

AGONISTA CANABINOIDE WIN MODULA A MORTE DE CÉLULAS DA RETINA DE RATOS NEONATOS EM CULTURA DE FORMA DEPENDENTE DE CASPASE-3 CLIVADA

Autores Gustavo Stelzer ¹, Thalita Mázala ³, Ana Lúcia Ventura ¹, Elizabeth Giestal de Araujo ¹, Guilherme Rapozeiro França ²

Instituição ¹ UFF - Universidade Federal Fluminense (R. Alexandre Moura, 8 - São Domingos, Niterói - RJ), ² UNIRIO - Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (R. Frei Caneca, 94 - Centro, Rio de Janeiro - RJ), ³ FTESM - Fundação Técnico-Educacional Souza Marques (Av. Ernani Cardoso, 335 - Cascadura, Rio de Janeiro - RJ)

Resumo

Introdução

O sistema endocanabinoide (SEC) é composto pelos endocanabinoides, enzimas de síntese e degradação, transportadores de membrana e os receptores canabinoides. Classicamente, o SEC é responsável pela modulação da neurotransmissão através de sinalização retrógrada a partir do neurônio pós-sináptico, reduzindo a liberação de neurotransmissores por exocitose. Apesar de serem amplamente associados com a diferenciação e neuroproteção, dados recentes do nosso grupo sugerem que os agonistas canabinoides induzem a morte celular na retina.

Objetivo

Avaliar e caracterizar os efeitos do tratamento com o agonista WIN 55-212,2 sob a morte celular, sobrevida, proliferação em culturas de células de retina de ratos neonatos.

Métodos

Culturas de células de ratos neonatos da linhagem Lister-hooded foram tratadas em diferentes tempos de cultivo com WIN 55-212,2 (agonista não-seletivo dos receptores canabinoides) e AM 251 (agonista inverso do receptor CB1). Após o tratamento, foram realizados experimentos de viabilidade celular (MTT), incorporação de iodeto de propídeo (IP), incorporação de [³H]-timidina e imunocitoquímica. Os dados foram normalizados em relação aos grupos controle como média ± E.P.M. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o teste One-way ANOVA com pós-teste Bonferroni. Este trabalho foi aprovado pelo comitê de ética, protocolo nº 726, CEUA-UFF.

Resultados

Em culturas P1C1, WIN 1 µM induziu um aumento de 10,8 % na viabilidade celular ($p < 0,001$) (N=6). Já em P1C5, WIN 1 µM diminuiu 16,1 % a viabilidade celular ($p < 0,0001$) (N=4), efeito que foi totalmente bloqueado pelo antagonista do CB1R, AM251 1 µM (N=4). Por outro lado, em culturas P1C1 tratadas com WIN 1 µM, não houve bloqueio do aumento de viabilidade celular pelo AM251 (N=3). Culturas tratadas com WIN 1 µM em P1C1 e P1C5 foram submetidas ao ensaio de incorporação de IP. Em P1C1, WIN diminuiu a incorporação de IP em 52,4 % (N=1). Já em P1C5, WIN aumentou a incorporação de IP em 96 % ($p < 0,0001$) (N=3). Não houve efeito do WIN sobre a incorporação de [³H]-timidina (N=2) e nem alterações na imunofluorescência para PCNA em P1C1, logo a proliferação de progenitores retinianos não está sendo afetada. Imunofluorescência com neurofilamento-L e caspase-3 clivada em P1C5 após o tratamento com WIN não mostrou co-localização entre as duas marcações.

Conclusão

Nossos resultados sugerem que a ativação de CB1R pode induzir a morte por apoptose de células não-neuronais da retina de ratos neonatos ou induzir aumento de sobrevida, de forma dependente do dia de cultivo celular.

Apoio Financeiro

PRONEX-CNPq; CAPES; CNPq; FAPERJ e PROP-UFF.

Palavras-chaves: retina, morte celular, canabinoide

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DO TRANSPORTADOR DE GABA NAS PREPARAÇÕES DE TECIDO RETINIANO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECÇÃO DE FLUORESCÊNCIA

Autores Edinaldo Moraes ¹, Mateus Santos-Silva ¹, Alan Araújo Grisólia ¹, Luana Leão ¹, Danielle Valente Braga ¹, Carlomagno Bahia ¹, Suellen Moraes ¹, Adelaide Passos ^{1,1}, Evander Batista ¹, Anderson Herculano ¹, Karen Herculano Oliveira ¹

Instituição ¹ UFPA - UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ (AVENIDA PERIMETRAL - TERRA FIRME)

Resumo

Introdução

O ácido gama-aminobutírico (gaba) é o principal neurotransmissor inibitório do Sistema Nervoso Central (SNC), incluindo a retina. Dessa forma, a avaliação da captação desse neurotransmissor é de fundamental importância para diversos modelos experimentais em neurociência, pois os transportadores envolvidos no processo, os GATs, são as principais vias de transportes de GABA no sistema nervoso central. Alterações em sua atividade estão envolvidas com várias doenças neurológicas, incluindo retinopatias

Objetivo

Desenvolver metodologia analítica para quantificar a captação de GABA em tecido nervoso bem como caracterizar a cinética de transporte de GABA

Métodos

Foram utilizadas retinas íntegras de embrião de galinha (White leghorn) (E7), de acordo com o Comitê de Ética local (CEUA N° 9823240621). As preparações de tecido retiniano foram incubadas em concentrações conhecidas de GABA (50-1000 µM) por 30 minutos, e os níveis do neurotransmissor derivado de o-ftaldeído (OPA) no meio de incubação foram medidos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), após validação criteriosa estabelecida pela ANVISA E FDA. Os dados foram corrigidos pelo valor de proteína dosados pelo método de Bradford. Foi utilizado ANOVA de 1 via seguido do pós-teste de Tukey para análise estatística. Os valores de dados cinéticos foram obtidos com o auxílio do programa GraphPad Prism, V5.0. As retinas foram incubadas com gaba na concentração de 100 µM nos demais procedimentos (sódio dependente, frente ao bloqueador ácido nipecótico e dependência de temperatura)

Resultados

Tal mecanismo foi amplamente dependente do Na⁺ e de temperatura (foi reduzida em 80% na ausência do íon sódio. Dados expressos em porcentagem do controle e redução de 80 % da captação de gaba em temperatura de 6 °C e na temperatura de 0 °C inibiu completamente, comparados ao controle (37 °C) *p < 0.05, **p < 0.01 vs. Nas diferentes concentrações do bloqueador ácido nipecótico (2.5 e 5 mmolar), os resultados demonstram uma redução de 60% da captação do neurotransmissor em ambas as concentrações *p < 0.05 vs controle.

