

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

NAYARA DE FREITAS MARTINS MELO

**EFEITO DA COCULTURA SEM CONTATO DE ASTRÓCITOS
TRATADOS COM ÁCIDOS GRAXOS SATURADOS E NEURÔNIOS
HIPOTALÂMICOS**

UBERLÂNDIA

2014

NAYARA DE FREITAS MARTINS MELO

**EFEITO DA COCULTURA SEM CONTATO DE ASTRÓCITOS
TRATADOS COM ÁCIDOS GRAXOS SATURADOS E NEURÔNIOS
HIPOTALÂMICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Renata Graciele Zanon

UBERLÂNDIA

2014

*Dedico esta obra aos meus pais,
Sebastião Carlos e Genilda,
ao meu esposo Vitor e ao meu irmão
Pablo, como demonstração de amor,
carinho e agradecimento por todo apoio recebido.
Amo Vocês!!!*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, pelo dom da vida, amor incondicional e por estar sempre comigo.

Agradeço aos meus pais, Sebastião Carlos e Genilda, por todo amor, carinho e por todo apoio.

Agradeço ao meu esposo Vitor, por todo amor, paciência e por toda compreensão e incentivo nos momentos de dificuldades.

Ao meu irmão, Pablo, agradeço pelo exemplo de força e perseverança na busca da realização de seus sonhos.

Agradeço também a todo o pessoal do laboratório de neurociência pelo apoio nas horas de necessidades. Em destaque, agradeço ao Pedro e a Érica por toda ajuda recebida para o cumprimento e realização deste trabalho.

À minha orientadora, Renata, agradeço pela oportunidade, paciência e conhecimento a mim proporcionado.

Agradeço ao coordenador e à secretária do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas (PPGBC) pela boa condução dos aspectos que constituem o programa de pós-graduação e à CAPES pelo auxílio financeiro através da bolsa de estudo.

A todos o meu muito obrigado por fazerem parte da conclusão de mais uma etapa na minha vida.

*Entrega o teu caminho ao
SENHOR; confia nEle, e Ele o
fará.*

Salmos 37:5

RESUMO

Uma dieta rica em gorduras provoca inflamação no hipotálamo, principalmente nos neurônios que controlam a saciedade e termogênese. Além disso, a ativação de apoptose via TLR4 (*toll like receptor 4*) também foi observada. A morte neuronal é um processo que envolve a ativação da glia e liberação de citocinas. A microglia tem a função imune no tecido nervoso, mas os astrócitos, o componente mais abundante das células gliais, está mais envolvido com a plasticidade sináptica e respostas crônicas do Sistema Nervoso Central. Além disso, essas células, no hipotálamo, que é o centro controlador do metabolismo energético, têm características específicas, apresentando receptores para ácidos graxos, glicose e leptina. Neste contexto, investigamos a reação dos astrócitos após o tratamento com ácidos graxos em culturas de astrócitos hipotalâmicos e corticais. Para tanto, foi feita a dissociação do córtex e hipotálamo de camundongos Swiss (1-2 dias) e os astrócitos foram plaqueados para os experimentos. Essas culturas foram tratadas com doses diferentes de estereato (100µM, 200µM e 2mM) e palmitato (200µM, 500µM e 5mM) durante uma semana. Foi realizada a imunocitoquímica com o anticorpo anti-GFAP (avalia a reatividade dos astrócitos) e anti-NFκB (fator de transcrição que participa da via de ativação TLR-4) e a dosagem de TNF-α por ELISA. O meio na dose de 200µM foi recolhido após 3 dias de contato com astrócitos tratados com estereato ou palmitato, para a obtenção de meio condicionado, o qual foi estocado para tratamento de culturas de neurônios. Foram utilizadas culturas de neurônios hipotalâmicos (linhagem CLU189) para o tratamento, por 3 ou 6 dias, com o meio condicionado, e posteriormente, nessas culturas, foi realizada a imunocitoquímica com os anticorpos anti-caspase3 (avalia morte celular por apoptose) e anti-ki-67 (marcador de célula em proliferação). As imunomarcações foram quantificadas e tratadas estatisticamente para comparação dos grupos experimentais e controles. Os resultados mostraram que o tratamento com estereato intensifica a expressão de GFAP e NFκB somente em astrócitos do hipotálamo. O TNF-α estava aumentado no meio condicionado usado no tratamento de células do hipotálamo, mas esse aumento não interferiu na apoptose nas culturas de CLU189 nos 3 primeiros dias para os meios condicionados, e no 6º dia, em relação ao meio condicionado somente em astrócitos. Mostrando certa proteção fornecida por substâncias produzidas pelos astrócitos hipotalâmicos. Ainda, nossos dados também mostraram que os neurônios respondem, sem mediação de outro tipo de célula, ao tratamento com ácido graxo.

Palavras-chave: Astrócitos. Obesidade. Ácido graxo.

ABSTRACT

A fatty high diet causes inflammation in the hypothalamus, mainly in the neurons that control satiety and thermogenesis. Moreover, activation of apoptosis via TLR4 (toll like receptor 4) is observed in conjunction with inflammatory condition. The neuronal death is a process that involves the release of cytokines and glial activation. The microglia have immune function in nervous tissue, but the astrocytes, the main component of glia, is more involved in synaptic plasticity and chronic responses of the Central Nervous System. Moreover, these cells in the hypothalamus, which is the center of energy metabolism control, have specific characteristics, with receptors for fatty acids, glucose and leptin. In this context, we investigated the response of astrocytes after *in vitro* treatment with fatty acids on cortical and hypothalamic astrocytes. To that end, we made the dissociation of the cortex and hypothalamus of Swiss mice (1-2 days) and the cells were plated for procedures. Treatments were performed with different doses of stearate (100 μ M, 200 μ M and 2mM) and palmitate (200 μ M, 500 μ M and 5mM) for one week. Immunocytochemistry was performed with anti-GFAP (evaluates the astroglial reactivity) and anti-NF κ B (transcription factor that participates in the TLR-4 pathway) and TNF- α dosage by ELISA. Dosage of 200 μ M medium were reserved after 3 days of contact with astrocytes that were treated with palmitate or stearate, for obtaining conditioned medium that were stocked for neurons culture treatment. Cultures of hypothalamic neurons (lineage CLU189) were treated for 3 or 6 days with conditioned medium, in sequence, in this cultures, were performed immunocytochemistry with caspase3 (apoptosis marker) and anti-Ki-67 (cell proliferation marker). The immunostaining was quantified and statistically treated for comparison of experimental and control groups. The results showed that treatment with stearate enhances the expression of GFAP and NF κ B only in astrocytes from the hypothalamus. The TNF- α was upregulated in conditioned medium used for treatment of hypothalamic cells, however this augment did not interfere with apoptosis rate in CLU 189 cultures in first three days of contact with conditioned medium and, in the sixth day, in comparison to conditioned control medium only in astrocytes. Such results showed the protection provided for substances had released by reactivated astrocytes from hypothalamus. Also, our results showed that neurons could respond to fatty acid without other cell intervention.

Key-words: Astrocytes. Obesity. Fatty acid.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Técnica TUNEL para identificação de apoptose, realizada em cortes de hipotálamo de animais controle (CT) e alimentados com dieta hiperlipídica (HF).....	17
Figura 2: Sinalização do receptor de Leptina.....	19
Figura 3: Representação esquemática da placa de 96 poços com os grupos de cultura de CLU189 tratadas com diferentes condições.....	27
Figura 4: Curvas dose x efeito para os ácidos estereato (A) e palmitato (B).....	31
Figura 5: Imunomarcção anti-GFAP e anti-NFκB após 5 dias de tratamento com estereato sobre astrócitos hipotalâmicos.....	33
Figura 6: Imunomarcção anti-GFAP e anti-NFκB após 5 dias de tratamento com palmitato sobre astrócitos hipotalâmicos.....	34
Figura 7: Imunomarcção anti-GFAP e anti-NFκB após 5 dias de tratamento com estereato sobre astrócitos corticais.....	36
Figura 8: Imunomarcção anti-GFAP e anti-NFκB após 5 dias de tratamento com palmitato sobre astrócitos corticais.....	37
Figura 9: Dosagem de TNF-α em astrócitos corticais e hipotalâmicos quando submetidos ao tratamento com AG, estereato e palmitato.....	38
Figura 10: Quantidade de células em cultura ao longo do experimento, 3 dias (A) e 6 dias (B) para cada condição experimental.....	41
Figura 11: Cultura de CLU189 tratadas com ácido graxos de cadeia longa por 3 dias e, marcadas com DAPI (azul) e caspase3 (vermelho).....	42
Figura 12: Cultura de CLU189 tratadas com ácido graxos de cadeia longa por 6 dias e, marcadas com DAPI (azul) e caspase3 (vermelho).....	43
Figura 13: Cultura de CLU189 tratadas com ácido graxos de cadeia longa por 6 dias e, marcadas com DAPI (azul) e ki-67 (verde).....	45
Figura 14: Relação do número de células ki-67 positivas pelo número de células caspase 3 positivas após 6 dias de tratamento.....	46
Figura 15: Representação esquemática da placa de 96 poços com os grupos de cultura de CLU189 tratadas com diferentes condições experimentais por 6 dias.....	47
Figura 16: Taxa de morte celular pela quantificação de caspase3+ nos diferentes grupos experimentais em culturas após 6 dias de tratamento.....	47
Figura 17: Taxa de proliferação celular pela quantificação de ki-67+ nos diferentes grupos experimentais em culturas após 6 dias de tratamento.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Descrição dos grupos com diferentes doses de tratamento sobre cultura de astrócitos (teste piloto).....	25
Tabela 2: Densidade integrada de pixels referente a imunomarcção para GFAP e NFκB após tratamento com estereato em astrócitos hipotalâmicos.....	32
Tabela 3: Densidade integrada de pixels referente a imunomarcção para GFAP e NFκB após tratamento com palmitato em astrócitos hipotalâmicos	32
Tabela 4: Densidade integrada de pixels referente a imunomarcção para GFAP e NFκB após tratamento com estereato em astrócitos corticais.....	35
Tabela 5: Densidade integrada de pixels referente a imunomarcção para GFAP e NFκB após tratamento com palmitato em astrócitos corticais.....	35
Tabela 6: Número de células caspase e Ki-67 positivas após tratamento com estereato em astrócitos hipotalâmicos.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AG – Ácido Graxo

