação de glutamato na presença e ausência de sódio em cultura de células gliais obtidas do tecido coclear de camundongos neonatos. As células gliais da cóclea apresentaram uma captação de glutamato expressiva em meio sem sódio quando comparada ao grupo controle, evidenciando a presença de um componente independente de sódio na captação de glutamato nesse tipo celular. Valores expressos como porcentagem do controle NaCl (n=7) vs LiCl (n=6). (Teste t de Student. *p<0,05).

Para comparar a atividade dos sistemas de transporte em diferentes tecidos, comparamos a captação de glutamato entre culturas primárias de células gliais da cóclea e astrócitos do córtex na presença e ausência de sódio (Figura 9). Nossos dados mostraram uma discreta captação de glutamato de $\approx 3\%$ em relação ao controle (Figura 9B; NaCl 100 ± 24.42 vs. LiCl 3.40 ± 3.29 , $df = 9$, $p(\text{bilateral}) = 0,0001$), corroborando com alguns dados já observados na literatura e demonstrando que a captação de glutamato independente de sódio por células gliais corticais tem uma contribuição distinta da que observamos em células gliais cocleares. Em conjunto, esses resultados reforçam a hipótese de que a contribuição dos sistemas de transporte de glutamato ocorre de forma diferenciada de acordo com o tecido em que estão localizados e sugerem que na glia da cóclea há uma participação proeminente do sistema independente de sódio, quando comparado aos astrócitos corticais.

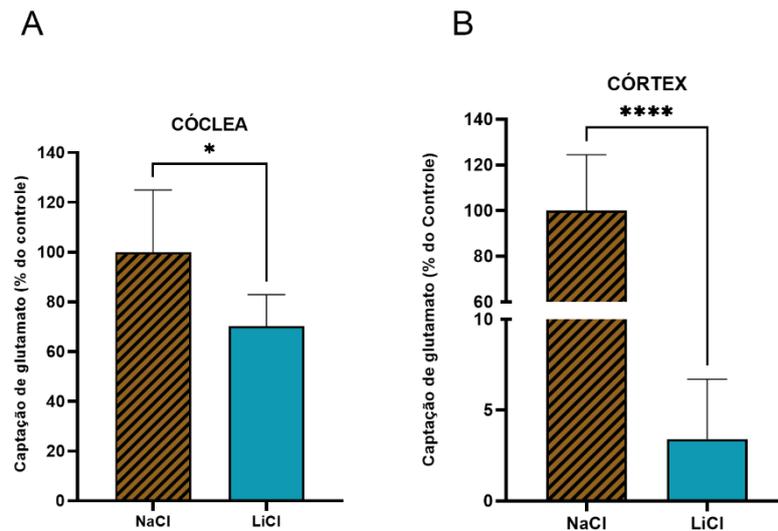


Figura 9: Atividade diferencial dos sistemas de transporte de glutamato em cultura primária de células gliais da cóclea e cultura primária de astrócitos do córtex. (A) Nas células gliais cocleares houve uma expressiva captação de glutamato no grupo LiCl em relação ao controle, sugerindo a participação relevante de um mecanismo independente de sódio no transporte de glutamato nesse tecido (B) Em astrócitos corticais houve uma captação de glutamato discreta no grupo LiCl quando comparado ao controle, sugerindo uma menor contribuição do sistema de transporte de glutamato independente de sódio nesse tipo celular em relação às células gliais cocleares. A: Valores expressos como porcentagem do controle NaCl (n=6) vs LiCl (n=7). Teste t de Student * $p < 0,05$) e B: Valores expressos como porcentagem do controle NaCl (n=3) vs LiCl (n=3; Teste t de Student. * $p < 0,05$)

4.2 O TRANSPORTADOR X_{CG}^- MEDEIA O TRANSPORTE DE GLUTAMATO INDEPENDENTE DE SÓDIO EM CÉLULAS GLIAIS DA CÓCLEA

Visto que observamos uma atividade proeminente do sistema de transporte de glutamato independente de sódio, buscamos investigar se o componente responsável pelo efeito que observamos seria o transportador X_{CG}^- - principal representante da família de transportadores de glutamato independente de sódio no SNC. Para tanto, as células foram incubadas por 10 minutos em meio sem sódio com 500 μM de αAA , um inibidor competitivo do transportador X_{CG}^- . Os resultados demonstraram que a inibição do transportador X_{CG}^- reduziu em $\approx 80\%$ a captação de glutamato em relação ao grupo controle (Figura 10; 4; LiCl 100 ± 10.42 vs. αAA 500 μM 20.39 ± 1.56 ; F

(3, 9) = 53,46; $p = 0.0001$), ratificando a hipótese de que o transportador X_{CG}^- apresenta uma atividade funcional em células gliais da cóclea.

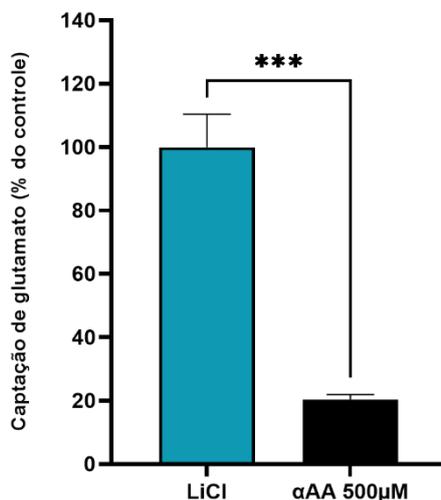


Figura 10: O transportador X_{CG}^- medeia o transporte de glutamato independente de sódio em células gliais da cóclea. A exposição de células gliais ao α AA, inibidor seletivo do transportador X_{CG}^- , reduziu significativamente a captação de glutamato independente de sódio. Dados expressos em porcentagem em relação ao controle. **** $p < 0,001$ vs α AA 500 μ M (LiCl (n=6) vs α AA (n=2)). (Teste t-student).

Somado a isso, avaliamos o efeito da incubação das células gliais com cisteína, um reconhecido substrato do transportador X_{CG}^- . Em nossos resultados observamos que a incubação com cisteína em meio sem sódio gerou uma redução de $\approx 65\%$ na captação de glutamato quando comparada ao grupo controle (Figura 11; LiCl 100 ± 10.42 vs. Cys 500 μ M 32.53 ± 6.89 ; (F (3, 9) = 53,46; $p = 0.0001$), demonstrando que o uso de um substrato do transportador deslocou a captação de glutamato e reforçando a ideia de uma possível atividade do X_{CG}^- nas células gliais da cóclea. Da mesma forma, o pré-tratamento com α AA e a subsequente incubação com cisteína (500 μ M) para o ensaio de captação de glutamato, resultou em uma diminuição significativa da captação de glutamato em $\approx 85\%$ (Figura 11; LiCl 100 ± 10.42 vs. α AA+ Cys 500 μ M 12.26 ± 14.03 ; F (3, 9) = 53,46; $p = 0.0001$).