Conclusão

Além de ser determinada a caracterização cinética de GATs, conclui-se que o método desenvolvido é de alta sensibilidade para quantificar gaba no SNC.

Apoio Financeiro

UFPA

Palavras-chaves: GAT, GABA , CLAE

EFEITO ANTICONVULSIVANTE DA ASSOCIAÇÃO ENTRE B-CARIOFILENO E PREGABALINA EM MODELO DE CRISES CONVULSIVAS INDUZIDAS POR PTZ EM RATOS

Autores Karine Gabriela da Costa Sobral ¹, Tuane Bazanella Sampaio ^{1,2}, Bruna Neuberger ¹, Fernanda Kulinski Mello ¹, Michele Pereira Mallman ¹, Mauro Schneider Oliveira ¹

Instituição ¹ UFSM - Universidade Federal de Santa Maria (Santa Maria, RS, Brasil), ² UNICENTRO - Universidade Estadual do Centro-Oeste do Paraná (Guarapuava, PR, Brasil)

Resumo

Introdução

A epilepsia é uma doença neurológica crônica caracterizada por crises epiléticas recorrentes. No entanto, os anticonvulsivantes atuais são ineficazes em quase um terço dos pacientes além de causar efeitos adversos. O beta-cariofileno é um agonista dos receptores canabinoides do tipo 2 que exibe atividades antioxidantes, anti-inflamatórias e neuroprotetoras. A pregabalina é um anticonvulsivante usado como adjuvante no tratamento da epilepsia.

Objetivo

Uma vez que a resistência aos medicamentos anticonvulsivantes é cada vez mais frequente em pacientes com epilepsia, o objetivo do presente estudo foi avaliar se a associação entre o beta-cariofileno e a pregabalina apresentava efeito anticonvulsivante em um modelo de crises convulsivas induzida por pentilenotetrazol (PTZ) em ratos. Além disso, foi avaliado o possível efeito neuroprotetor da associação farmacológica em marcadores moleculares no córtex frontal.

Métodos

Para tanto, ratos Wistar machos adultos foram submetidos a cirurgia estereotáxica para implantação de um eletrodo para conexão ao aparelho de eletroencefalograma. Os animais foram organizados em 8 grupos onde receberam os seguintes tratamentos: (i) beta-cariofileno 100 mg / kg, i.p. ; (ii) pregabalina 40 mg / kg, i.p. ; (iii) PTZ 60 mg / kg, i.p. ; e / ou seus veículos com intervalo de 30 minutos entre cada administração e observados por 15 minutos após o último tratamento. Latência para crises mioclônicas, tônico-clônicas, duração e pontuação das crises foram medidas (CEUA-UFSM nº 7405310519/2019).

Resultados

Nossos resultados demonstraram que o beta-cariofileno em combinação com pregabalina aumenta a latência para o início das crises mioclônicas e tônico-clônicas induzidas por PTZ, bem como reduz a duração e o escore dessas crises. Esses dados foram corroborados pelo registro eletroencefalográfico. Em relação às análises moleculares, as crises epiléticas induzidas por PTZ causaram uma redução nos níveis do fator 2 relacionado ao eritroide 2 (Nrf2), que não foi evitada pelo tratamento combinado de beta-cariofileno com pregabalina. Digno de nota, níveis reduzidos de proteína glial fibrilar ácida (GFAP), c-Fos e 3-NT foram observados em animais que receberam ambos os tratamentos.

Conclusão

Nossos resultados sugerem um possível efeito aditivo da associação do beta-cariofileno com a pregabalina frente as crises convulsivas induzidas por PTZ em ratos. No entanto, estudos adicionais são necessários para melhor investigar os mecanismos envolvidos e seus componentes subjacentes.

Apoio Financeiro

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (#304708/2015-1 e #308011/2019-8).

Palavras-chaves: Canabinoides, epilepsia, neuroproteção

EXPOSIÇÃO A ALTAS DOSES DE AMOXICILINA CAUSA MUDANÇAS COMPORTAMENTAIS E DE ESTRESSE OXIDATIVO EM PEIXE-ZEBRA JOVENS - EXPOSURE TO A HIGH DOSE OF AMOXICILLIN CAUSES BEHAVIORAL CHANGES AND OXIDATIVE STRESS IN YOUNG ZEBRAFISH

Autores Rafael Orestes Canarim ¹, Isabela da Silva Lemos ¹, Gabriela Candiottto ¹, Camila Pezente Dal Toé ¹, Débora Dagostin Casagrande ¹, Julia Cabral ¹, Emilio Luiz Streck ¹

Instituição ¹ Unesc - Universidade do Extremo Sul Catarinense (Av. Universitária, 1105 - Universitário, Criciúma - SC, 88806-000)

Resumo

Introdução

O transtorno do espectro autista (TEA) é composto por um grupo de transtornos do neurodesenvolvimento com início precoce, os quais são caracterizados por comprometimento nas habilidades sociais e de comunicação. O TEA é descrito como uma síndrome comportamental com múltiplas etiologias, que pode apresentar déficits neurobiológicos, genéticos e psicológicos. Estudos demonstram que o uso prolongado de antibióticos pode causar mudanças na microbiota intestinal seguida de alterações neuroendócrinas, o que leva a mudanças comportamentais. De fato, estudos prévios demonstraram que doses elevadas de amoxicilina podem alterar os parâmetros comportamentais em modelos animais de murinos.