AgRP – Proteína Relacionada ao Agouti

BDNF - Fator de Crescimento Derivado do Cérebro

bFABP – Proteína Ligante de Ácidos Graxos

BHE – Barreira Hematoencefálica

BSA –Albumina Sérica Bovina

CART – Transcrito regulado por cocaína e anfetamina

CCK – Colecistoquinina

CLU-189 – Cultura de Neurônios Hipotalâmicos

CNTF - Fator Neurotrófico Ciliar

CRH – Hormônio Liberador de Corticotrofina

DAPI - 4',6'-diamidino-2-fenil-indol

DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (Meio Dulbecco modificado de Eagle)

DMSO – Dimetilsulfóxido

ELISA – Ensaio Imunoenzimático

GDNF - Fator Neurotrófico Derivado da Glia

GFAP – Proteína Ácida Fibrilar Glial

GIP – Peptídeo Insulinotrópico glicose-dependente

GLP-1 – Peptídeo Análogo ao Glucagon

GLUT2 – Transportador de Glicose 2

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IFN- γ – Interferon γ

IL-1 β – Interleucina 1 β

IL-6 – Interleucina 6

JAK-2 – Receptor transmembrana que interage com Janus quinase - 2

JNK – c-Jun-N-terminal quinase

MAPK - Proteína Quinase Ativada por Mitógenos

MCH – Hormônio Concentrador de Melanina

MMP-3 – Metaloproteinase de Matriz – 3

NF κ B – Fator Nuclear κ B

NGF - Fator de Crescimento de Nervo

NPY – Neuropeptídeo Y

NT-3 - neurotrofina-3
ObR- Receptor de Leptina
OMS – Organização Mundial da Saúde
PBS – Tampão Fosfato Salino
POMC – Proopiomelanocortina
PTP1B – Proteína Tirosina Fosfatase 1B
RPM – Rotações por minuto
SFB – Soro Fetal Bovino
SNC – Sistema Nervoso Central
SOCS3 – Supressor de Sinalização de Citocina
STAT3 – Fator de Transcrição 3
TGF- β - Fator transformador de crescimento β
TLR4 – Receptor Tipo toll 4
TNF- α – Fator de Necrose Tumoral α
TRH – Hormônio Liberador de Tireotrofina
Unicamp – Universidade Estadual de Campinas

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	15
3. OBJETIVOS.....	21
3.1 Objetivo geral.....	22
3.2 Objetivos específicos.....	22
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
4.1 Animais.....	24
4.2 Cultura primária de astrócitos.....	24
4.3 Tratamento com ácidos graxos saturados e produção de meio condicionado.....	24
4.4 Dosagem de TNF- α no meio condicionado através de ELISA.....	25
4.5 Cultura de neurônios hipotalâmicos – CLU189.....	26
4.6 Imunocitoquímica	27
4.7 Análise Estatística.....	28
5. RESULTADOS.....	29
5.1 Curva dose x efeito.....	30
5.2 Tratamento com ácido graxo saturado promove maior reatividade e aumento da expressão de NF κ B em astrócitos do hipotálamo.....	30
5.3 Dosagem de TNF- α em meio condicionado: astrócitos corticais expressam menor nível de TNF frente ao tratamento com ácido graxo saturado em relação aos astrócitos hipotalâmicos.....	38
5.4 As culturas de CLU189 tratadas com meio condicionado tem a tendência de apresentar uma maior taxa de proliferação celular do que morte celular.....	39
5.5 O meio condicionado não consegue promover a neuroproteção quando administrado juntamente com AG.....	46
6. DISCUSSÃO.....	49
7. CONCLUSÃO.....	55
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	57
ANEXO 1 (TERMO DE CONSENTIMENTO COMITÊ DE ÉTICA).....	63

1. INTRODUÇÃO

A obesidade é hoje um grave problema de saúde pública mundial, pois, mais de meio bilhão de pessoas acima de 20 anos são obesos, quase o dobro quando se comparado com o período de 25 anos atrás. Em todo mundo, pelo menos 2,8 milhões de pessoas morrem a cada ano como resultado do excesso de peso ou obesidade e, cerca de 35,8 milhões dos problemas de saúde que levam a perda dos anos potenciais de vida, devido à morte prematura e dos anos de vida produtiva perdida devido à deficiência, são atribuídos à obesidade (OMS, 2008). Uma pesquisa recente realizada pelo IBGE que analisou em 2008 e 2009 o consumo alimentar pessoal no Brasil mostrou excessivo consumo de açúcar por 61% da população e excessivo consumo de gordura saturada (maior do que 7% do consumo de energia) para 82% da população. As dietas ricas em calorias são a principal causa de obesidade, porém, nem todos os indivíduos expostos às dietas altamente calóricas se tornam obesos. A principal razão para esse fenótipo protetor é a capacidade intrínseca de manutenção da homeostase energética corporal, pelo fino controle entre a quantidade de energia que ingerimos e que gastamos. Dessa forma, estudos epidemiológicos mostram que populações que consomem preferencialmente dietas com alto teor de gordura são especialmente propensas ao ganho de massa corporal (Ogden *et al.*, 2007). Tal fato estimulou pesquisadores a investigarem os mecanismos que relacionam o consumo de dietas hiperlipídicas ao desenvolvimento de um balanço inadequado entre consumo e gasto energético.

O acoplamento entre o status energético corporal e os mecanismos que regulam fome, saciedade e termogênese é mantido por uma região específica do Sistema Nervoso Central (SNC), o hipotálamo (Carlos, 2006). Neurônios hipotalâmicos especializados conectam essas informações através da sinalização central de leptina e insulina, dois dos principais hormônios reguladores da homeostase energética corporal. Duas populações diferentes de neurônios do núcleo arqueado do hipotálamo (neurônios de primeira ordem) agem como sensores de estoque energético no corpo e coordenam uma segunda rede neuronal (neurônios de segunda ordem) localizada nos núcleos lateral e paraventricular do hipotálamo que, por sua vez, controlam o balanço entre fome e saciedade, e pró- e anti-termogênese (Schwartz *et al.*, 2000; Velloso, 2009). Os primeiros neurônios são capazes de detectar mudanças séricas súbitas ou crônicas dos níveis hormonais de leptina e insulina e, como resposta, expressam peptídeos estimuladores da fome e por isso denominados orexigênicos (neuropeptídeo Y, NPY e, proteína relacionada ao agouti, AgRP) ou expressam peptídeos inibidores da fome denominados anorexigênicos (proopiomelanocortina, POMC, e transcrito regulado por cocaína e anfetamina, CART) (Schwartz *et al.*, 2000 Velloso, 2009).

Os neurônios de segunda ordem do hipotálamo lateral sintetizam predominantemente um neurotransmissor orexigênico e anti-termogênico (hormônio concentrador de melanina, MCH), enquanto os neurônios do núcleo paraventricular produzem os neurotransmissores anorexigênico (hormônio liberador de tireotrofina, TRH) e pró-termogênico (hormônio liberador de corticotrofina, CRH). Durante o jejum, predomina a sinalização que induz a fome pelo estímulo da expressão de NPY e AgRP e inibição da produção de POMC e CART, o contrário ocorre no estado alimentado que sinaliza para o aumento da saciedade e termogênese. Esta resposta coordenada é simultaneamente dependente da disponibilidade de nutrientes, dos níveis de leptina e insulina, e de hormônios intestinais como colecistoquinina (CCK), peptídeo análogo ao glucagon (GLP-1) e peptídeo insulínico glicose-dependente (GIP) (Badman e Flier, 2005).

O presente trabalho é relevante por ter como foco a obesidade, que é um grave problema de saúde pública mundial com taxas crescentes. Diante da complexidade celular do SNC e de suas relações intercelulares, nossa proposta foi estudar a influência dos astrócitos, o constituinte da glia mais presente no SNC, sobre o processo de inflamação e desordem do controle da fome e da saciedade que é observado no hipotálamo diante ao excesso de gordura na alimentação.