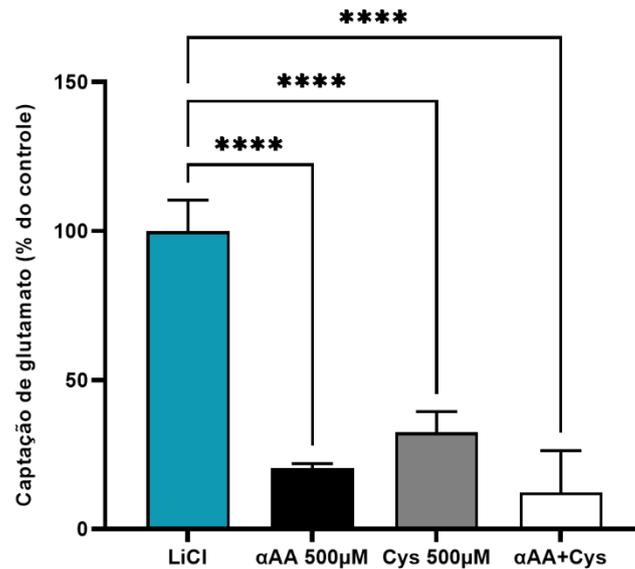


Figura 11: Efeito da incubação com Cisteína (500 μM) e αAA (500 μM) na captação de glutamato independente de sódio em cultura de células gliais obtidas do tecido coclear de camundongos neonatos. Houve uma redução significativa da captação de glutamato no grupo exposto à cisteína isoladamente e, de forma similar, no grupo exposto de forma combinada com cisteína e αAA . Valores expressos como porcentagem do controle LiCl (n=4); αAA 500 μM (n=2); Cys 500 μM (n=3); αAA + Cys (n=4) **** p < 0,0001 vs controle/LiCl; ANOVA uma via seguido de pós-teste Tukey.

Além disso, verificamos que a incubação com cisteína aumentou em $\approx 250\%$ a liberação de glutamato em relação ao grupo LiCl (Figura 12). Em conjunto, esses dados demonstram que as células gliais da cóclea apresentam uma maquinaria de transporte de glutamato sensível à cisteína mesmo em um ambiente onde não há a presença de transportadores de glutamato dependentes de sódio, reforçando a hipótese da possível atividade do transportador xCG^- na glia coclear.

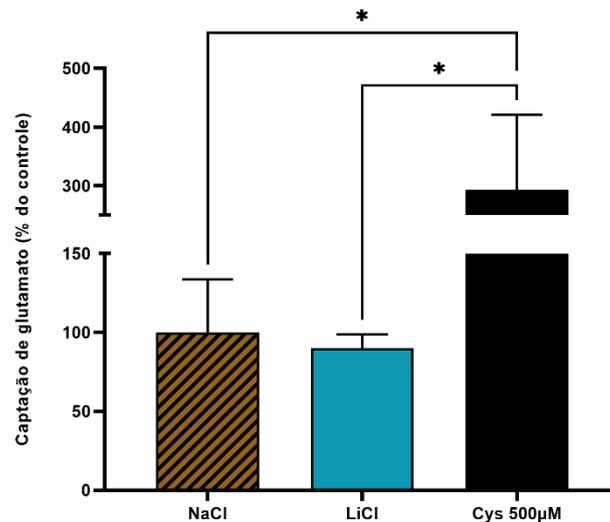


Figura 12: Efeito da incubação com Cisteína (500 µM) na liberação de glutamato independente de sódio em cultura de células gliais obtidas do tecido coclear de camundongos neonatos. A incubação das células gliais da cóclea com cisteína em meio sem sódio induziu um aumento na liberação de glutamato. Valores expressos como porcentagem do controle Ctrl/NaCl (n=4) vs Cys 500µM (n=4). *p < 0,05 vs NaCl.; LiCl (n=3); Cys 500µM (n=4). (ANOVA, pós-teste Tukey).

4.3 CÉLULAS GLIAIS COCLEARES EXPRESSAM O TRANSPORTADOR DE GLUTAMATO INDEPENDENTE DE SÓDIO X_{CG}^-

Conforme observado em nossos resultados anteriores, a exposição das células gliais da cóclea a um substrato do transportador X_{CG}^- e a inibição seletiva do transportador, ambos na ausência de sódio, modulam o transporte de glutamato. Esses dados reforçam a hipótese de que as células gliais da cóclea apresentam um sistema de transporte de glutamato independente de sódio mediado pelo transportador X_{CG}^- . Nesse sentido, com o intuito de reiterar a participação do transportador X_{CG}^- em células gliais da cóclea, realizamos a imunomarcação com anticorpo específico para a subunidade catalítica xCT que é específica para o transportador X_{CG}^- , e com o marcador de núcleo celular DAPI (Figura 13).

Em nossos resultados, verificamos que as células gliais apresentaram marcação positiva para o transportador de glutamato X_{CG}^- , ratificando os dados anteriores. Em conjunto, demonstramos pela primeira vez que as células gliais da cóclea apresentam um sistema de transporte de glutamato funcional mediado pelo transportador de cistina e glutamato X_{CG}^- , cujas funções

relacionadas à regulação das concentrações extracelulares e à manutenção do estado redox podem ser essenciais para a homeostasia coclear.

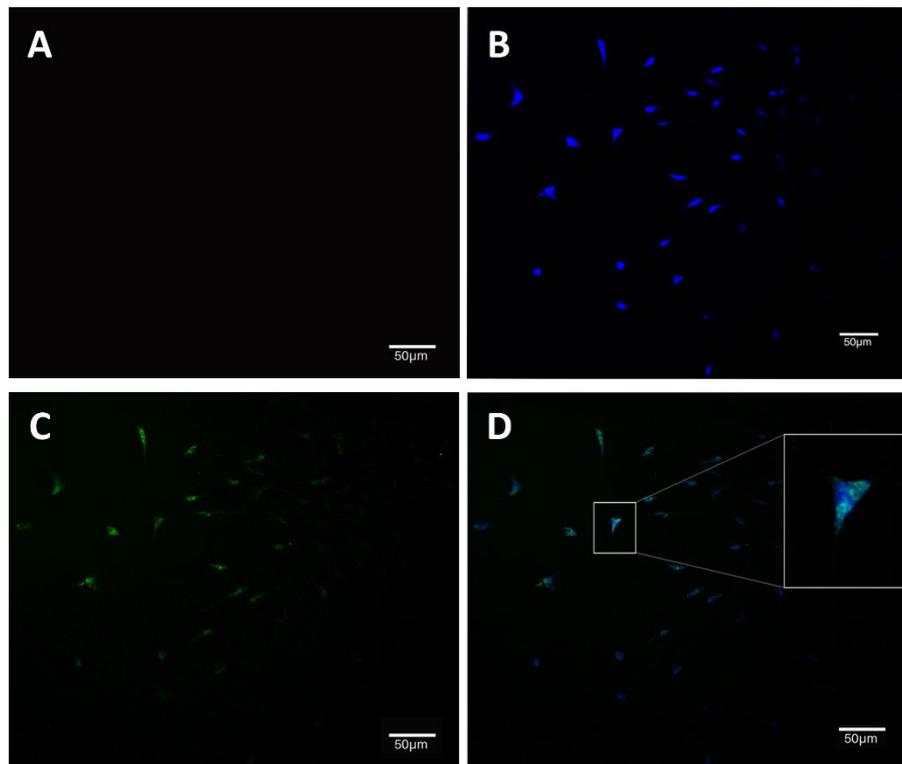


Figura 13: Avaliação da imunomarcagem para o transportador X_{CG}^- em células glias cocleares. a) Controle negativo; b) Marcação com DAPI do núcleo de células glias; c) Células marcadas positivamente para a subunidade xCT; d) Sobreposição de imagens demonstrando a colocalização de DAPI e xCT.