Objetivo

Avaliação de parâmetros de estresse oxidativo em peixe-zebra submetidos a um modelo de transtorno do espectro autista induzido por amoxicilina.

Métodos

Esse projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNESC sob número 058/2019/1. O modelo foi induzido através de uma dose subletal de amoxicilina de 100 mg/L por 7 dias. A dose se baseia na quantidade máxima de exposição recomendada pela Diretriz nº 203 da OCDE para testes de toxicidade aguda em peixes (OCDE 1992). Para isso, foram utilizados 66 animais, divididos em grupo controle (n= 30), não exposto ao antibiótico, e grupo exposto ao antibiótico (n=36), já contabilizando a mortalidade de 20%. Após os 7 dias de exposição, todos os animais sofreram eutanásia por tricafina dissolvida em água com concentração de 160 mg/L, com posterior dissecação do cérebro total para análises de estresse oxidativo. Todas as amostras foram armazenadas em freezer -80°C.

Resultados

Foi encontrado no grupo exposto à amoxicilina, uma diminuição significativa no conteúdo de sulfidril, da atividade enzimática da catalase e um aumento significativo da atividade enzimática superóxido dismutase quando comparado ao grupo controle. Nas análises dos níveis de DCF e TBA-RS, que medem quantidade de espécies reativas e dano lipídico, respectivamente, não foram encontradas alterações significativas.

Conclusão

Foi possível observar um efeito no Sistema Nervoso Central relacionado à exposição à amoxicilina, o qual é um antibiótico de amplo espectro, o que se sugere uma relação do eixo intestino-cérebro e o comportamento autista. Dessa forma, esses achados contribuem para o melhor entendimento dos mecanismos relacionados à toxicidade e psicofarmacologia da amoxicilina, principalmente para a caracterização de um novo modelo animal para TEA, o peixe-zebra.

Apoio Financeiro

FAPESC, CNPq, CAPES, UNESC.

Palavras-chaves: Autismo, Estresse oxidativo, Amoxicilina, Peixe-zebra

CANABINOIDES INDUZEM A MORTE DE CÉLULAS DE MÜLLER DE RETINA EMBRIONÁRIA DE GALINHA EM CULTURA: ENVOLVIMENTO DA CASPASE-3 E JNK

Autores Guilherme Rapozeiro França ^{1,2}, Thayane Martins Silva ², Ana Lucia Marques Ventura ²

Instituição ¹ UNIRIO - Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (Frei Caneca, 94. Centro, Rio de Janeiro, RJ.), ² UFF - Universidade Federal Fluminense (R. Alexandre Moura, 8 - São Domingos, Niterói - RJ, Bloco M)

Resumo

Introdução

Embora o sistema canabinoide seja responsável pela modulação da neurotransmissão sináptica através de sinalização retrógrada do neurônio pós-sináptico que reduz a liberação de neurotransmissores, outras ações também podem ser relacionadas aos canabinoides como proliferação, diferenciação, sobrevivência, plasticidade e morte celular. Dados anteriores do nosso grupo revelaram que a ativação de receptores CB1 e CB2 induzem a morte de progenitores de glia de Müller provenientes da retina embrionária de galinha em cultura. Um fenômeno que foi dependente de receptores purinérgicos do tipo P2X7.

Objetivo

Investigar o efeito de canabinoides sobre a viabilidade celular em culturas de células de retina de aves mais diferenciadas e as vias de sinalização ativadas por estes sinalizadores.

Métodos

Este trabalho foi desenvolvido com aprovação do comitê de ética CEUA-UNIRO 2016.02. Células de retina embrionária de galinha com 7-9 dias de desenvolvimento foram dissociadas e mantidas entre 8 e 15 dias em cultura. As células foram tratadas por 24 horas com WIN-55,212-2 (WIN, agonista não seletivo de receptores CB1 e CB2), KML29 (inibidor da MAGL que aumenta a concentração do endocanabinoide 2-AG), AM251 e PF-514273 (inibidores de CB1R), AM630 e SB144528 (inibidores de CB2R). Ensaio de viabilidade celular por MTT, imunofluorescência e western blotting foram realizados. Os dados foram normalizados em relação aos grupos controle como média $\pm$ E.P. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o teste One-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni. $p < 0,05$ foram considerados significativos.

Resultados

Resultados: Culturas de retina de embriões com 9 dias e mantidas por 12 dias (E9C12) foram tratadas com WIN 1 μ M e KML29 10 μ M durante 24 horas e submetidas ao ensaio de viabilidade celular por MTT. Ambos reduziram a viabilidade celular em $\sim 41,8\% \pm 2,5$ ($n=4$) e $\sim 30\%$ ($n=1$), respectivamente. Nenhum dos antagonistas utilizados inibiu o efeito de WIN sobre a morte celular. Culturas de E9C12 tratadas com WIN, fixadas e marcadas por imunofluorescência mostraram um aumento na marcação para caspase-3 clivada em células positivas para 2M6, um marcador de glia de Müller de aves e PCNA (antígeno nuclear de células proliferativas). Mudanças consistentes na morfologia glial foram observadas, como o arredondamento das células e o colapso da rede de alfa-tubulina no citoplasma. Extratos de culturas tratadas com WIN submetidos ao ensaio de western blotting para a detecção de fosfo-JNK e fosfo-p38, duas proteínas da família das MAPKs, mostraram que WIN induz aumento de $\sim 327\%$ ($n=2$) no conteúdo de fosfo-JNK, mas não nos níveis de fosforilação da p38.