2. REVISÃO DE LITERATURA

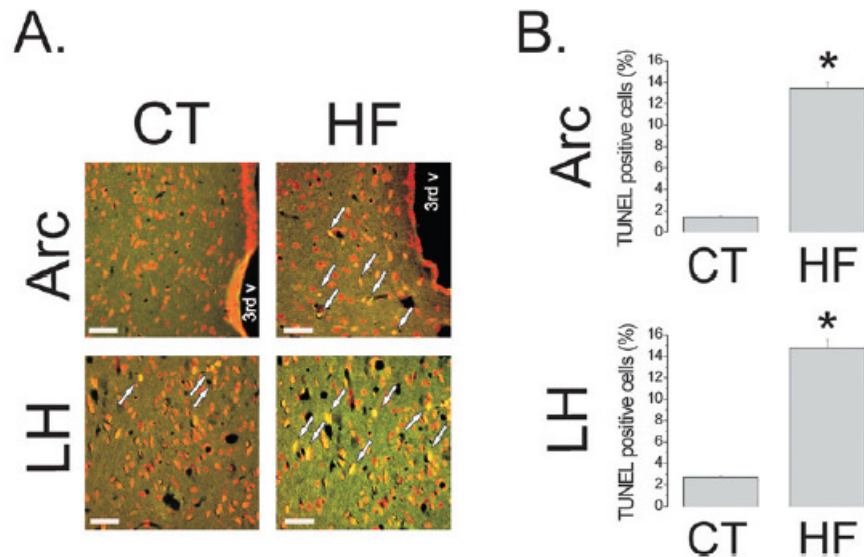
Estudos recentes mostram que dietas hiperlipídicas promovem uma resposta inflamatória no hipotálamo comprometendo os circuitos neuronais que mantêm o controle homeostático das reservas corporais de energia, favorecendo assim o ganho de massa adiposa (Velloso, 2009). O consumo de dieta hiperlipídica induz a expressão de genes pró-inflamatórios no SNC que, via JNK (c-Jun-N-terminal quinase) e NFκB (Fator Nuclear κB), levam à transcrição gênica de citocinas e aumento local de TNF-α (Fator de Necrose Tumoral α), IL-1β (Interleucina 1β), IL-6 (Interleucina 6) e IFN-γ (Interferon gama) que sustentam o processo inflamatório no hipotálamo (Milanski *et al.*, 2009).

Esses sinais inflamatórios culminam em alterações nas vias metabólicas de sinalização intracelular, como o fator de transcrição 3 (STAT3), o supressor de sinalização de citocina (SOCS3) e a proteína tirosina fosfatase 1B (PTP1B), que, em conjunto, diminuem a responsividade do hipotálamo à leptina e insulina, levando a um quadro de resistência a tais hormônios que, progressivamente, acarretam na perda do controle entre ingestão de alimentos e termogênese, contribuindo para um balanço energético positivo (De Souza *et al.*, 2005; Munzberg e Myers, 2005). Embora a resistência central à leptina e à insulina não seja totalmente compreendida, um dos mecanismos patológicos de resistência à leptina deriva da deficiência da função do retículo endoplasmático, um processo conhecido como estresse de retículo (Morentin e López, 2010).

O mecanismo pelo qual o consumo de dietas hiperlipídicas ativa o processo inflamatório hipotalâmico tem sido extensivamente estudado. Milanski e colaboradores (2009) identificaram uma ativação via receptores da família *toll-like*, especialmente o TLR4 (receptor tipo toll 4). Nesse contexto, ácidos graxos de cadeia longa ativam TLR4 e induzem estresse de retículo endoplasmático nos neurônios anorexigênicos hipotalâmicos do núcleo arqueado, que vão precipitar o processo inflamatório, estabelecendo o elo entre a ingestão de alto teor de ácidos graxos e disfunção hipotalâmica na obesidade.

Existem pontos de *crosstalk* (interação) entre as vias moleculares do processo inflamatório e da apoptose que permeiam entre os sinais induzidos pelos receptores *toll-like* e receptores da família TNF (Siegel *et al.*, 2003). Dessa forma, o processo inflamatório hipotalâmico levaria a apoptose de neurônios de núcleos envolvidos com a regulação da fome, saciedade e termogênese (Figura 1). Isso foi confirmado em um estudo recente que mostra que o consumo prolongado de dieta hiperlipídica induz uma resposta pró-apoptótica preferencialmente em neurônios anorexigênicos. Com a morte neuronal ocorre redução da densidade de sinapses nos núcleos arqueado e lateral do hipotálamo, um efeito que é

dependente da composição da dieta (ácidos graxos de cadeia longa) e não da ingestão calórica (Moraes *et al.*, 2009).



Fonte: Moraes *et al.*, 2009
(doi:10.1371/journal.pone.0005045.g002)

Figura 1: Técnica TUNEL para identificação de apoptose, realizada em cortes de hipotálamo de animais controle (CT) e alimentados com dieta hiperlipídica (HF). Em **A** são mostradas seções da região do núcleo arqueado (Arc) e lateral (LH). As setas apontam neurônios marcados em amarelo, representando células positivas para apoptose. O gráfico em **B** quantifica as células apoptóticas, mostrando grande diferença entre a quantidade de neurônios comprometidos no hipotálamo de animais HF (com dieta rica em gordura). Escala = 20 μ m. [*] $p < 0,05$.

A morte neuronal no SNC é um evento multicelular e, portanto, envolvido com os constituintes da glia, principalmente microglia e os astrócitos. A primeira tem função conhecida como parte do Sistema Fagocitário Mononuclear e participa ativamente do processo inflamatório e de defesa do tecido, liberando citocinas e interleucinas (Streit e Kreutzberg, 1988). No SNC, a microglia é fonte primária de produção de TNF- α e IFN- γ , o que apresenta implicações no desenvolvimento da neurotoxicidade e da apoptose (Kraft *et al.*, 2009). Uma vez que a inflamação hipotalâmica observada na obesidade é decorrente de uma ingestão crônica de ácidos graxos, as células microgliais tendem a diminuir suas respostas com a progressão do tempo, enquanto os astrócitos assumem papéis importantes tanto na inflamação quanto no processo de plasticidade sináptica (Aldskogius *et al.*, 1999; Dong e Benveniste, 2001; Zanon e Oliveira, 2006).

Ao contrário do proposto no passado, os astrócitos desempenham um papel ativo no SNC. Atuam, por exemplo, na formação e manutenção da barreira hematoencefálica, tem

envolvimento na homeostase de íons e manutenção do pH, no transporte de neurotransmissores, na produção de matriz extracelular e na neuromodulação (Ribotta *et al.*, 2004; Sofroniew, 2005). Adicionalmente, têm relação com os processos de manutenção e eliminação sináptica (Aldskogius *et al.*, 1999; Ullian *et al.*, 2001). Além disso, após uma lesão tecidual, seja por trauma ou doença, os astrócitos tornam-se reativos (astroglíose ou astroglíose reativa). A astroglíose é caracterizada principalmente por hipertrofia das projeções astrocitárias e pelo aumento da expressão de proteínas do citoesqueleto conhecidas como filamentos intermediários, compostos por nestina, vimentina e proteína ácida fibrilar glial (GFAP) (Pekny *et al.*, 2007).

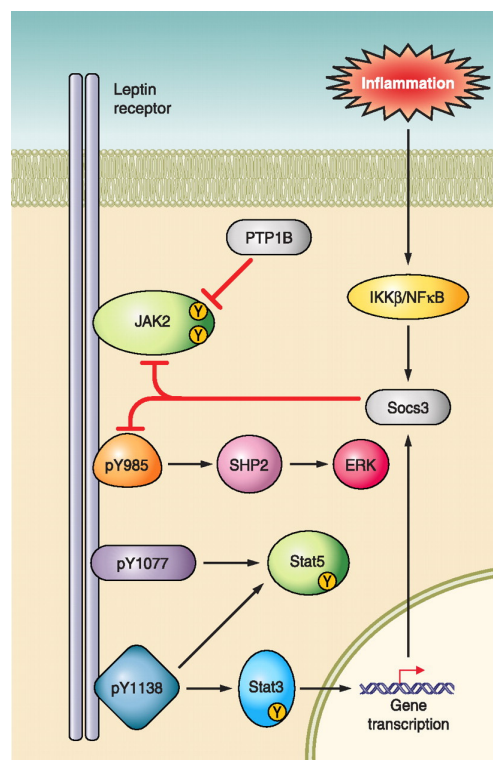
Na ausência de lesão, a expressão de citocinas e quimiocinas pelos astrócitos é limitada, porém, frente a doenças como Parkinson, Alzheimer, Esclerose Múltipla e traumas, ocorre uma hiperprodução de citocinas e quimiocinas como as interleucinas-1, 6, 8 e 10, IFN- β , IFN- γ , TNF- α e TGF- β (Dong e Benveniste, 2001; Piehl e Lidman, 2001; Nakagawa *et al.*, 2005) que se correlacionam com morte celular e neurodegeneração (Chao *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 2002; Bermel e Rudick, 2007).

Os astrócitos são morfologicamente mais complexos do que se pensava. Interessantemente, suas características dependem da área do SNC a qual pertencem (Freeman, 2000). Sendo assim, cabe o questionamento sobre as particularidades dessas células localizadas nos núcleos hipotalâmicos envolvidos nas interações bioquímicas do metabolismo energético. Nesse sentido, dados recentes mostram a participação dos astrócitos no fornecimento de energia, quebrando glicogênio em lactato e transportando esse lactato para neurônios, protegendo-os da privação de glicose (Young, 2002). Ainda, os astrócitos do núcleo arqueado apresentam o transportador GLUT2, transportador de glicose, e dessa forma, podem estar envolvidos na mediação das respostas do hipotálamo à glicose (Young, 2002; Guillod-Maximin *et al.*, 2004).

Os astrócitos apresentam uma proteína ligante de ácidos graxos (bFABP) que regula a síntese de ácidos graxos e é particularmente expressa no hipotálamo (Kurtz *et al.* 1994; Young *et al.* 1996; Mukhopadhyay e Mukherjea, 1998). Esses astrócitos, ainda, se mostram imunoreativos para uma proteína ligante de acetil-CoA, cuja função é o transporte de lipídeos, expressa principalmente por células do núcleo arqueado (Chen *et al.* 2011). Dessa forma, é plausível que essas células também sejam influenciadas pelo excesso de ácido graxo na inflamação hipotalâmica.