5. DISCUSSÃO

5.1 TRANSPORTE DE GLUTAMATO EM CÉLULAS GLIAIS DA CÓCLEA

Nossos resultados mostram, pela primeira vez, que as células gliais do sistema auditivo periférico apresentam os sistemas de transporte de glutamato dependente e independente de sódio, sendo o transporte independente mediado pelo sistema X_{CG}^- . De modo semelhante aos nossos resultados, Eybalin et al. (1983) observaram que as células gliais apresentavam ambos os sistemas de transporte de glutamato. No entanto, tais resultados não foram capazes de elucidar a contribuição de cada sistema de transporte para a captação de glutamato na via auditiva, e quais componentes poderiam mediar esse mecanismo na presença ou ausência de sódio. Nesse contexto, Furness e Lehre (1997) demonstraram que as células de Schwann da cóclea expressam o transportador GLAST, responsável pela maior parte da captação de glutamato no SNC. Esse resultado é promissor visto que demonstra que as células gliais possuem a maquinaria necessária para realizar o transporte de glutamato, porém a atividade funcional desse transportador nas células gliais cocleares não foi elucidada. Nesse sentido, embora as células gliais se apresentem em grande número e se distribuam ao longo de toda a via auditiva, há poucos avanços no que tange à investigação do papel dessas células na regulação da neurotransmissão glutamatérgica no sistema auditivo. Por isso, baseado em estudos *in vitro* e *in vivo*, formulamos a hipótese que as Células Gliais da Cóclea (CGCs) apresentam a expressão e atividade de sistemas de transporte de glutamato cujos componentes podem contribuir para a manutenção da homeostase na via auditiva em um contexto fisiológico e/ou patológico.

A presença e atividade funcional do sistema de transporte de glutamato dependente de sódio na cóclea foi amplamente descrita em células de suporte ao redor de células ciliadas, sendo representada majoritariamente pelo GLAST (FURNESS; LAWTON, 2003; WAN; CORFAS; STONE, 2013). Por outro lado, apesar da expressão deste transportador já ter sido descrita na glia da cóclea, há poucas evidências que suportem um papel funcional do GLAST para a captação de glutamato nessas células. Nesse sentido, nosso trabalho contribui para a literatura ao demonstrar que cerca de $\approx 30\%$ da captação de glutamato

decorre da atividade de um sistema de transporte de glutamato dependente de sódio. De forma similar ao que encontramos em nossos resultados, Eybalin et al. (1983) observaram em seus estudos auto-radiográficos que as CGCs apresentaram uma marcação de glutamato relevante na presença de sódio. Em conjunto, esses dados sugerem que as células gliais cocleares apresentam um sistema de transporte de glutamato dependente de sódio, possivelmente mediado por GLAST, cuja expressão já foi descrita nesse tipo celular. No entanto, é necessária uma avaliação farmacológica mais detalhada a fim de elucidar o componente responsável pelo transporte de glutamato dependente de sódio nas CGCs.

Em relação à avaliação do transporte de glutamato independente de sódio em células gliais da cóclea, nossos resultados demonstraram uma captação de glutamato expressiva em torno de $\approx 70\%$, sugerindo a atividade de um mecanismo de transporte independente de sódio. Conforme extensivamente relatado na literatura, o sistema de transporte X_{CG}^- é o principal representante da família de transportadores de glutamato independentes de sódio, fato que reforça a hipótese de que o transportador pode ser responsável por mediar o fenômeno observado em nossos resultados (BANNAL, 1986; BRIDGES et al., 2012). Nossos dados, entretanto, contrastam com o observado no trabalho de Eybalin et al. (1983), no qual foi observado uma marcação discreta de glutamato no meio sem sódio em células gliais. No entanto, apesar dos dados obtidos por Eybalin (1983) aparentemente divergirem com o que observamos em nossos resultados, é importante ressaltar que ambos os estudos demonstraram a existência de sistemas de transporte de glutamato dependente e independente de sódio em CGCs.

5.2 ATIVIDADE DIFERENCIAL DO TRANSPORTADOR X_{CG}^-

Em nossos resultados, observamos que as células gliais da cóclea apresentam um mecanismo de transporte de glutamato independente de sódio expressivo, possivelmente mediado pelo transportador X_{CG}^- . Esse transportador se localiza majoritariamente em células gliais, apresentando um papel bem caracterizado no SNC em relação à regulação da concentração de glutamato extracelular e à manutenção do estado redox (KUPCHIK et al., 2012; LIU; XIA; HUANG, 2020; LIU et al., 2020; MASSIE et al., 2015; MORAN et al., 2005). Algumas

evidências sugerem que a atividade desse transportador parece ser proeminente em regiões com maior susceptibilidade ao estresse, a exemplo de células da retina e de gliomas. Oliveira et al. (2010), por sua vez, demonstraram que o sistema X_{CG}^- contribui com cerca de $\approx 50\%$ do transporte de glutamato em células gliais da retina, região constantemente exposta a danos oxidativos mediados por glutamato. De forma similar, em gliomas mostrou-se que o sistema X_{CG}^- contribui com cerca de $\approx 55\%$ da captação de glutamato independente de sódio, além de estar associado à manutenção de altos níveis de glutathione e subsequente regulação redox (CHO; BANNAI, 1990; SHIH et al., 2006). Além disso, é bem descrito que a exposição de células a desbalanço redox leva a um aumento da expressão do transportador X_{CG}^- fato que pode ser justificado devido ao papel do X_{CG}^- na captação de cistina, um precursor do antioxidante endógeno glutathione cuja principal função diz respeito à manutenção do estado redox ((CONRAD; SATO, 2012; HABIB et al., 2015).

Considerando esse cenário, uma vez que o sistema auditivo está continuamente exposto à excitotoxicidade mediada por glutamato e estresse oxidativo, é razoável propor que as CGCs apresentem uma maquinaria responsável por limitar os danos associados a esses fenômenos por meio da regulação das concentrações extracelulares de glutamato (BOERO et al., 2021; HENDERSON et al., 2006; L. POIRRIER et al., 2010). Nossos dados, conforme anteriormente descrito, corroboram com essa hipótese apontando uma contribuição proeminente do sistema X_{CG}^- de cerca de 70% na captação de glutamato independente de sódio na glia coclear. Em contraste, quando avaliamos o transporte de glutamato em astrócitos do córtex, localizados em uma região do SNC que não está diretamente exposta a estímulos nocivos, observamos uma discreta captação de glutamato independente de sódio de $\approx 3\%$. Coletivamente, esses dados reforçam a hipótese de que a atividade do sistema de transporte de glutamato independente de sódio mediada pelo sistema X_{CG}^- varia entre os tipos celulares, além de estar relacionada à susceptibilidade ao estresse ao qual o tecido é submetido.