Conclusão

Conclusão: Nossos resultados sugerem que além de progenitores tardios, canabinoides também podem induzir a morte da glia de Müller mais diferenciada em cultura, com a participação da via da JNK e da caspase-3, mas de forma independente de receptores CB1 e CB2.

Apoio Financeiro

Capes, FAPERJ, PROP UFF, CNPq.

Palavras-chaves: Canabinoides, Morte Celular, Glia de Müller

EFEITO AGUDO DA SINVASTATINA NO COMPORTAMENTO SOCIAL EM UM MODELO ANIMAL DE AUTISMO

Autores Rosiane Ronchi Nascimento Costa ¹, Jaime Lin ¹, Maiara de Aguiar Costa ¹, Victória Linden Rezende ¹, João Victor Folle ¹, Bruna De Andrade Flauzino ¹, Caroline Pacheco Rodrigues ¹, Mariana Sebutal Milverstedt ¹, Cinara Ludivig Golçalves ¹

Instituição ¹ UNESC - UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE (Av. Universitária, 1105, Universitário, Criciúma - SC)

Resumo

Introdução

O transtorno do espectro autista (TEA) trata-se de um comprometimento persistente na interação e reciprocidade social associadas à presença de comportamentos restritos, repetitivos e estereotipados. Acredita-se que um desequilíbrio do metabolismo do colesterol levaria a um impacto profundo na neurotransmissão, a perda sináptica e a um prejuízo na formação de espinhas dendríticas que poderiam responder por diversos sintomas encontrados em pacientes com TEA.

Objetivo

Avaliar a relação do metabolismo do colesterol e os efeitos da sinvastatina no neurodesenvolvimento de um modelo animal de TEA analisando os parâmetros comportamentais

Métodos

Modelo animal de TEA por indução através administração de ácido valpróico (VPA) pré-natal. No décimo segundo dia de gestação, as ratas Wistar prenhas receberam 500mg/kg de VPA (grupo VPA) ou salina (grupo SAL), via intraperitoneal. Após o desmame, no 21º dia, os animais foram subdivididos em 4 grupos. **I)** Grupo que receberam SAL na gestação, e SAL no período pós-natal (PN); **II)** Grupo que receberam SAL na gestação, e Sinvastatina (SVT) no período PN; **III)** Grupo que receberam VPA na gestação, e SAL no período PN e; **IV)** Grupo que receberam VPA na gestação, e SVT no período PN. A SVT foi administrada 1 vez ao dia, durante 14 dias. Logo após, foram realizados os testes comportamentais. Os dados foram analisados pelo teste ANOVA de duas vias, seguido do teste Duncan. Os dados foram expressos em desvio padrão da média (n= 10-12). O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Uso de Animais da UNESC (protocolo 49/2020)

Resultados

O grupo SAL+SVT apresentou níveis elevados de colesterol plasmático ($112,8 \pm 4,94$, $p < 0,05$) comparado ao grupo controle. No teste de campo aberto, houve diminuição no número de cruzamentos no grupo VPA ($42,1 \pm 6,04$, $p = 0,07$), no grupo VPA+SVT ($32,6 \pm 5,44$, $p < 0,05$) comparado ao grupo controle; e no número de levantadas o grupo VPA+SVT houve diminuição significativa ($9,7 \pm 2,14$, $p < 0,05$) comparado a todos os grupos. Para avaliar o comportamento ansioso, realizou-se o teste de *Marble burying*, não houve diferença significativa. No teste de interação social, utilizando o teste das 3 câmaras, o tempo total de interação com o rato 1, o grupo VPA apresentou uma diminuição ($80,9 \pm 13,43$, $p < 0,05$) e o grupo VPA+SVT apresentou aumento significativo ($161,6 \pm 2,8$, $p = 0,08$) comparados ao grupo controle; Na latência do 1º encontro, os animais VPA+SVT tiveram uma diminuição ($38,36 \pm 9,4$, $P < 0,05$) quando comparados ao grupo VPA, e os animais VPA apresentaram aumento ($183,3 \pm 43,46$, $p = 0,06$) comparados ao grupo controle. No número de encontros com o Rato 1, os animais VPA apresentaram uma diminuição significativa ($13,9 \pm 2,12$, $p < 0,05$) quando comparados ao grupo controle

Conclusão

Os grupos expostos a VPA apresentam alterações no comportamento social e exploratório e a exposição pós-natal a SVT parece aumentar este prejuízo.

Apoio Financeiro

CNPq; CAPES; FAPESC; UNESC.

Palavras-chaves: Autismo, metabolismo, neurodesenvolvimento

A GLUTATIONA MODULA OS NÍVEIS EXTRACELULARES DE ADENOSINA POR UM VIA INDEPENDENTE DE TRANSPORTADOR: POSSÍVEL FUNÇÃO SINALIZADORA?

Autores Mateus dos Santos Silva ¹, Luana Martins Carvalho ¹, Caroline Araújo Lima ¹, Danielle Valente Braga ¹, Luana Ketlen Reis Leão ¹, Adelaide Fonseca Passos ¹, Evander de Jesus Oliveira Batista ¹, Karen Renato Herculano Matos Oliveira ¹, Anderson Manoel Herculano ¹

Instituição ¹ UFPA - Universidade Federal do Pará (Rua Augusto Correa, 01, Guamá, Belém)

Resumo

Introdução

Além da sua função clássica como antioxidante, a glutatona (GSH) tem despontado como um gliotransmissor, capaz de evocar ondas de cálcio no citosol de células gliais e modular a liberação de neurotransmissores. A adenosina (ADN) é um sinalizador liberado por astrócitos, cujos níveis extracelulares são críticos para determinar a sobrevivência ou a morte celular. Entretanto, os mecanismos que regulam o efluxo de ADN ainda são pouco elucidados, o que limita a compreensão de como esse fenômeno pode ser modulado em contextos fisiológicos ou patológicos