Em relação à leptina, Young (2002) observou que os astrócitos estão intimamente relacionados com neurônios hipotalâmicos que respondem à leptina e controlam a síntese de

neuropeptídeos anorexigênicos e pro-termogênicos. E, segundo Pan *et al.* (2008) e Hsueh *et al.* (2009), astrócitos expressam receptor de leptina (ObR), um receptor transmembrana que interage com Janus quinase (JAK-2), com o fator de transdução e transcrição STAT-3 e MAPK (proteína quinase ativada por mitógenos). Além disso, de acordo com os mesmos autores, os astrócitos que constituem a barreira hematoencefálica participam do transporte de leptina para dentro do SNC. Tendo em vista que a dieta hiperlipídica aumenta a massa corporal, aumenta os níveis de leptina no sangue e induz resistência à leptina, que é observada por falhas na sinalização via STAT-3 em neurônios que expressam ObR, os autores sugerem que esses pontos podem indicar o envolvimento dos astrócitos ObR positivos no mecanismo gerador da resistência ao hormônio leptina. O aumento de STAT-3 leva ao aumento de SOCS-3 (supressor de sinalização de citocina- 3), esta é capaz de inibir a sinalização via receptor de leptina através da desfosforilação de Jak2 (Figura 2).



Physiol Rev 91: 389–411, 2011; doi:10.1152/physrev.00007.2010.

Figura 2: Sinalização do receptor de Leptina. Na sinalização normal do receptor Leptina, a ligação da leptina em seu receptor ativa a Janus quinase-2 (Jak2) resultando em fosforilação de resíduos de tirosina. A fosforilação destes resíduos recruta SHP-2, levando à ativação da ERK que ativa STAT5 (fator de transcrição 5) e STAT3 (fator de transcrição 3). A ativação da STAT3 leva ao aumento da expressão SOCS-3 (supressor de sinalização de citocina 3), que atua como um inibidor do feedback negativo da sinalização de leptina. Quando há inflamação hipotalâmica ocorre o aumento da expressão de SOCS-3. Paralelamente, há um aumento da proteína tirosina fosfatase (PTP) 1B que também é capaz de inibir a sinalização via receptor de leptina através da desfosforilação de Jak2.

O TNF- α tem recebido destaque na questão da resistência central à leptina, insulina e neuroinflamação. A utilização de anticorpo que bloqueia a ação desta citocina provoca perda de peso corporal e aumento da termogênese (Romanatto *et al.*, 2009). Níveis ligeiramente elevados de TNF- α no hipotálamo, devido a um processo inflamatório leve, induzem à resistência local aos hormônios insulina e leptina modulando, dessa forma, os neurotransmissores liberados para o controle da fome-saciedade (Romanatto *et al.*, 2007; Arruda *et al.*, 2011).

O intuito de mostrarmos a diversidade de atuação dos astrócitos é reforçar nosso questionamento sobre o papel dessas células nos processos de inflamação e apoptose no hipotálamo decorrente da ingestão de dietas hiperlipídicas. Sendo esses eventos multicelulares, tempo-dependentes e regulados por uma variedade de mecanismos moleculares extra e intracelulares, definir ações e papéis específicos dos astrócitos reativos, tanto na sua complexidade como na sua dinâmica temporal, representa um desafio substancial, e é nesse sentido, que procuramos contribuir para um melhor entendimento da obesidade enquanto doença e sempre tendo como objetivo futuro novas formas de tratamento e prevenção.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral:

Analisar a resposta de neurônios do hipotálamo aos astrócitos tratados com ácidos graxos saturados de cadeia longa.

3.2 Objetivos específicos:

- A. Estudar as respostas de astrócitos em relação à reatividade e produção de TNF- α frente à adição de ácidos graxos de cadeia longa e analisar diferenças entre astrócitos corticais e hipotalâmicos.
- B. Quantificar e analisar os efeitos do meio condicionado de culturas purificadas de astrócitos tratados com ácidos graxos saturados de cadeia longa em cultura de neurônios hipotalâmicos quanto à morte celular.
- C. Quantificar e analisar a proliferação celular de culturas de neurônios hipotalâmicos após adição de meio de cultura condicionado obtido em culturas purificadas de astrócitos tratados com ácidos graxos de cadeia longa e comparar com culturas controles.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados neonatos da linhagem Swiss (primeiro ou segundo dia pós-natal, ambos os sexos) para a cultura primária de astrócitos. Todos os experimentos com utilização de animais desse trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética na Utilização de animais da UFU (CEUA/UFU) sob o protocolo nº 040/10 (ANEXO A).

4.2 Cultura primária de astrócitos

Foram feitas culturas primárias de astrócitos corticais e hipotalâmicos, onde estas foram estabelecidas através da dissociação do córtex cerebral e do hipotálamo respectivamente (McCarthy e De Vellis, 1980).

A extração de tecido foi realizada com material cirúrgico estéril. Culturas purificadas de astrócitos foram estabelecidas através da dissociação do hipotálamo e do córtex cerebral de camundongos neonatos pela dissecação e fragmentação. Esses fragmentos foram lavados com solução tampão sem cálcio e magnésio (PBS flush, 0,1M, pH 7,4, com antibiótico, Nutricell) e tripsinizado durante 10min a 37°C. Findo o tempo de tripsinização, foi adicionado soro fetal bovino (SFB) para bloqueio da ação enzimática. A solução sobrenadante foi colocada sobre um gradiente de albumin sérica bovina (BSA) diluída a 4% em meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) em tubo tipo Falcon de 15 ml e submetido à centrifugação (Centribio, Tecnal, 1.500 RPM por 10 minutos). O sobrenadante foi eliminado e o precipitado semeado em garrafas de cultura de 25cm² (TPP, Suíça) com meio DMEM (pH 7,4, GIBCO, Brasil) acrescido de 10% SFB (Nutricell, Brasil) e estocadas em incubadora (Nuare, EUA) sob temperatura de 37°C e atmosfera de 5% de CO₂ até atingir a confluência. Após a confluência celular nas garrafas de cultivo, as células foram descoladas com tripsina e submetidas à nova centrifugação. Após a centrifugação as células foram semeadas em placas de 24 ou 96 poços (TPP, Suíça) numa densidade de 5x10⁴ ou 5x10³ células por poço, respectivamente, e mantidas em incubadora para o tratamento com ácidos graxos.

4.3 Tratamento com ácidos graxos saturados e produção de meio condicionado

Os ácidos graxos (AG) foram selecionados baseado no trabalho de Milanski *et al.* (2009). Nesse trabalho os ácidos esteárico (estereato, 18 carbonos) e palmítico (palmitato, 16

carbonos) promoveram uma reação inflamatória no hipotálamo quando inseridos no ventrículo lateral de ratos.

Para a administração destes ácidos nas culturas, ambos foram separadamente diluídos em solução de BSA em concentração 3:1 (AG:BSA) e dispostos nas culturas de astrócitos. Foram realizados dois experimentos sequenciais, o primeiro experimento foi um teste-piloto para definirmos dose e tempo de tratamento usando placas de 96 poços (Tabela 1), e, o segundo experimento, usando a dose e tempo determinado no teste piloto, teve como foco a coleta do meio retirado de astrócitos pós-tratamento (confeção do meio condicionado) e imunocitoquímica sobre as células, e para isso, foram usadas culturas em placas de 24 poços.

	50 μ M	100 μ M	200 μ M	500 μ M
Estereato	X	X	x	x
Palmitato	X	X	x	x

Tabela 1: Descrição dos grupos com diferentes doses de tratamento sobre cultura de astrócitos (teste piloto). Esse tratamento foi mantido: 12h, 24h, 72h e 5 dias.

Os meios foram renovados a cada dois dias e culturas controles também foram realizadas. Com os resultados do teste piloto foram construídas curvas dose x efeito, onde o efeito foi observado pela reatividade dos astrócitos avaliada pela imunomarcagem anti-GFAP, e através dessas curvas, foram obtidos as doses e tempo experimentais que foram utilizados nos demais procedimentos.

Para o experimento de produção de meio condicionado realizou-se administração de AG em culturas de astrócitos, o meio recolhido foi mantido em contato com os astrócitos por 3 dias e em seguida congelados para posterior utilização no tratamento das culturas neuronais. Culturas tratadas apenas com DMEM+SFB 10% foram usadas para produção de meio condicionado controle.

4.4 Dosagem de TNF- α no meio condicionado através de ELISA

A citocina TNF- α foi quantificada no meio de cultura de cada condição a qual foi submetida às culturas primárias de astrócitos utilizando o kit de Elisa (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) segundo protocolo do fabricante. Resumidamente, diluições do meio condicionado foram adicionadas em duplicata em placas de ELISA

preparadas com anticorpo monoclonal específico contra TNF- α . Um anticorpo secundário conjugado com peroxidase também foi adicionado. Sequencialmente, lavagens foram realizadas para remoção de qualquer resíduo, uma solução substrato foi adicionada aos poços (50 μ l de solução 1:1 peróxido de hidrogênio e tetrametilbenzidina 10 mg/ml em DMSO). A reação de coloração foi bloqueada após 20 minutos de incubação com ácido sulfúrico 2N (50 μ L) e a intensidade da coloração foi medida em espectrofotômetro utilizando comprimento de onda de 540 nm (E max, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Os padrões foram diluições de 0.5-log_{10} de citocinas recombinantes de camundongos com sensibilidade de detecção de 7.5 pg ml^{-1} a 1000 pg ml^{-1} (100 μ l). Os resultados foram expressos em pg de citocina por ml de meio.