5.3 O TRANSPORTADOR X_{CG}^- MEDEIA O TRANSPORTE DE GLUTAMATO EM CÉLULAS GLIAIS DA CÓCLEA

Visto que demonstramos que as CGCs apresentam a atividade de um componente independente de sódio que é responsável por uma expressiva captação de glutamato, buscamos investigar se o efeito observado decorre da atividade do transportador X_{CG}^- . Para tanto, expusemos as células gliais cocleares ao ácido α -aminoadípico (α AA), inibidor seletivo do transportador X_{CG}^- , e à cisteína, um reconhecido substrato do transportador X_{CG}^- (MCBEAN, 2002). Oliveira et al. (2010) demonstraram que a exposição das células gliais retinianas à concentração de $500\mu\text{M}$ de α AA induziu o bloqueio do transporte de glutamato. A partir disso, realizamos a inibição seletiva do transportador X_{CG}^- com α AA ($500\mu\text{M}$), que provocou uma redução de $\approx 75\%$ na captação de glutamato, confirmando que as CGCs apresentam um mecanismo de transporte de glutamato independente de sódio mediado pelo trocador de cistina-glutamato X_{CG}^- .

Somado a isso, considerando a característica de antiporte do transportador X_{CG}^- , o qual realiza o transporte de cist(e)ina e glutamato de acordo com o gradiente, realizamos a alteração do gradiente de concentração incubando as células gliais com cisteína ($500\mu\text{M}$) em meio sem sódio a fim de verificar a atividade isolada do transportador X_{CG}^- frente à incubação com este substrato. Em nossos resultados, observamos que a incubação com cisteína induziu uma redução na captação de glutamato ($\approx 65\%$) indicando que as células gliais cocleares apresentam uma maquinaria sensível à cisteína.

Além disso, com o intuito de descartar um possível efeito sinérgico entre a cisteína e α AA, as células foram expostas a ambos os substratos do transportador X_{CG}^- . Após a exposição, o efeito de inibição da captação de glutamato mostrou-se semelhante ao que foi observado nas células gliais tratadas com α AA e cisteína, isoladamente, reforçando a hipótese de que o X_{CG}^- é o principal responsável pela captação de glutamato independente de sódio em CGCs.

Visto que observamos uma modulação independente sódio na captação de glutamato, buscamos avaliar o efeito da cisteína na liberação de glutamato em CGCs. Em nossos resultados, demonstramos que a

cisteína induziu um aumento expressivo ($\approx 250\%$) na liberação de glutamato. Diante disso, formulamos a hipótese de que, devido a mudança no gradiente de concentração, é possível que o transportador esteja atuando para captar a cisteína fornecida ao sistema e induzindo a liberação de glutamato no meio extracelular. Tais dados sugerem que as células gliais cocleares apresentam um mecanismo de transporte de glutamato independente de sódio que é sensível à cisteína e reforçam a hipótese da atividade do transportador X_{CG}^- nessas células.

Nesse sentido, uma vez observado que as células gliais da cóclea apresentam a atividade do transportador X_{CG}^- , buscamos ratificar nossos resultados a partir da avaliação da expressão deste transportador nessas células. Para tanto, realizamos o ensaio de imunomarcagem no qual observamos, pela primeira vez, que as células gliais cocleares expressam o transportador X_{CG}^- . Embora alguns estudos tenham avaliado a expressão desse transportador na cóclea, nosso trabalho é o primeiro a avaliar a sua expressão a nível celular e sugerir que a atividade desse componente pode ter repercussões funcionais em relação ao transporte de glutamato na via auditiva.

Grande parte dos estudos sobre o sistema X_{CG}^- na cóclea associam o transportador ao seu papel na manutenção do estado redox, devido ao fornecimento de cistina para a manutenção dos níveis intracelulares de GSH. Li, et al (2015) observaram que a diminuição dos genes pró-oxidantes, aliada ao aumento da expressão do gene *Slc7a11*, que codifica o transportador X_{CG}^- , protege os neurônios ganglionares contra a degeneração induzida por lesão oxidativa. Além disso, o mesmo grupo demonstrou que alterações nos níveis de expressão do gene *Slc7a11* influenciam a sobrevivência das células ciliadas submetidas ao dano oxidativo na cóclea (CHEN et al., 2015). Esses dados são promissores no que diz respeito a possíveis implicações do X_{CG}^- contra o estresse oxidativo e reforçam a hipótese de que a atividade do X_{CG}^- pode ser crucial na cóclea devido ao seu papel na manutenção do estado redox. Apesar disso, tais estudos não foram capazes de avaliar a atividade funcional do X_{CG}^- em relação ao transporte de glutamato e demonstrar a localização do transportador a nível celular.

A participação das CGCs na regulação dos níveis extracelulares de glutamato por meio de sistemas de transporte pode ser essencial para a via auditiva, uma vez que as células gliais localizam-se em regiões extra sinápticas (KOHRMAN et al., 2021). No SNC, é bem descrito que em situações patológicas o glutamato pode se difundir para o espaço extra sináptico devido a um *spillover* da fenda sináptica, que resulta de uma baixa densidade ou atividade de transportadores na fenda sináptica (ARMADA-MOREIRA et al., 2020). Como consequência, há uma ativação excessiva de receptores de glutamato expressos em células gliais próximas à sinapse, como os astrócitos, oligodendrócitos, microglia e células de Bergmann que possivelmente desencadeiam danos excitotóxicos nesta região (BERGLES; DIAMOND; JAHR, 1999; MATUTE; DOMERCQ; SÁNCHEZ-GÓMEZ, 2006b; ROSE et al., 2018b; SAAB et al., 2012; ZHANG et al., 2020). Nesse sentido, a presença de transportadores de glutamato nessas regiões, se mostra crucial para evitar a ativação inapropriada de receptores de glutamato devido ao *spillover* do neurotransmissor (BRIDGES et al., 2012; NIE; WENG, 2009).