Objetivo

Uma vez que a GSH regula os níveis citosólicos de cálcio, e que esse fenômeno está relacionado com a liberação de ADN, a hipótese do presente trabalho é que a glutatona modula a liberação de adenosina por astrócitos

Métodos

Foram realizadas culturas primárias de astrócitos corticais de camundongos neonatos Balb/C (P1-P4). As células gliais foram mantidas em DMEM+10% Soro Bovino Fetal por 12-15 dias em uma estufa de CO₂ (37°C, 5%CO₂/95%O₂). Para os ensaios de liberação de ADN, os astrócitos foram incubadas por 20 minutos em solução contendo GSH (1, 5 ou 10 mM) e/ou dipiridamol, um inibidor do transportador equilibrativo de adenosina (DIP, 10µM) diluídos em tampão Hank. Os níveis extracelulares de ADN foram quantificados por Cromatografia Líquida de Alta Eficácia (CLAE) acoplada ao detector de UV. Os dados foram corrigidos pela quantidade de proteína dosadas pelo método de Bradford. Foi utilizado o ANOVA de 1 via seguido do pós-teste de Tukey para análise estatística, considerando-se p<0.05 como significativo

Resultados

Nossos resultados mostram que a GSH diminui em $\cong 50 \pm 11\%$ a liberação de adenosina nas três concentrações utilizadas (CTRL: $100 \pm 16\%$ vs GSH 1mM*: $52 \pm 11\%$ vs 5mM*: $56 \pm 8\%$ vs 10mM*: $54 \pm 10\%$. n:9. *p<0.001 vs CTRL). A co-incubação dos astrócitos com GSH e dipiridamol, revelou um efeito sinérgico destes dois compostos (CTRL: $100 \pm 16\%$ vs GSH 1mM*: $52 \pm 11\%$ vs DIP: $78 \pm 7\%$ vs GSH+DIP*: $29 \pm 5\%$. n:9, *p<0.001 vs CTRL, #p<0.001 vs GSH), sugerindo que o efeito da GSH foi mediado por uma via independente dessa classe de transportadores

Conclusão

Desse modo, concluímos que a GSH é capaz de modular os níveis extracelulares de ADN e que um aumento na concentração extracelular de glutatona pode atuar como um sinal que regula a liberação de adenosina, podendo ter uma consequência para a fisiologia do sistema nervoso.

Apoio Financeiro

Agradecemos a CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro.

Palavras-chaves: Glutatona, Glia, Adenosina

AValiação Imuno-Histoquímica da Microgliose Induzida por Doses Repetidas de Lipopolissacarídeo e Tratadas com Nanopartículas de HDL-Indometacina.

Autores MATHEUS LUCAS MEIRELES FRANKLIN ¹, LUAN OLIVEIRA FERREIRA ¹, GERSON MACIEL COELHO ¹, ARNALDO JORGE MARTINS-FILHO ², EDMAR TAVARES da COSTA ¹, ELIZA SUMI YAMADA ¹, DIELLY CATRINA FAVACHO LOPES ¹

Instituição ¹ LaNEx - Laboratório de neuropatologia experimental (Hospital universitário João de Barros Barreto, Universidade Federal do Pará (UFPA), Belém, Pará, Brasil.), ² IEC - INSTITUTO EVANDRO CHAGAS (Ministério da saúde, Ananindeua, Pará 67030-000, Brasil)

Resumo

Introdução

As doenças neurodegenerativas têm como uma de suas principais características a inflamação. O papel das micróglia neste processo é de fundamental importância, já que as citocinas inflamatórias secretadas por estas células levam à quebra de homeostase do microambiente neuronal. Nesse sentido, o uso de anti-inflamatórios não esteroides tornam-se uma opção terapêutica no controle da ativação microglial (microgliose).

Objetivo

Desta forma, objetivamos avaliar qualitativamente a morfologia da micróglia em modelo de neuroinflamação *in vivo* induzido por lipopolissacarídeo (LPS) e tratados com hidróxido duplo lamelar (HDL) contendo indometacina (INDO).

Métodos

Assim, 64 ratos adultos da linhagem Wistar (10 semanas, 260 ± 20g) foram divididos em 8 grupos experimentais (n = 8 animais/grupo): a) Salina(SAL + SAL); b) SAL + INDO; c) SAL + HDL-vazio; d) SAL + HDL-INDO; e) LPS + SAL; f) LPS + INDO; g) LPS + HDL-vazio; h) LPS + HDL-INDO. Foram aplicadas doses de LPS em dias alternados por 5 dias (total de 3 doses) e o tratamento farmacológico de HDL e indometacina foi realizado em dias alternados intercalando os dias das aplicações de LPS. A indometacina foi administrada por gavagem. Ao final, os animais foram eutanasiados, o cérebro coletado, processado e, então, foi realizada a análise imuno-histoquímica com anticorpo primário anti-Iba1.

Resultados

Os resultados obtidos pelos grupos (SAL + [SAL; INDO; HDL-vazio; e HDL-INDO]) foram qualitativamente equivalente para a marcação de células Iba1. Com ramificações prolongadas e estreitas e soma reduzido; já pelos grupos que receberam somente LPS (LPS + SAL e LPS + HDL-vazio) houve aumento qualitativo de células Iba1+, com poucas ramificações, espessamento das projeções e aumento do soma; enquanto que, apesar dos grupos que receberam LPS e indometacina (LPS + INDO e LPS + HDL-INDO) apresentarem discreto aumento qualitativo no número de células Iba+, estas possuíam prolongamentos delgados e soma reduzido, sugerindo controle do processo inflamatório induzido por LPS.

Conclusão

Em resumo, a utilização da indometacina em processos neuroinflamatórios que, em geral, tendem a desencadear ou agravar doenças neurodegenerativas demonstrou ser uma alternativa terapêutica válida por reduzir a atividade microglial.