4.5 Cultura de neurônios hipotalâmicos – CLU189

As células CLU189 são neurônios imortalizados de camundongos. Estas células foram imortalizadas pela transferência retroviral de SV40T-Ag à cultura neuronal hipotalâmica primária. Esta linhagem celular expressa uma gama cada vez maior de neuropeptídios, marcadores enzimáticos e receptores biologicamente ativos. Diante de tais características, estas células permitem ensaios *in vitro* precisos para o desenvolvimento e validação de estudos direcionados a doenças do SNC, ou seja, distúrbios decorrentes deste sistema, como a obesidade, estresse e distúrbios metabólicos. Uma alíquota de CLU189 foi gentilmente doada ao nosso laboratório pelo Prof. Dr. Lício Augusto Velloso, coordenador do Laboratório de Gastroenterologia Experimental da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp (Origem CLU189: Banco de Células do Rio de Janeiro). Essa alíquota foi expandida e rendeu pelo menos dez criotubos com 10^6 células cada alíquota, que foram congeladas e mantidas em nitrogênio líquido para a realização dos experimentos.

Para o tratamento com meio condicionado, uma ou duas alíquotas de CLU189 foram descongeladas rapidamente e semeadas em garrafas de cultura 25cm^2 (TPP, Suíça) suplementadas com DMEM alta glicose (4,5g/L) com 10% de SFB, mantidas em incubadora com atmosfera de 5% de CO_2 a 37°C até a confluência. Após a confluência as células foram descoladas com tripsina e plaqueadas em placas de 96 poços (TPP, Suíça) na quantidade de 5×10^3 células por poço. Após 24h do plaqueamento deu-se início ao tratamento com meio condicionado sobre as culturas de CLU189 durante 3 ou 6 dias utilizando os ácidos graxos estereato e palmitato na dose de $200\mu\text{M}$. Com renovação do meio de cultura em dias

alternados e com realização de culturas controles, para o tratamento o SFB foi usado na dosagem de 3%. Os grupos de culturas se encontram na Figura 3.

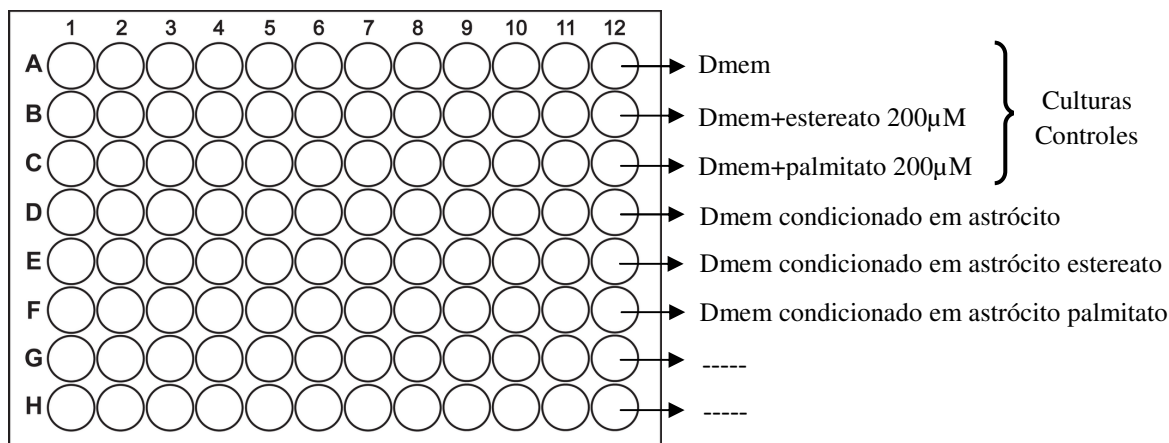


Figura 3: Representação esquemática da placa de 96 poços com os grupos de cultura de CLU189 tratados com diferentes condições.

4.6 Imunocitoquímica

Primeiramente foi realizada imunocitoquímica nas culturas astrocitárias e posteriormente nas neuronais. Sendo assim, as culturas foram fixadas com formalina 10% por 10 minutos e, posteriormente, lavadas com PBS (0,1M, pH 7,4, Nutricell, Brasil). As placas com células fixadas foram posteriormente incubadas com 300µl (placa 24 poços) ou 80µl (placa 96 poços) de solução de albumina bovina 3% e 0,2% de triton em PBS 0,01M, pH 7,4 por 1h para o bloqueio de ligações do anticorpo com proteínas inespecíficas. Findo este procedimento, as culturas celulares foram incubadas *overnight* em temperatura de 4°C com diferentes tipos de anticorpos primários diluídos em solução acrescida de albumina bovina 1% em PBS 0,01M. Nas culturas de astrócitos foram utilizados os anticorpos primários cabra anti-GFAP (Santa Cruz Biotechnology, 1:100) para avaliar o grau de reatividade glial e, coelho anti-NFκBp65 (Santa Cruz Biotechnology, 1:100) para avaliar a produção de mediadores inflamatórios (Stephenson *et al.*, 2000). Já na cultura de CLU 189 foram utilizados os anticorpos primários coelho anti-caspase 3 ativada (Abcam, 1:200) para avaliar morte celular por apoptose e, o anticorpo primário cabra anti-ki-67 (Santa Cruz Biotechnology, 1:100) para avaliar a proliferação celular.

Após a incubação com anticorpo primário, as culturas foram lavadas três vezes de cinco minutos cada com PBS e, incubadas durante 1h com seus respectivos anticorpos

secundários conjugado com partícula fluorescente em temperatura ambiente protegido de luz. Os anticorpos secundários foram anticorpos anti-IgG de cabra para GFAP e Ki-67 (Alexa fluor 594 ou 488, Jackson Laboratory, 1:300) e, anticorpo secundário anti-IgG de coelho para caspase e NFκB (Alexa fluor 594 ou 488, Jackson Laboratory, 1:300). Findo o tempo de incubação e lavagens as culturas foram mantidas com glicerol/PBS (1:1) com DAPI (10μg/ml) para análise em microscópio invertido de fluorescência (Nikon, modelo Eclipse Ti-S). O DAPI foi utilizado por ser um marcador fluorescente do DNA nuclear que torna possível a contagem do número de células presente em cultura, bem como a identificação de cada célula.

Posteriormente, as placas de culturas foram fotografadas com câmera fotográfica digital acoplada ao microscópio de fluorescência para captura de pelo menos quatro regiões/poço para cada condição experimental representativas das características do poço. As imagens foram analisadas a fim de quantificar as imunomarcações através da densidade integrada de pixels ou quantificação de pontos fluorescentes indicativos da marcação utilizando o software ImageJ 1.33u. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.7 Análise Estatística

Foi realizada a análise descritiva primeiramente para analisarmos a distribuição de nossos dados numéricos. Diante dos resultados descritivos, escolheu-se o teste ANOVA um critério com pós-teste adequado conforme necessidade dos dados para comparação entre os grupos. Anteriormente à aplicação de testes não paramétricos, foi tentada sempre a transformação de médias em base $\log_{10}$ ou em raiz quadrática para realização de testes paramétricos quando possível. Caso, mesmo com as transformações de médias, nosso conjunto de dados não mostrasse distribuição normal, aplicou-se o teste não paramétrico U de Mann Whitney. Assumiu-se para todos os testes comparativos níveis de significância de p [*] $p < 0,05$, [**] $p < 0,01$, [***] $p < 0,001$. Os resultados foram apresentados como média ± erro padrão (ep).

5. RESULTADOS

5.1 Curva dose x efeito

Foi realizado o tratamento com diferentes doses de ácidos graxos saturados baseando no trabalho publicado por Milanski *et al.* (2009). Partindo da dose mais pró-inflamatória utilizada pelo referido trabalho, 225 μ M, testamos doses aproximadamente 25% e 50% menor e doses 2 e 4 vezes superior. Com isso as doses testadas para os ácidos graxos palmitato e estereato foram de 50, 100, 200 e 500 μ M.

Os tempos de tratamento também foram variados em 12h, 24h, 72h e 5 dias. Nesses tempos pré-estabelecidos, os poços de culturas tratados e controles foram fixados para a quantificação da reatividade astrogliar analisada através da imunomarcação com anticorpo anti-GFAP. Após a realização da imunocitoquímica e quantificação da densidade integrada de pixel das imagens documentadas em microscopia de fluorescência, foram construídas duas curvas dose x efeito, uma para cada AG testado (Figura 4). Nem todos os valores estão mostrados nos gráficos para melhor visualização dos mesmos.

Após análise das curvas percebemos que a curva de tratamento no tempo de 5 dias para os dois ácidos graxos foi mais homogênea e representa melhor uma dieta crônica com alto teor de gordura. Para a escolha das doses, atentou-se para aquela que primeiramente interferiu, intensificando ou reduzindo, a reatividade das células, medida através da expressão de GFAP. Nesse contexto, foram selecionadas as doses de 100 e 200 μ M para o estereato e 200 e 500 μ M para o palmitato.

5.2 Tratamento com ácido graxo saturado promove maior reatividade e aumento da expressão de NF κ B em astrócitos do hipotálamo

Foram feitas análises sobre a reatividade de astrócitos de origem hipotalâmica e cortical induzida por ácidos graxos. Percebemos que os astrócitos corticais não alteraram sua atividade diante deste tratamento, e o contrário ocorreu com astrócitos do hipotálamo, que responderam com aumento da expressão de GFAP frente à adição de gordura saturada no meio de cultura (figuras 5, 6, 7 e 8). A Figura 5 apresenta o tratamento com estereato sobre os astrócitos hipotalâmicos, esse foi o tratamento que mais interferiu no comportamento celular, havendo aumento da expressão de GFAP e NF κ B principalmente com a dose de 200 μ M de estereato (Tabela 2 e Figura 5).