Na cóclea, assim como no SNC, os receptores AMPA e Cainato estão intrinsecamente envolvidos nos danos excitotóxicos mediados por glutamato (DING et al., 2021; FUJIKAWA et al., 2014; HAYM GREEN et al., 2021; MORTON-JONES; CANNELL; HOUSLEY, 2008; NIEDZIELSKI; WENTHOLD, 1995; RUEL et al., 1999; SEBE et al., 2017). A expressão de AMPA e Cainato já foi observada nos axônios e soma de neurônios do gânglio espiral e, alguns estudos de hibridização *in situ*, forneceram evidências discretas de uma possível localização glial dos receptores AMPA e Cainato (NIEDZIELSKI; WENTHOLD, 1995). Nesse sentido, em um contexto de exposição a altas intensidades sonoras, por exemplo, o aumento na liberação de glutamato na fenda sináptica pode levar ao transbordamento do glutamato para o espaço extra sináptico onde se encontram os receptores glutamatérgicos expressos nas fibras nervosas e células gliais (EYBALIN, 1993; VERKHRATSKY; KIRCHHOFF, 2007). A ativação excessiva dos receptores de glutamato extra sinápticos pode contribuir para quadros de excitotoxicidade e morte celular, fato que ressalta a importância da presença de sistemas de transporte de glutamato em células gliais cocleares capazes de limitar possíveis injúrias excitotóxicas na via auditiva.

Dessa forma, nosso trabalho contribui para a literatura demonstrando que as CGCs apresentam a atividade dos sistemas de transporte de glutamato dependente e independente de sódio, apontando para um possível papel funcional destes sistemas em relação à regulação das concentrações extracelulares de glutamato na cóclea. Além disso, no presente trabalho demonstramos que o transportador X_{CG}^- , contribui de forma significativa para a captação total de glutamato e determinamos pela primeira vez sua expressão em células gliais cocleares.

6. CONCLUSÃO

Demonstramos que as células gliais cocleares apresentam um expressivo sistema de transporte de glutamato independente de sódio que é sensível à α AA e cisteína, reforçando a hipótese de que o transportador X_{CG}^- é responsável pela captação de glutamato. Além disso, demonstramos pela primeira vez a expressão do transportador X_{CG}^- em células gliais cocleares, sugerindo uma possível contribuição deste componente na fisiologia coclear. Dessa forma, o presente trabalho conclui que em culturas primárias de células gliais da cóclea, o transportador de glutamato X_{CG}^- medeia a captação de glutamato independente de sódio.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFFORTIT, Corentin et al. Exacerbated age-related hearing loss in mice lacking the p43 mitochondrial T3 receptor. **BMC biology**, v. 19, n. 1, p. 1-20, 2021.

AKIL, Omar et al. Spiral ganglion degeneration and hearing loss as a consequence of satellite cell death in saposin B-deficient mice. **Journal of Neuroscience**, v. 35, n. 7, p. 3263-3275, 2015.

ALLEN, Nicola J.; LYONS, David A. Glia as architects of central nervous system formation and function. **Science**, v. 362, n. 6411, p. 181-185, 2018.

APPLER, Jessica M.; GOODRICH, Lisa V. Connecting the ear to the brain: molecular mechanisms of auditory circuit assembly. **Progress in neurobiology**, v. 93, n. 4, p. 488-508, 2011.

ARAQUE, Alfonso; NAVARRETE, Marta. Glial cells in neuronal network function. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 365, n. 1551, p. 2375-2381, 2010.

ARMADA-MOREIRA, Adam et al. Going the extra (synaptic) mile: excitotoxicity as the road toward neurodegenerative diseases. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 14, p. 90, 2020.

AVRAHAM, Oshri et al. Satellite glial cells promote regenerative growth in sensory neurons. **Nature communications**, v. 11, n. 1, p. 1-17, 2020.

BANNAI, Shiro. Exchange of cystine and glutamate across plasma membrane of human fibroblasts. **Journal of Biological Chemistry**, v. 261, n. 5, p. 2256-2263, 1986.

BARRES, Barbara A. A new form of transmission?. **Nature**, v. 339, n. 6223, p. 343-344, 1989.

BARRES, Ben A. The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease. **Neuron**, v. 60, n. 3, p. 430-440, 2008.

BASILE, Anthony S. et al. N-Methyl-D-aspartate antagonists limit aminoglycoside antibiotic-induced hearing loss. **Nature medicine**, v. 2, n. 12, p. 1338-1343, 1996.

BEART, P. M.; O'SHEA, RD2013845. Transporters for L-glutamate: an update on their molecular pharmacology and pathological involvement. **British journal of pharmacology**, v. 150, n. 1, p. 5-17, 2007.

BERGLES, Dwight E.; DIAMOND, Jeffrey S.; JAHR, Craig E. Clearance of glutamate inside the synapse and beyond. **Current opinion in neurobiology**, v. 9, n. 3, p. 293-298, 1999.

BOERO, Luis E. et al. Noise Exposure Potentiates Exocytosis From Cochlear Inner Hair Cells. **Frontiers in synaptic neuroscience**, p. 51, 2021.

BRIDGES, Richard J.; NATALE, Nicholas R.; PATEL, Sarjubhai 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, 2012.

BUDAK, Maral et al. Contrasting mechanisms for hidden hearing loss: Synaptopathy vs myelin defects. **PLoS computational biology**, v. 17, n. 1, p. e1008499, 2021.

CALABRESE, Gaetano; MORGAN, Bruce; RIEMER, Jan. Mitochondrial glutathione: regulation and functions. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 27, n. 15, p. 1162-1177, 2017.

CHEN, Ting-Jiun; KUKLEY, Maria. Glutamate receptors and glutamatergic signalling in the peripheral nerves. **Neural regeneration research**, v. 15, n. 3, p. 438, 2020.

CHEN, Y. et al. Bmi1 regulates auditory hair cell survival by maintaining redox balance. **Cell death & disease**, v. 6, n. 1, p. e1605-e1605, 2015.

CHEN, Zhiqiang; KUJAWA, Sharon G.; SEWELL, William F. Functional roles of high-affinity glutamate transporters in cochlear afferent synaptic transmission in the mouse. **Journal of neurophysiology**, v. 103, n. 5, p. 2581-2586, 2010.

CHO, Yukie; BANNAI, Shiro. Uptake of glutamate and cystine in C-6 glioma cells and in cultured astrocytes. **Journal of neurochemistry**, v. 55, n. 6, p. 2091-2097, 1990.

CHRAST, Roman; CASTELO-BRANCO, Gonçalo. The dark side of the brain, myelinating glia in central and peripheral nervous systems. In: **Seminars in cell & developmental biology**. 2021. p. 1-2.

CLEMENTS, John D. et al. The time course of glutamate in the synaptic cleft. **Science**, v. 258, n. 5087, p. 1498-1501, 1992.

CONRAD, Marcus; SATO, Hideyo. The oxidative stress-inducible cystine/glutamate antiporter, system xc⁻: cystine supplier and beyond. **Amino acids**, v. 42, n. 1, p. 231-246, 2012.

DANBOLT, Niels C. Glutamate uptake. **Progress in neurobiology**, v. 65, n. 1, p. 1-105, 2001.

DING, Dalian et al. Excitotoxic damage to auditory nerve afferents and spiral ganglion neurons is correlated with developmental upregulation of AMPA and KA receptors. **Hearing Research**, v. 411, p. 108358, 2021.

DONG, Xiao-xia; WANG, Yan; QIN, Zheng-hong. Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 30, n. 4, p. 379-387, 2009.