Apoio Financeiro

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ

Palavras-chaves: Micróglia, Tratamento, Neuroinflamação

Alterações nos níveis extracelulares dos neurotransmissores GABA e glutamato no encéfalo de camundongos infectados por *Plasmodium berghei* ANKA

Autores Renato Lima ¹, Nívia Mendes ¹, Brenda Ataíde ¹, Mateus Silva ¹, Caroline Lima ¹, Luana Martins ¹, Luana Leão ¹, Karen Oliveira ¹

Instituição ¹ UFPA - Universidade Federal do Pará (R. Augusto Corrêa, 01 - Guamá, Belém - PA, 66075-110)

Resumo

Introdução

A malária cerebral (MC) é uma complicação severa resultante da infecção por *Plasmodium falciparum*. Apesar de alterações imunológicas e morfológicas serem descritas como relevantes na etiologia dessa condição, pouco se sabe sobre alterações nos níveis extracelulares de neurotransmissores como GABA e glutamato (Glu), responsáveis pelo balanço excitatório/inibitório do sistema nervoso, e sua participação na progressão da MC.

Objetivo

Assim, o objetivo do trabalho foi avaliar temporalmente os NE de GABA e Glu no encéfalo de animais induzidos ao quadro de malária cerebral.

Métodos

Para isso, usou-se camundongos albino Suíço (6-8 semanas) inoculados por via intraperitoneal com 10^6 de eritrócitos parasitados por *Plasmodium berghei* (PbA) ANKA, de acordo com o comitê de ética local (Nº611241117). O quadro de MC experimental foi avaliado pela contagem da parasitemia e por alterações comportamentais aferidas pelo Rapid Murine Coma and Behavior Scale (RMCBS). Para dosagem dos NE de GABA e Glu, os encéfalos dos animais foram coletados no 5º, 7º e 12º dia pós-infecção (d.p.i), lavados e incubados com 1 mL de tampão Hank por 20 minutos. Os níveis de GABA e Glu foram quantificados por Cromatografia Líquida de Alta Eficácia (CLAE). Os dados foram analisados pelo software Graphpad 8.0 e BioEstat 5.0, sendo usado ANOVA de 1-via seguido do pós-teste de Tukey para dosagem, e ANOVA de 2-vias seguido do pós-teste de Bonferroni para a parasitemia e os testes comportamentais. Os resultados estão expressos como Média±Desvio Padrão, nos dados bioquímicos e da parasitemia, e Média±Erro Padrão, para análise comportamental e considerou-se diferença quando o valor de $p < 0.05$.

Resultados

Como resultados, a parasitemia aumentou ao longo dos dias pós-infecção mas manteve níveis baixos condizentes com quadro de MC (3º d.p.i: $1,32 \pm 0,68\%$; 5º d.p.i: $5,51 \pm 3,78\%$; 7º d.p.i: $8,62 \pm 6,61\%$; 9º d.p.i: $9,65 \pm 5,16\%$, 12º d.p.i: $9,02 \pm 3,34\%$, $*p < 0,01$ vs 3º d.p.i). Quanto ao RMCBS, os animais infectados com PbA apresentaram alterações comportamentais em relação ao controle (5º d.p.i: CTRL $18 \pm 0,3$, grupo PbA $14 \pm 0,6^*$; 7º d.p.i: CTRL $17 \pm 0,8$, PbA $12 \pm 0,8^*$; 12º d.p.i: CTRL 17 ± 2 , PbA $10 \pm 0,8^*$; $*p < 0,05$ vs CTRL), corroborando com os sinais clínicos ligados a infecção. A dosagem dos níveis extracelulares de GABA demonstrou um aumento transiente de 300% no 5º d.p.i, que foi reestabelecido aos níveis do controle durante o 7º e 12º d.p.i (CTRL: $100 \pm 15\%$ vs 5º d.p.i: $302 \pm 169\%$, 7º dpi: $102 \pm 22\%$, 12º dpi: $184 \pm 66\%$, $*p < 0.05$ vs CTRL). Em contrapartida, a avaliação de Glu extracelular revelou um aumento de $\pm 300\%$ que permaneceu constante no 5º e 7º d.p.i e decaiu no 12º dia (CTRL: $100 \pm 29\%$ vs 5º d.p.i: $332 \pm 114\%$, 7º dpi: $256 \pm 79\%$, 12º dpi: $162 \pm 73\%$, $*p < 0.05$ vs CTRL).

Conclusão

Desse modo, concluímos que o quadro experimental de MC é acompanhado por alterações dos NE de GABA e glutamato no cérebro de camundongos infectados, apontando para um potencial papel de ambos nas complicações da doença.

Apoio Financeiro

O presente trabalho foi realizado com o apoio financeiro da UFPA.

Palavras-chaves: GABA, Glutamato, Malária Cerebral

O efeito do uso de cocaína no comprimento dos telômeros durante o tratamento de desintoxicação para mulheres usuárias

Autores João Paulo Ottolia Niederauer ^{1,4}, Thiago Wendt Viola ^{1,4}, Bruno Kluwe Schiavon ², Rodrigo Grassi Oliveira ^{3,1}
Instituição ¹ PUCRS - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (Av. Ipiranga, 6681 - Partenon, Porto Alegre - RS, 90619-900), ² UMINHO - Universidade do Minho (R. da Universidade, 4710-057 Braga, Portugal), ³ AU - Aarhus University (Nordre Ringgade 1, 8000 Aarhus C, Dinamarca), ⁴ INSCER - Instituto do Cérebro do Rio Grande do Sul (Av. Ipiranga, 6690 - Jardim Botânico, Porto Alegre - RS, 90610-000)

Resumo

Introdução

O comprimento do telômero (TC) está associado a uma alta gama de transtornos psiquiátricos. O uso de cocaína tem ligação com o encurtamento do telômero em estudos anteriores.

Objetivo

Portanto, o objetivo desse trabalho foi de investigar o efeito do uso de cocaína no comprimento de telômeros e se o encurtamento de telômeros está associado com piores sintomas de abstinência ao final da internação.