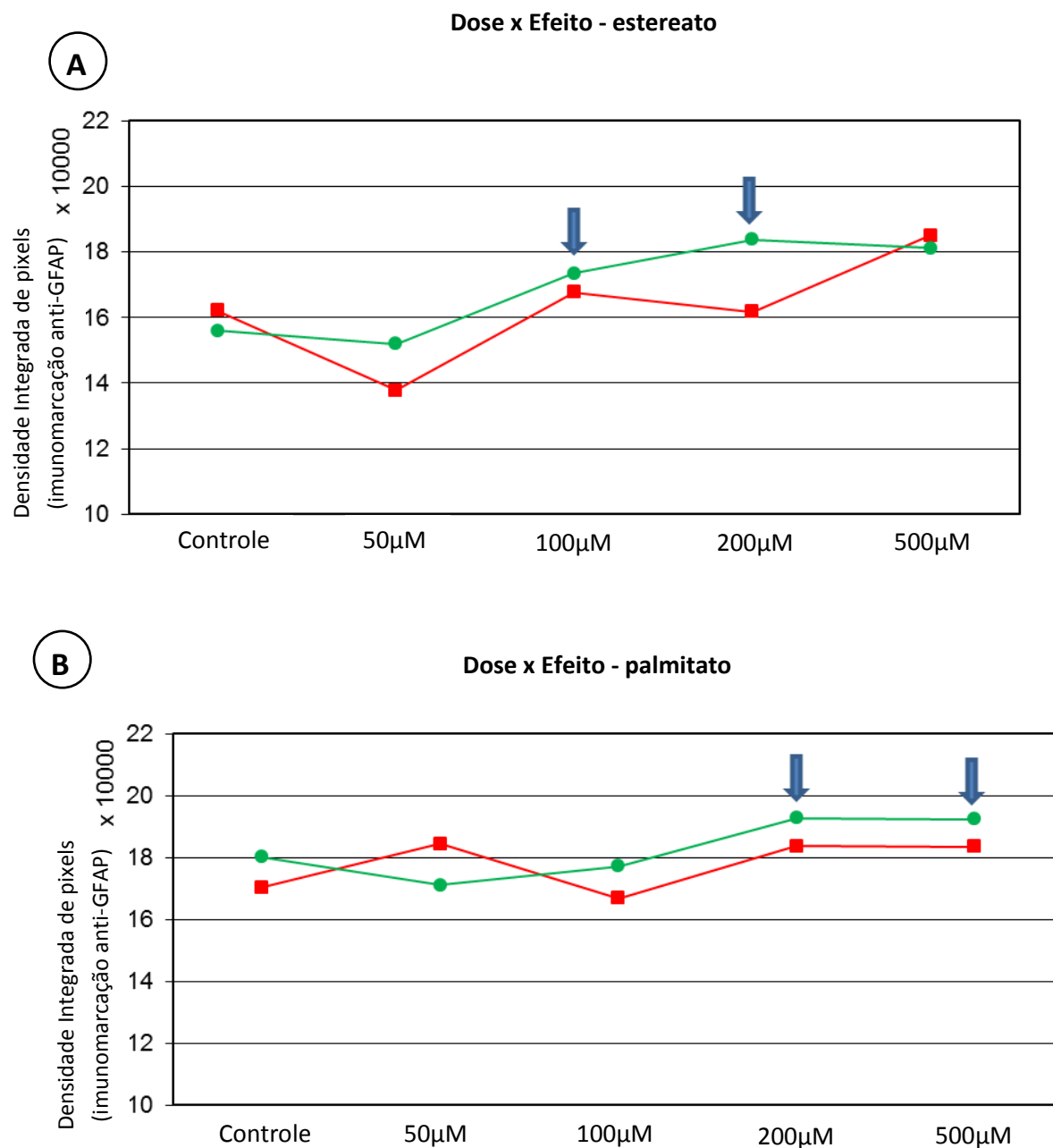


Figura 4: Curvas dose x efeito para os ácidos estereato (A) e palmitato (B). O eixo x indica as diferentes doses utilizadas: controle, 50µM, 100 µM, 200 µM, 500 µM e overdose. No eixo y, a densidade integrada de pixel para imunomarcção anti-GFAP. Linha **verde** representa os dados do tempo de 5 dias de tratamento e linha **vermelha** dados de 24horas de tratamento. Flecha azul indica pontos de alteração da curva.

Porém, todas as doses utilizadas e mesmo a overdose resultaram em valores estatisticamente diferentes do grupo controle. O outro ácido utilizado sobre os astrócitos hipotalâmicos (Tabela 3), o palmitato, se mostrou menos influente sobre a reatividade glial, causando aumento da expressão principalmente com a dose de 500µM, porém na análise

comparativa entre os dados, não houve diferença significativa (Tabela 3 e figura 6). Os astrócitos corticais tratados com diferentes doses de estereato (Tabela 4) ou palmitato (Tabela 5) não apresentaram alteração na reatividade glial e imunoreatividade para NFκB, quando comparados às culturas controles (Figuras 7 e 8).

Observe que no tratamento somente a overdose interferiu na expressão das proteínas, diminuindo-as, provavelmente por algum efeito tóxico, que comprometeu a viabilidade celular, causado pelo excesso de ácido diluído no meio de cultura. Enquanto as outras doses não promovem nenhuma diferença de expressão de GFAP ou NFκB em relação às culturas controles (Figura 8).

Astrócitos Hipotalâmicos + Estereato		
Condição Experimental	GFAP	NFκB
Controle	206679 ± 17661	321401 ± 16526
100μM	289356 ± 18606 ***	402657 ± 18855 **
200μM	312103 ± 16235 ***	436277 ± 9462 **
Overdose	267447 ± 14379 *	310960 ± 39750 *

Tabela 2: Densidade integrada de pixels referente à imunomarcagem para GFAP e NFκB após tratamento com estereato em astrócitos hipotalâmicos. Teste ANOVA 1 critério com pós-teste *t*. p [*] p<0,05, [**] p<0,01, [***] p<0,001.

Astrócitos Hipotalâmicos + Palmitato		
Condição Experimental	GFAP	NFκB
Controle	222199 ± 19924	292510 ± 12353
200μM	224924 ± 16089	298012 ± 16300
500μM	253384 ± 9135	299696 ± 15430
Overdose	180626 ± 38784	297916 ± 19007

Tabela 3: Densidade integrada de pixels referente à imunomarcagem para GFAP e NFκB após tratamento com palmitato em astrócitos hipotalâmicos. Teste ANOVA 1 critério com pós-teste *t*.