EL-BADRY, Mohamed M.; MCFADDEN, Sandra L. Evaluation of inner hair cell and nerve fiber loss as sufficient pathologies underlying auditory neuropathy. **Hearing research**, v. 255, n. 1-2, p. 84-90, 2009.

EYBALIN, M.; PUJOL, R. A radioautographic study of [3H] L-glutamate and [3H] L-glutamine uptake in the guinea-pig cochlea. **Neuroscience**, v. 9, n. 4, p. 863-871, 1983.

EYBALIN, MICHEL. Neurotransmitters and neuromodulators of the mammalian cochlea. **Physiological Reviews**, v. 73, n. 2, p. 309-373, 1993.

EYBALIN, M.; NORENBURG, M. D.; RENARD, N. Glutamine synthetase and glutamate metabolism in the guinea pig cochlea. **Hearing research**, v. 101, n. 1-2, p. 93-101, 1996.

FETONI, Anna Rita et al. Targeting dysregulation of redox homeostasis in noise-induced hearing loss: oxidative stress and ROS signaling. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 135, p. 46-59, 2019.

FOURNIER, M. et al. Implication of the glutamate–cystine antiporter xCT in schizophrenia cases linked to impaired GSH synthesis. **npj Schizophrenia**, v. 3, n. 1, p. 1-7, 2017.

FROSTICK, Simon P.; YIN, Qi; KEMP, Graham J. Schwann cells, neurotrophic factors, and peripheral nerve regeneration. **Microsurgery: Official Journal of the International Microsurgical Society and the European Federation of Societies for Microsurgery**, v. 18, n. 7, p. 397-405, 1998.

FRYE, Mitchell D.; RYAN, Allen F.; KURABI, Arwa. Inflammation associated with noise-induced hearing loss. **The Journal of the Acoustical Society of America**, v. 146, n. 5, p. 4020-4032, 2019.

FUJIKAWA, Taro et al. Localization of kainate receptors in inner and outer hair cell synapses. **Hearing research**, v. 314, p. 20-32, 2014.

FURNESS, David N. et al. Distribution of the glutamate/aspartate transporter GLAST in relation to the afferent synapses of outer hair cells in the guinea pig cochlea. **Journal of the Association for Research in Otolaryngology**, v. 3, n. 3, p. 234-247, 2002.

FURNESS, David N.; LAWTON, D. Maxwell. Comparative distribution of glutamate transporters and receptors in relation to afferent innervation density in the mammalian cochlea. **Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 36, p. 11296-11304, 2003.

FURNESS, David N.; LEHRE, Knut P. Immunocytochemical localization of a high-affinity glutamate-aspartate transporter, GLAST, in the rat and guinea-pig cochlea. **European Journal of Neuroscience**, v. 9, n. 9, p. 1961-1969, 1997.

GALE, Jonathan.; JAGGER, Daniel. Cochlear supporting cells. in Paul Albert Fuchs (ed.), **Oxford Handbook of Auditory Science: The Ear, Oxford Library of Psychology** (2010; online edn, Oxford Academic, 21 Nov. 2012), acessado em out 29, 2022.

GLOWATZKI, Elisabeth et al. The glutamate–aspartate transporter GLAST mediates glutamate uptake at inner hair cell afferent synapses in the mammalian cochlea. **Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 29, p. 7659-7664, 2006.

GLOWATZKI, Elisabeth; FUCHS, Paul A. Transmitter release at the hair cell ribbon synapse. **Nature neuroscience**, v. 5, n. 2, p. 147-154, 2002.

GONÇALVES-RIBEIRO, Joana et al. Glutamate transporters in hippocampal LTD/LTP: not just prevention of excitotoxicity. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 13, p. 357, 2019.

GUITTON, Matthieu J.; DUDAI, Yadin. Blockade of cochlear NMDA receptors prevents long-term tinnitus during a brief consolidation window after acoustic trauma. **Neural plasticity**, v. 2007, 2007.

HABIB, Eric et al. Expression of xCT and activity of system xc⁻ are regulated by NRF2 in human breast cancer cells in response to oxidative stress. **Redox biology**, v. 5, p. 33-42, 2015.

HAKUBA, Nobuhiro et al. Exacerbation of noise-induced hearing loss in mice lacking the glutamate transporter GLAST. **Journal of Neuroscience**, v. 20, n. 23, p. 8750-8753, 2000.

HANANI, Menachem; SPRAY, David C. Emerging importance of satellite glia in nervous system function and dysfunction. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 21, n. 9, p. 485-498, 2020.

HANSEN, Marlan R. et al. Reciprocal signaling between spiral ganglion neurons and Schwann cells involves neuregulin and neurotrophins. **Hearing research**, v. 161, n. 1-2, p. 87-98, 2001.

HAYDON, Philip G. Neuroglial networks: neurons and glia talk to each other. **Current biology**, v. 10, n. 19, p. R712-R714, 2000.

WALIA, Amit et al. reducing auditory nerve excitability by acute antagonism of Ca²⁺-permeable AMPA receptors. **Frontiers in synaptic neuroscience**, p. 34, 2021.

HENDERSON, Donald et al. The role of oxidative stress in noise-induced hearing loss. **Ear and hearing**, v. 27, n. 1, p. 1-19, 2006.

HICKMAN, Tyler T. et al. Synaptic migration and reorganization after noise exposure suggests regeneration in a mature mammalian cochlea. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 1-14, 2020.

HURLEY, Patricia A.; CROOK, Jeremy M.; SHEPHERD, Robert K. Schwann cells revert to non-myelinating phenotypes in the deafened rat cochlea. **European Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 7, p. 1813-1821, 2007.

INQUIMBERT, Perrine et al. Peripheral nerve injury produces a sustained shift in the balance between glutamate release and uptake in the dorsal horn of the spinal cord. **PAIN®**, v. 153, n. 12, p. 2422-2431, 2012.

JESSEN, Kristjan R. Glial cells. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 36, n. 10, p. 1861-1867, 2004.

KIM, Kyunghye X. et al. Vesicular glutamatergic transmission in noise-induced loss and repair of cochlear ribbon synapses. **Journal of Neuroscience**, v. 39, n. 23, p. 4434-4447, 2019.

KOHRMAN, David C. et al. Axon–glia interactions in the ascending auditory system. **Developmental Neurobiology**, v. 81, n. 5, p. 546-567, 2021.

KOPPULA, Pranavi; ZHUANG, Li; GAN, Boyi. Cystine transporter SLC7A11/xCT in cancer: ferroptosis, nutrient dependency, and cancer therapy. **Protein & cell**, v. 12, n. 8, p. 599-620, 2021.

KUPCHIK, Yonatan M. et al. The effect of N-acetylcysteine in the nucleus accumbens on neurotransmission and relapse to cocaine. **Biological psychiatry**, v. 71, n. 11, p. 978-986, 2012.

POIRRIER, AL, et al. Oxidative stress in the cochlea: an update. **Current medicinal chemistry**, v. 17, n. 30, p. 3591-3604, 2010.