Métodos

Neste estudo, investigamos essas hipóteses. Mulheres com transtorno do uso de cocaína (n = 100) foram selecionadas durante o período de internação em uma unidade para desintoxicação de álcool e outras drogas. Os controles foram escolhidos aleatoriamente e emparelhados em relação ao sexo (n = 142). O grupo de mulheres usuárias foi dividido em dois grupos um com uso mais severo de cocaína (n = 47) e outro com menor severidade (n = 53). Definiu-se a divisão dos grupos a partir da mediana (0.44) do escore de 0 à 1 gerado pela razão entre anos de uso e idade de primeiro uso. Os pacientes responderam sobre transtornos psiquiátricos (SCID-IV), padrão de uso de substâncias (ASI-6, trauma precoce (CTQ) e sintomas de abstinência (CSSA). Amostras de sangue periférica foram coletadas em ambos os controles e pacientes hospitalizados e a análise qPCR foi utilizada para quantificar o comprimento dos telômeros (razão T/S), student t-test para comparação de médias, ANOVA (grupos como fatores fixos) para associação entre grupos, correlação de Pearson e regressão linear para análises entre TC e sintomas de abstinência.

Resultados

Os resultados primários indicaram diferenças significativas ($p < 0.05$) no TC entre os controles ($M = 1,23$, $SD = 0,27$) e usuárias de cocaína ($M = 1,06$, $SD = 0,20$). Entre o grupo de usuárias de cocaína também houve diferença significativa entre o TC das com maior severidade ($M = 1,02$; $SD = 0,20$) e das com menor severidade de uso ($M = 1,11$; $SD = 0,19$). Análises de ANOVA revelaram efeito de grupo [$F(1,230) = 28,314$; $p < 0.01$; $\eta^2 = 0.11$] e idade [$F(1,230) = 4,635$; $p < 0.05$; $\eta^2 = 0.02$], mas não BMI [$F(1,230) = 0,273$; $p > 0.05$; $\eta^2 = 0.00$], e trauma precoce [$F(1,230) = 0,468$; $p > 0.05$; $\eta^2 = 0.00$]. Identificou-se correlações significativas entre escores totais da CSSA ($r^2 = -.22$; $p = 0.49$), sintomas de sono ($r^2 = -.23$; $p = 0.34$) e fissura ($r^2 = -.26$; $p = 0.19$) com TC. Análises de regressão entre CSSA e TC indicaram associações entre usuárias com telômeros menores e maior gravidade de sintomas totais ($F = 3.07$; $\beta = -21.17$; $p = 0.20$), de sono ($F = 3.13$; $\beta = -3.17$; $p = 0,24$) e fissura ($F = 2.16$; $\beta = -4.59$; $P = 0.41$) na alta do tratamento.

Conclusão

O uso de cocaína parece ter um efeito no comprimento dos telômeros em mulheres usuárias internadas. Também foi demonstrado que a gravidade do padrão de uso, como o uso de longo prazo e o início precoce do uso, podem indicar uma perda acentuada de TC e o encurtamento de TC parece afetar sintomas de abstinência.

Apoio Financeiro

Apoio Financeiro:
NIH - The University of Texas Health Science Center at Houston
CAPES

Palavras-chaves: Comprimento de Telômeros, Uso de cocaína, Sintomas de abstinência

Dois isolados de Zika vírus induzem variação na população neuronal e perfis de ativação de micróglia distintos em tempos iniciais da infecção em modelo de culturas organotípicas de hipocampo

Autores Marina da Silva Oliveira ¹, Larissa Marcelly Gomes Cassiano ¹, Jeanne Pioline ^{1,2}, Gabriel da Rocha Fernandes ¹, Anna Christina de Matos Salim ¹, Ketyllen Reis Andrade de Carvalho ¹, Pedro Augusto Alves ¹, Alexandre de Magalhães Vieira Machado ¹, Roney Santos Coimbra ¹

Instituição ¹ IRR/FIOCRUZ - Instituto René Rachou (Avenida Augusto de Lima, 1715. Barro Preto, Belo Horizonte - MG. Brasil), ² AMU - Université d'Aix-Marseille (Jardin du Pharo, 58 Boulevard Charles Livon, Marseille, França)

Resumo

Introdução

O Zika vírus (ZIKV) causou uma epidemia no Brasil em 2015, mais tarde associada à ocorrência de microcefalia. O vírus tem forte neurotropismo, levando à morte celular. O hipocampo, afetado na infecção, abriga células progenitoras e neurônios pós-mitóticos.

Objetivo

Investigar, utilizando a plataforma de culturas organotípicas de hipocampo (COH), impactos da infecção por dois isolados de ZIKV, SPH e PE243 que apresentam semelhança de 99,9% ao nível nucleotídico e 99,97% ao nível de aminoácidos, em aspectos fenotípicos e na assinatura transcricional das COHs.

Métodos

Utilizou-se imunofluorescência e microscopia confocal para avaliar a infecção, população neuronal, ativação de micróglia e presença da marca epigenética H3K4me3; e RNA-Seq e técnicas de bioinformática para investigar a assinatura transcricional das COHs. Para análise estatística utilizou-se testes ANOVA associados a pós-testes de Tukey ou Dunn. Foram considerados estatisticamente significativos valores de $P < 0,05$. Projeto aprovado pelo comitê de ética da FIOCRUZ (LW-10/18).