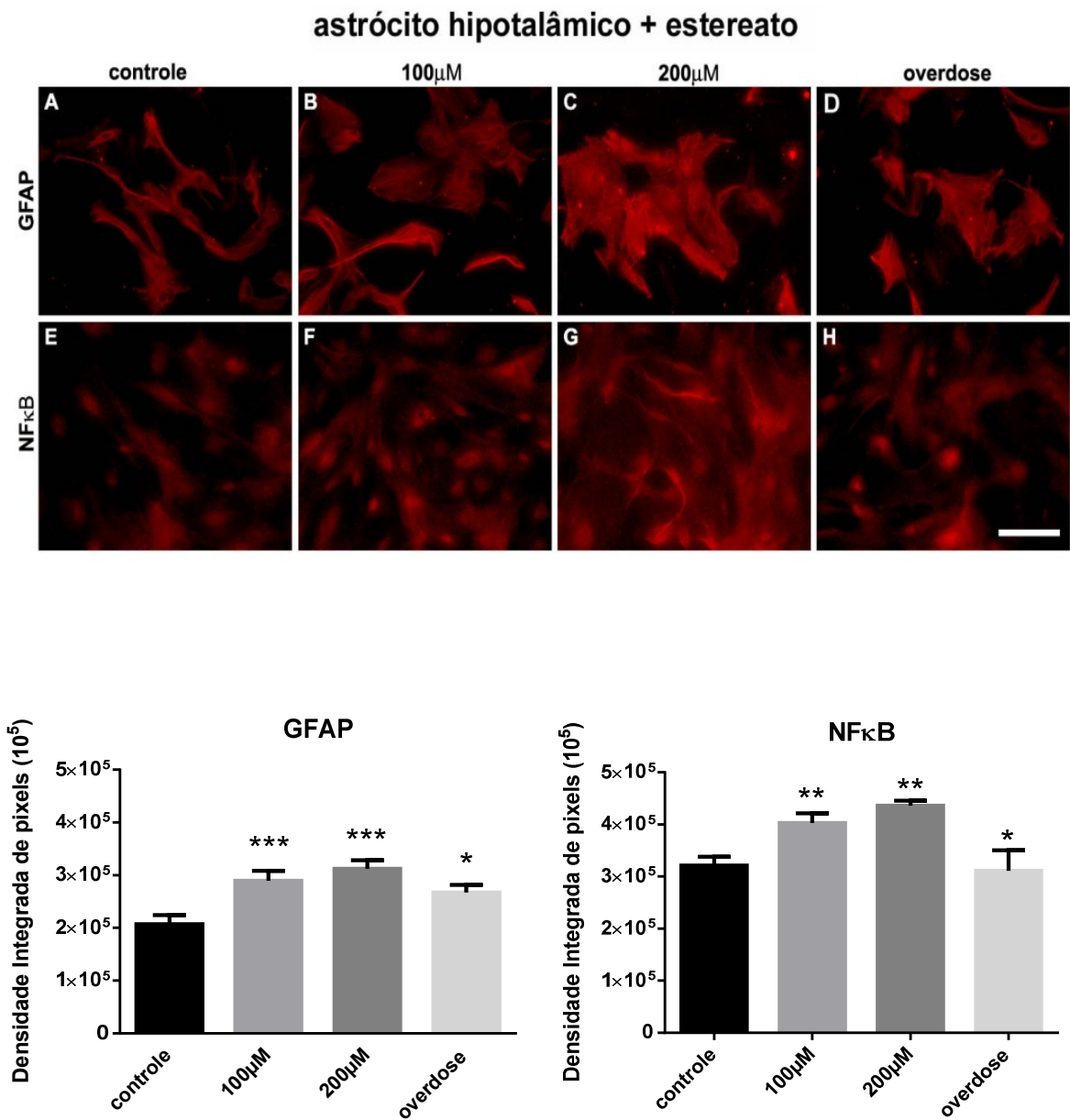


Figura 5: Imunomarcção anti-GFAP e anti-NFκB após 5 dias de tratamento com estereato sobre astrócitos hipotalâmicos. A figura apresenta culturas controles (A e E) e tratadas com diferentes doses de estereato, sendo (B e F) concentração de 100μM, (C e G) 200μM e (D e H) overdose de 10x da maior concentração utilizada (2mM). Observe que o tratamento com doses crescentes de estereato intensifica a expressão de GFAP e NFκB. A queda, mostrada pela quantificação de pixel nas culturas tratadas com overdose traduz a diminuição do número de células devido, provavelmente, à toxicidade causada pelo excesso de estereato no meio de cultura. Escala = 100 μm. Teste ANOVA 1 critério com pós-teste *t*. p [*] p<0,05, [**] p<0,01, [***] p<0,001.

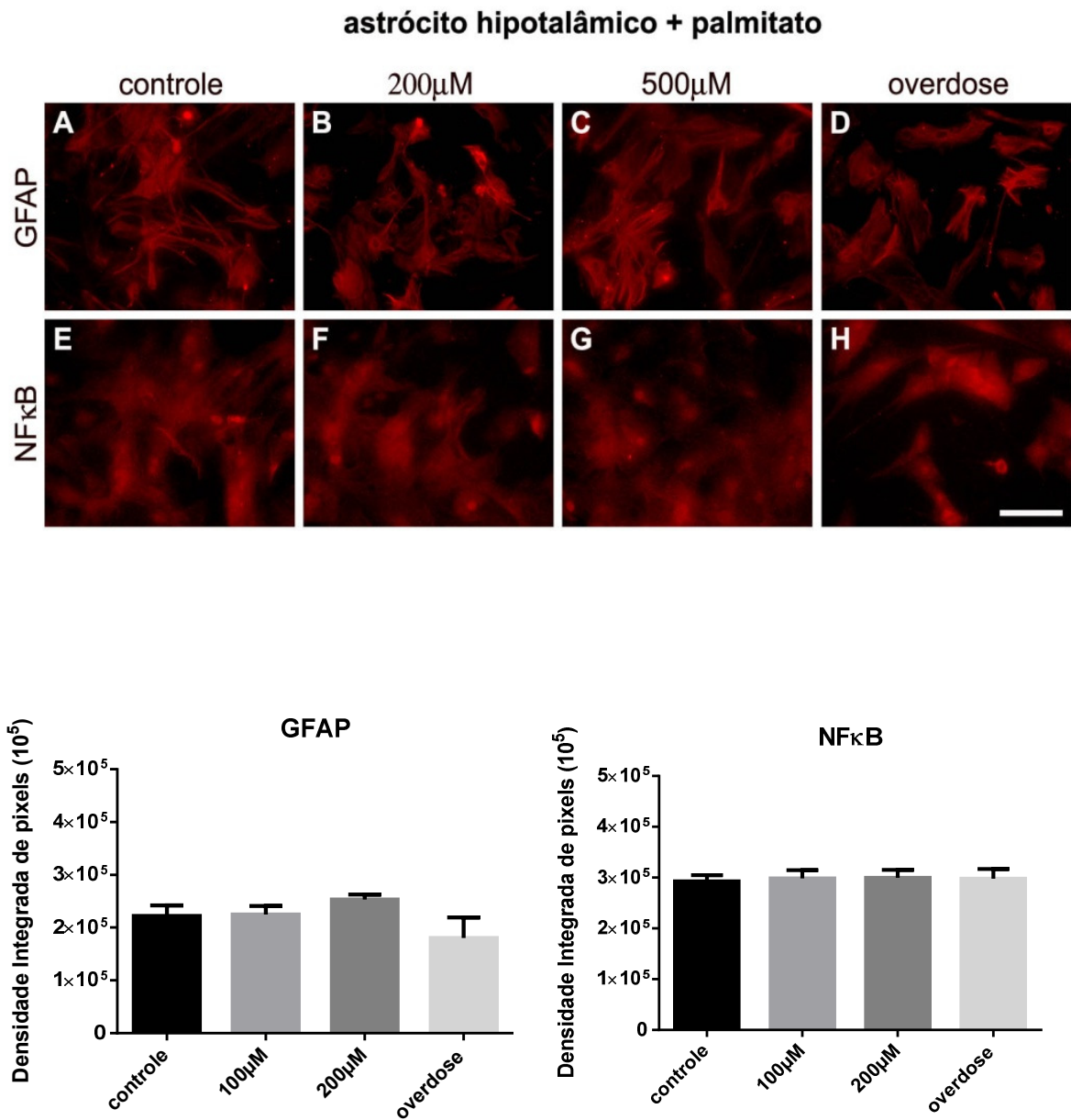


Figura 6: Imunomarcção anti-GFAP e anti-NFκB após 5 dias de tratamento com palmitato sobre astrócitos hipotalâmicos. A figura apresenta culturas controles (**A e E**) e tratadas com diferentes doses de palmitato, sendo (**B e F**) concentração de 200μM, (**C e G**) 500μM e (**D e H**) overdose de 10x da maior concentração utilizada (5mM). Observe que o tratamento com a dose de 500μM tende a aumentar a expressão de GFAP, mas não de NFκB, porém sem diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Escala = 100 μm. Teste ANOVA 1 critério com pós-teste *t*.

Astrócitos Corticais + Estereato		
Condição Experimental	GFAP	NFκB
Controle	255326 ± 28579	315174 ± 11714
100μM	267616 ± 13193	339108 ± 9938
200μM	265359 ± 16233	331659 ± 23321
Overdose	265296 ± 29969	358975 ± 20922

Tabela 4: Densidade integrada de pixels referente à imunomarcção para GFAP e NFκB após tratamento com estereato em astrócitos corticais. Teste ANOVA 1 critério com pós-teste *t*.

Astrócitos Corticais + Palmitato		
Condição Experimental	GFAP	NFκB
Controle	314761 ± 17460	316056 ± 8087
200μM	294374 ± 19178	324137 ± 11661
500μM	291254 ± 17907	323035 ± 19705
Overdose	239111 ± 23931 *	237386 ± 5153 *

Tabela 5: Densidade integrada de pixels referente à imunomarcção para GFAP e NFκB após tratamento com palmitato em astrócitos corticais. Teste ANOVA 1 critério com pós-teste *t*. p [*] p<0,05.