LAU, Anthony; TYMIANSKI, Michael. Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. **Pflügers Archiv-European Journal of Physiology**, v. 460, n. 2, p. 525-542, 2010.

LEHRE, Knut P.; DANBOLT, Niels C. The number of glutamate transporter subtype molecules at glutamatergic synapses: chemical and stereological quantification in young adult rat brain. **Journal of Neuroscience**, v. 18, n. 21, p. 8751-8757, 1998.

LEVY, Line M.; WARR, Orpheus; ATTWELL, David. Stoichiometry of the glial glutamate transporter GLT-1 expressed inducibly in a Chinese hamster ovary cell line selected for low endogenous Na⁺-dependent glutamate uptake. **Journal of Neuroscience**, v. 18, n. 23, p. 9620-9628, 1998.

LI, Ao et al. Lysine-specific demethylase 1 inhibitors protect cochlear spiral ganglion neurons against cisplatin-induced damage. **Neuroreport**, v. 26, n. 9, p. 539-547, 2015.

LI-DONG, Zhao et al. Supporting cells—a new area in cochlear physiology study. **Journal of Otology**, v. 3, n. 1, p. 9-17, 2008.

LIU, Jinyun; XIA, Xiaojun; HUANG, Peng. xCT: a critical molecule that links cancer metabolism to redox signaling. **Molecular Therapy**, v. 28, n. 11, p. 2358-2366, 2020.

LIU, Lin et al. Cystine-glutamate antiporter xCT as a therapeutic target for cancer. **Cell Biochemistry and Function**, v. 39, n. 2, p. 174-179, 2021.

LOCHER, Heiko et al. Distribution and development of peripheral glial cells in the human fetal cochlea. **PLoS One**, v. 9, n. 1, p. e88066, 2014.

LONG, Patrick et al. Myelin development, plasticity, and pathology in the auditory system. **Developmental neurobiology**, v. 78, n. 2, p. 80-92, 2018.

MA, Kefeng et al. Disruption of Glutamate Release and Uptake-Related Protein Expression After Noise-Induced Synaptopathy in the Cochlea. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, p. 2127, 2021.

MAHMOUD, Shaimaa et al. Astrocytes maintain glutamate homeostasis in the CNS by controlling the balance between glutamate uptake and release. **Cells**, v. 8, n. 2, p. 184, 2019.

MASSIE, Ann et al. Main path and byways: non-vesicular glutamate release by system xc⁻ as an important modifier of glutamatergic neurotransmission. **Journal of neurochemistry**, v. 135, n. 6, p. 1062-1079, 2015.

PROVENZANO, Matthew J. et al. p75NTR expression and nuclear localization of p75NTR intracellular domain in spiral ganglion Schwann cells following deafness correlate with cell proliferation. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 47, n. 4, p. 306-315, 2011.

MATUTE, Carlos; DOMERCQ, María; SÁNCHEZ-GÓMEZ, María-Victoria. Glutamate-mediated glial injury: mechanisms and clinical importance. **Glia**, v. 53, n. 2, p. 212-224, 2006.

MATUTE, Carlos; DOMERCQ, María; SÁNCHEZ-GÓMEZ, María-Victoria. Glutamate-mediated glial injury: mechanisms and clinical importance. **Glia**, v. 53, n. 2, p. 212-224, 2006.

MCBEAN, Gethin J. Cerebral cystine uptake: a tale of two transporters. **Trends in pharmacological sciences**, v. 23, n. 7, p. 299-302, 2002.

MORAES, Edinaldo R. da S. et al. Determination of glutamate uptake by high performance liquid chromatography (HPLC) in preparations of retinal tissue. **Journal of Chromatography B**, v. 907, p. 1-6, 2012.

MORAN, Megan M. et al. Cystine/glutamate exchange regulates metabotropic glutamate receptor presynaptic inhibition of excitatory transmission and

vulnerability to cocaine seeking. **Journal of Neuroscience**, v. 25, n. 27, p. 6389-6393, 2005.

MORTON-JONES, Rachel T.; CANNELL, Mark B.; HOUSLEY, Gary D. Ca²⁺ entry via AMPA-type glutamate receptors triggers Ca²⁺-induced Ca²⁺ release from ryanodine receptors in rat spiral ganglion neurons. **Cell Calcium**, v. 43, n. 4, p. 356-366, 2008.

MOSER, Tobias; PREDOEHL, Friederike; STARR, Arnold. Review of hair cell synapse defects in sensorineural hearing impairment. **Otology & Neurotology**, v. 34, n. 6, p. 995-1004, 2013.

NIE, Hui; WENG, Han-Rong. Glutamate transporters prevent excessive activation of NMDA receptors and extrasynaptic glutamate spillover in the spinal dorsal horn. **Journal of neurophysiology**, v. 101, n. 4, p. 2041-2051, 2009.

NIEDZIELSKI, Andrew S.; WENTHOLD, Robert J. Expression of AMPA, kainate, and NMDA receptor subunits in cochlear and vestibular ganglia. **Journal of Neuroscience**, v. 15, n. 3, p. 2338-2353, 1995.

OLIVEIRA, Karen R. H. M. et al. Pharmacological characterization of glutamate Na⁺-independent transport in retinal cell cultures: implications in the glutathione metabolism. **Neurochemistry international**, v. 56, n. 1, p. 59-66, 2010.

OWE, Simen Gylderud; MARCAGGI, Païkan; ATTWELL, David. The ionic stoichiometry of the GLAST glutamate transporter in salamander retinal glia. **The Journal of physiology**, v. 577, n. 2, p. 591-599, 2006.

PANGANIBAN, Clarisse H. et al. Noise-induced dysregulation of quaking RNA binding proteins contributes to auditory nerve demyelination and hearing loss. **Journal of Neuroscience**, v. 38, n. 10, p. 2551-2568, 2018.

PANNESE, Ennio. The structure of the perineuronal sheath of satellite glial cells (SGCs) in sensory ganglia. **Neuron glia biology**, v. 6, n. 1, p. 3-10, 2010.

PEREA, Gertrudis; ARAQUE, Alfonso. Glial calcium signaling and neuron–glia communication. **Cell calcium**, v. 38, n. 3-4, p. 375-382, 2005.

PEREA, Gertrudis; NAVARRETE, Marta; ARAQUE, Alfonso. Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. **Trends in neurosciences**, v. 32, n. 8, p. 421-431, 2009.

PEREA, Gertrudis; SUR, Mriganka; ARAQUE, Alfonso. Neuron-glia networks: integral gear of brain function. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 8, p. 378, 2014.

PETTINGILL, Lisa N.; MINTER, Ricki L.; SHEPHERD, Robert K. Schwann cells genetically modified to express neurotrophins promote spiral ganglion neuron survival in vitro. **Neuroscience**, v. 152, n. 3, p. 821-828, 2008.

PUEL, J.-L. et al. Excitatory amino acid antagonists protect cochlear auditory neurons from excitotoxicity. **Journal of Comparative Neurology**, v. 341, n. 2, p. 241-256, 1994.