Resultados

Os isolados induziram dinâmicas distintas de infecção e alteração na população neuronal. Entre 8 e 48h pós infecção (p.i.), PE243 induziu perda progressiva de neurônios, enquanto SPH induziu perda, seguida de repovoamento dessas células (média $\pm$ desvio padrão; 8h: Controle 2072 $\pm$ 76/PE243 2518 $\pm$ 130/SPH 2376 $\pm$ 205; 24h: Controle 2093 $\pm$ 59/PE243 2092 $\pm$ 96/SPH 1496 $\pm$ 47; 48h: Controle 2076 $\pm$ 90/PE243 1855 $\pm$ 143/SPH 2167 $\pm$ 139). Ademais, SPH ativou significativamente a micróglia 8h p.i. (Controle 0,048 $\pm$ 0,028/PE243 0,032 $\pm$ 0,0103/SPH 0,099 $\pm$ 0,066). Entre 5 e 10 dias p.i., a densidade neuronal das COHs infectadas ficou abaixo dos controles (5 dias: Controle 2024 $\pm$ 78/PE243 1485 $\pm$ 73/SPH 1509 $\pm$ 66; 10 dias: Controle 2073 $\pm$ 95/PE243 1662 $\pm$ 116/SPH 1676 $\pm$ 164). Ainda, a intensidade de fluorescência de H3K4me3, associada à ativação transcricional, aumentou significativamente 10 dias p.i. em neurônios infectados por SPH (Controle 400 $\pm$ 108/PE243 740 $\pm$ 117/SPH 1477 $\pm$ 164), indicando que dinâmicas de infecção iniciais distintas podem gerar impactos tardios. O contraste dos transcriptomas das COHs infectadas e controle indicou expressão diferencial de 113 genes em resposta à infecção com SPH e de 32 em resposta a PE243. Com a análise de enriquecimento funcional, o conjunto de genes diferencialmente expressos pelas COHs infectadas com SPH levou à predição de ativação da resposta inflamatória, corroborando o resultado da imunofluorescência e indicando ocorrência de uma inflamação mais amena nas COHs infectadas com PE243. A infecção das COHs com qualquer dos dois isolados levou à expressão diferencial de 10 genes comuns, potenciais marcadores da neurodegeneração induzida pelo ZIKV.

Conclusão

O modelo se mostrou adequado ao estudo da infecção pelo ZIKV. Os isolados SPH e PE243, embora similares, induzem alterações fenotípicas e transcricionais distintas nas COHs.

Apoio Financeiro

INCT Vacinas, Programa INOVA FIOCRUZ, CNPq, FAPEMIG, FIOCRUZ.

Palavras-chaves: Zika Vírus, Cultura Organotípica de Hipocampo, Neurodegeneração

A EXPOSIÇÃO À LEUCINA INDUZ ESTRESSE OXIDATIVO NO CÉREBRO DE PEIXE-ZEBRA

Autores Rafaela Tezza Matiola ¹, Isabela da Silva Lemos ¹, Gabriela Candioto ¹, Rafael Orestes Canarim ¹, Isabela Correa de Oliveira ¹, Maria Rebecca Belisario Salvato ¹, Milena Martins Moretti ¹, Emilio Luiz Streck ¹

Instituição ¹ UNESC - Universidade do Extremo Sul Catarinense (Av. Universitária)

Resumo

Introdução

A Doença da Urina do Xarope do Bordo (DXB) é um distúrbio de herança autossômica recessiva, causado pela deficiência na atividade do complexo α -cetoácido desidrogenase de cadeia ramificada, que leva ao acúmulo dos aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) leucina, isoleucina e valina e de seus respectivos α -cetoácidos de cadeia ramificada e hidroxiácidos correspondentes. Estudos relatam diferentes níveis de retardo mental e outros sintomas neurológicos, os quais se relacionam com alterações no estado redox e, dessa forma, sugere-se que os danos estejam associados ao estresse oxidativo. Este estudo utilizou o peixe-zebra (*Danio rerio*).

Objetivo

Avaliar parâmetros comportamentais e de estresse oxidativo em peixe-zebra expostos a um modelo semelhante à Doença da Urina do Xarope do Bordo, por meio de altas concentrações de leucina, por um período de 24 horas.

Métodos

Foram utilizados um total de 102 animais, divididos em três grupos: controle, expostos à concentração de 2mM de leucina e expostos à concentração de 5mM de leucina. Cada grupo de exposição a leucina foi composto por 36 animais, já contabilizando a mortalidade, enquanto o grupo controle foi de 30 animais. Após a exposição de 24 horas, os animais seguiram para um protocolo de eutanásia com triclaína dissolvida em água, tendo seu conteúdo cerebral dissecado e armazenado adequadamente para as análises de estresse oxidativo: dosagem do conteúdo de sulfidril, medida de oxidação de 2',7'-diclorofluoresceína, medida de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, atividades de superóxido dismutase e catalase. Os resultados estão como média $\pm$ erro padrão da média. As diferenças estatísticas foram detectadas por meio de análises de variâncias (ANOVA) de uma via seguido de teste de Tukey como *post hoc*, sendo considerados significativos os resultados que atingirem $p \leq 0,05$. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNESC sob protocolo n° 47/2020.

Resultados

Ao verificar os parâmetros de estresse oxidativo, não foram obtidas alterações significativas na oxidação de 2',7'-diclorofluoresceína e conteúdo de sulfidrilas. Contudo, os animais expostos à concentração de 5mM de leucina demonstraram um aumento na medida de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico. Além disso, observou-se que os animais expostos às concentrações de 2mM e 5mM de leucina apresentaram uma diminuição da atividade da superóxido dismutase e um aumento da atividade da catalase nas mesmas concentrações. Os resultados estão apresentados como média e desvio padrão, sendo considerado significativos os valores $*p < 0,05$.

Conclusão

Assim, sugere-se que o peixe-zebra exposto à altas concentrações de leucina é um promissor modelo animal para a Doença da Urina do Xarope do Bordo, contribuindo para a melhor compreensão do perfil de toxicidade da exposição à leucina, além de proporcionar um melhor entendimento desse modelo em futuras pesquisas e estratégias relacionadas a estudos fisiopatológicos envolvidos nessas condições.

Apoio Financeiro

FAPESC, CNPq, CAPES, UNESC.

Palavras-chaves: Dano oxidativo, Doença da urina do xarope de bordo, Leucinose