REYNOLDS, Margaret L.; WOOLF, Clifford J. Reciprocal Schwann cell-axon interactions. **Current opinion in neurobiology**, v. 3, n. 5, p. 683-693, 1993.

ROBERTSON, Donald. Functional significance of dendritic swelling after loud sounds in the guinea pig cochlea. **Hearing research**, v. 9, n. 3, p. 263-278, 1983.

ROSE, Christine R. et al. Molecular and cellular physiology of sodium-dependent glutamate transporters. **Brain research bulletin**, v. 136, p. 3-16, 2018.

ROSE, Christine R. et al. Astroglial glutamate signaling and uptake in the hippocampus. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 10, p. 451, 2018.

RUEL, Jérôme et al. AMPA-preferring glutamate receptors in cochlear physiology of adult guinea-pig. **The Journal of Physiology**, v. 518, n. Pt 3, p. 667, 1999.

SAAB, Aiman S. et al. Bergmann glial AMPA receptors are required for fine motor coordination. **Science**, v. 337, n. 6095, p. 749-753, 2012.

SATO, Hideyo et al. Distribution of cystine/glutamate exchange transporter, system xc⁻, in the mouse brain. **Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 18, p. 8028-8033, 2002.

SCHOUSBOE, Arne et al. Glutamate metabolism in the brain focusing on astrocytes. In: **Glutamate and ATP at the Interface of Metabolism and Signaling in the Brain**. Springer, Cham, 2014. p. 13-30.

SEBE, Joy Y. et al. Ca²⁺-permeable AMPARs mediate glutamatergic transmission and excitotoxic damage at the hair cell ribbon synapse. **Journal of Neuroscience**, v. 37, n. 25, p. 6162-6175, 2017.

SEIB, Todd Michael; PATEL, Sarjubhai Amratbhai; BRIDGES, Richard James. Regulation of the System xc⁻ cystine/glutamate exchanger by intracellular glutathione levels in rat astrocyte primary cultures. **Glia**, v. 59, n. 10, p. 1387-1401, 2011.

SHIH, Andy Y. et al. Cystine/glutamate exchange modulates glutathione supply for neuroprotection from oxidative stress and cell proliferation. **Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 41, p. 10514-10523, 2006.

TAKUMI, Y. et al. Discrete cellular and subcellular localization of glutamine synthetase and the glutamate transporter GLAST in the rat vestibular end organ. **Neuroscience**, v. 79, n. 4, p. 1137-1144, 1997.

TSERGA, Evangelia et al. Auditory synaptopathy in mice lacking the glutamate transporter GLAST and its impact on brain activity. **Progress in brain research**, v. 262, p. 245-261, 2021.

FLORES-MÉNDEZ, Marco; MENDEZ-FLORES, Orquidia G.; ORTEGA, Arturo. Glia plasma membrane transporters: key players in glutamatergic neurotransmission. **Neurochemistry International**, v. 98, p. 46-55, 2016.

VERKHRATSKY, Alexei; KIRCHHOFF, Frank. NMDA receptors in glia. **The Neuroscientist**, v. 13, n. 1, p. 28-37, 2007.

VERMA, Manish; LIZAMA, Britney N.; CHU, Charleen T. Excitotoxicity, calcium and mitochondria: a triad in synaptic neurodegeneration. **Translational neurodegeneration**, v. 11, n. 1, p. 1-14, 2022.

WAN, Guoqiang; CORFAS, Gabriel. Transient auditory nerve demyelination as a new mechanism for hidden hearing loss. **Nature communications**, v. 8, n. 1, p. 1-13, 2017.

WAN, Guoqiang; CORFAS, Gabriel; STONE, Jennifer S. Inner ear supporting cells: rethinking the silent majority. In: **Seminars in cell & developmental biology**. Academic Press, 2013. p. 448-459.

WHITLON, Donna S. et al. Spontaneous association of glial cells with regrowing neurites in mixed cultures of dissociated spiral ganglia. **Neuroscience**, v. 161, n. 1, p. 227-235, 2009.

WISE, Andrew K. et al. Structural and ultrastructural changes to type I spiral ganglion neurons and schwann cells in the deafened guinea pig cochlea. **Journal of the Association for Research in Otolaryngology**, v. 18, n. 6, p. 751-769, 2017.

YU, Hong et al. GLAST deficiency in mice exacerbates gap detection deficits in a model of salicylate-induced tinnitus. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 10, p. 158, 2016.

ZERANGUE, Noa; KAVANAUGH, Michael P. Flux coupling in a neuronal glutamate transporter. **Nature**, v. 383, n. 6601, p. 634-637, 1996.

ZHANG, Xinyue et al. Regulation of microglia by glutamate and its signal pathway in neurodegenerative diseases. **Drug discovery today**, v. 25, n. 6, p. 1074-1085, 2020.

ANEXO I

Hearing Research
**COCHLEAR GLIAL CELLS MEDIATES GLUTAMATE UPTAKE THROUGH A
 SODIUM-INDEPENDENT TRANSPORTER**
 --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	HEARES-D-22-00331
Article Type:	Research Paper
Keywords:	glutamate transport; cochlea; glial cells; xCG- system
Corresponding Author:	Karen Oliveira, Ph.D Federal University of Para Belem, BRAZIL
First Author:	Luana Carvalho Martins
Order of Authors:	Luana Carvalho Martins
	Mateus dos Santos Silva
	Jade Da Costa Rodrigues
	Luana Ketlen Reis Leão da Penha
	Adelaide da Conceição Fonseca Passos
	Suellen Alessandra Soares de Moraes
	Evander de Jesus Oliveira Batista
	Anderson Manoel Herculano, PhD
	Karen Oliveira, Ph.D
Abstract:	As L-Glutamate is the primary excitatory neurotransmitter in the mammalian cochlea,

ANEXO II

PARECER 140-13

Projetos: Efeito da adenosina no transporte de glutamato em cultura de astrócitos e tecido hipotalâmico em condições de hiperosmolaridade

Coordenador: Prof. Dr. Anderson Manoel Herculano

Área Temática: Neurociências Vigência: 01/2013 a 01/2015

Nº no CEPAE-UFPA: 140-13

O projeto acima identificado foi avaliado pelo Comitê de Ética Em Pesquisa Com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Pará (CEPAE). O tema eleito para a investigação é de alto teor científico justificando a utilização do modelo animal proposto. Os procedimentos experimentais utilizados seguem as normas locais e internacionais para o tratamento e manipulação de animais de experimentação. Portanto, o CEPAE, através de seu presidente, no uso das atribuições delegadas pela portaria Nº 3988/2011 do Reitor da Universidade Federal do Pará, resolve APROVAR a utilização de animais de experimentação nas atividades do projeto em questão, no período de vigência estabelecido. As atividades experimentais fora do período de vigência devem receber nova autorização deste comitê.

Belém, 28 de Dezembro de 2012

Wallace Gomes Leal
Prof. Dr. Wallace Gomes Leal
Presidente do CEPAE-UFPA