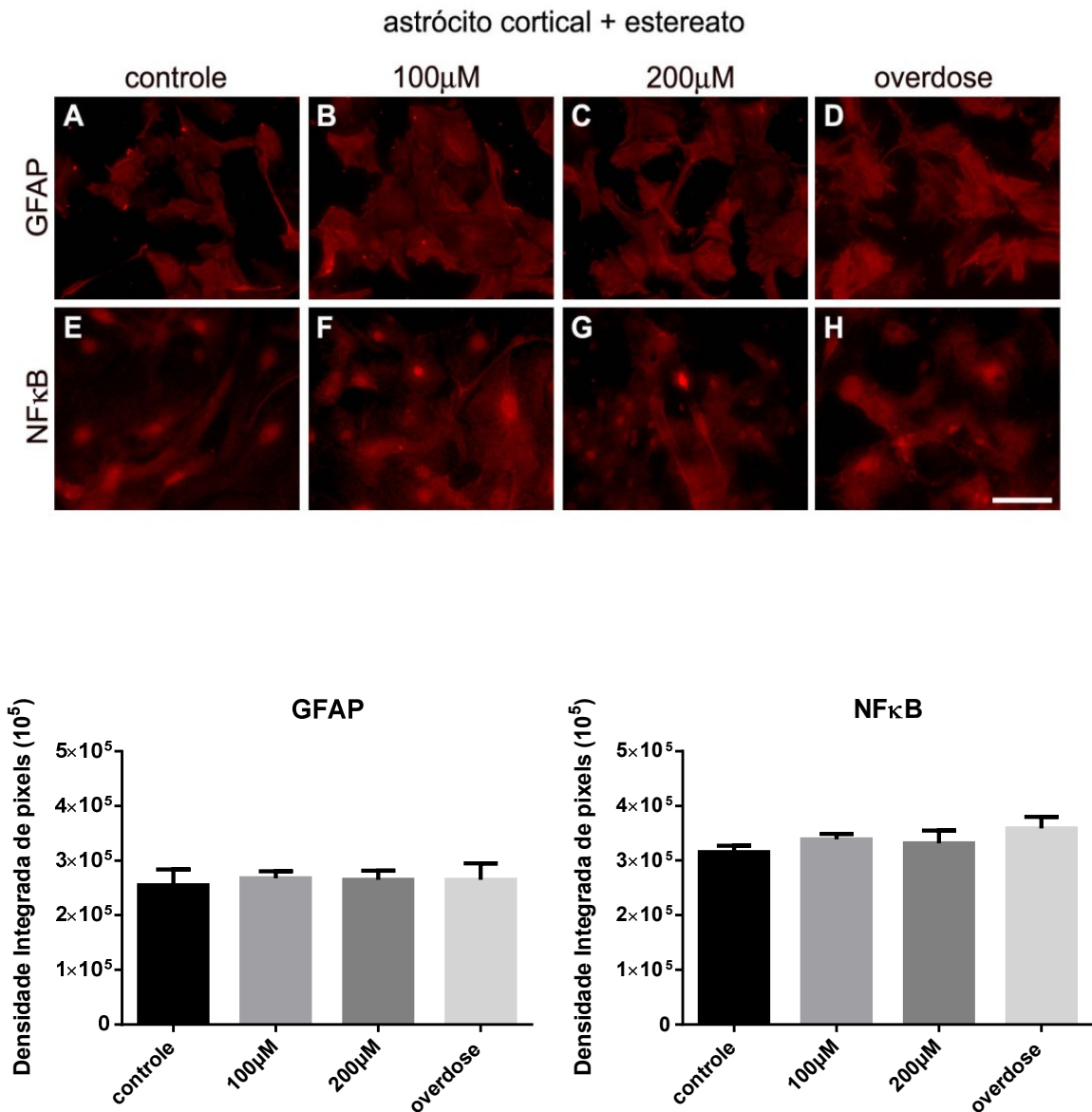


Figura 7: Imunomarcção anti-GFAP e anti-NF κ B após 5 dias de tratamento com estereato sobre astrócitos corticais. A figura apresenta culturas controles (**A e E**) e tratadas com diferentes doses de estereato, sendo (**B e F**) concentração de 100 μ M, (**C e G**) 200 μ M e (**D e H**) overdose de 10x da maior concentração utilizada (2mM). Observe que o tratamento não promove nenhuma diferença de expressão de GFAP ou NF κ B em relação às culturas controles. Escala = 100 μ m. Teste ANOVA 1 critério com pós-teste *t*.

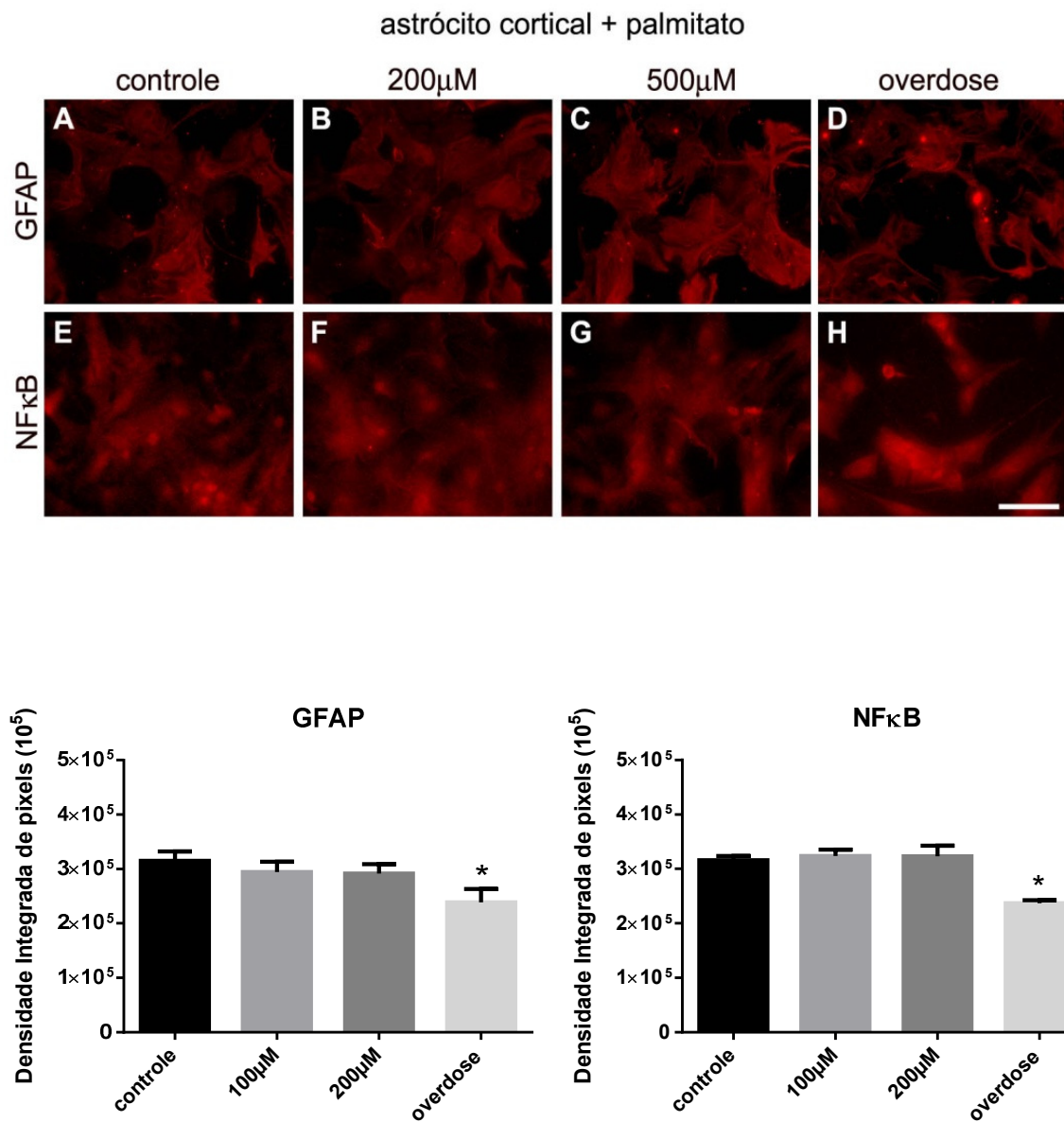


Figura 8: Imunomarcção anti-GFAP e anti-NF κ B após 5 dias de tratamento com palmitato sobre astrócitos corticais. A figura apresenta culturas controles (**A e E**) e tratadas com diferentes doses de palmitato, sendo (**B e F**) concentração de 200 μ M, (**C e G**) 500 μ M e (**D e H**) overdose de 10x da maior concentração utilizada (5mM). Escala = 100 μ m. Teste ANOVA 1 critério com pós-teste *t*. p [*] p<0,05.

5.3 Dosagem de TNF- α em meio condicionado: astrócitos corticais expressam menor nível de TNF frente ao tratamento com ácido graxo saturado em relação aos astrócitos hipotalâmicos

Após o tratamento o meio condicionado foi recolhido para a realização da dosagem de TNF- α destas culturas pelo método ELISA. A partir dos dados obtidos é possível observar que os astrócitos hipotalâmicos tratados com AGs, responderam ao tratamento com o aumento da liberação da citocina TNF- α (Figura 9). Em contraste, os astrócitos corticais não responderam ao tratamento com AG em relação à produção dessa citocina, mantendo os níveis de TNF- α estatisticamente semelhantes àqueles observados em amostras não tratadas.

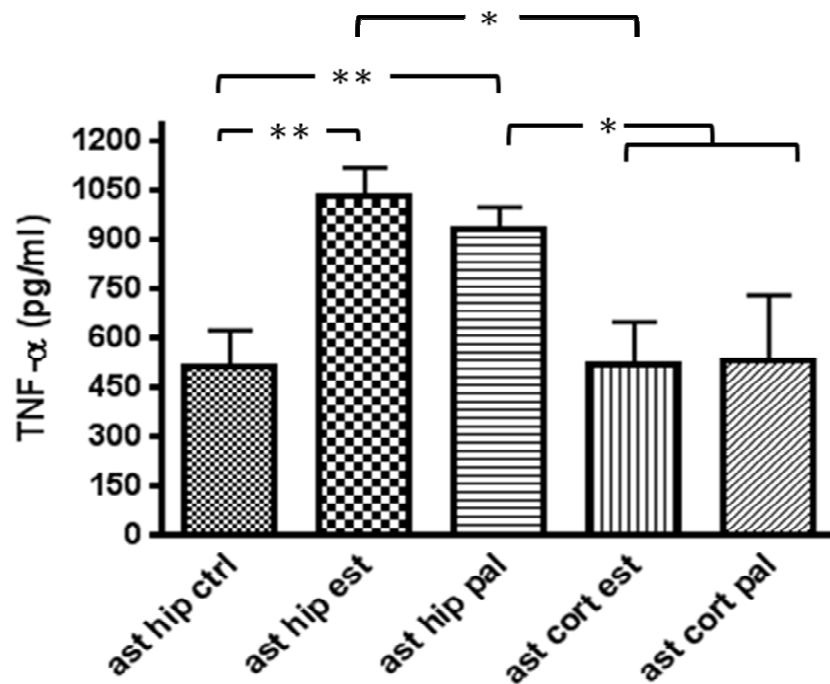


Figura 9: Dosagem de TNF- α em astrócitos corticais (cort) e hipotalâmicos (hip) quando submetidos ao tratamento com AG, estereato (est) e palmitato (pal). Observe que os astrócitos corticais não respondem ao tratamento com AG mantendo níveis de TNF- α estatisticamente semelhantes aos astrócitos não tratados. Ast cort: astrócitos corticais; ast hip est: astrócitos hipotalâmicos estereato; ast hip pal: astrócitos hipotalâmicos palmitato; ast cort est: astrócitos corticais estereato; ast cort pal: astrócitos corticais palmitato. p [*] $p < 0,05$, [**] $p < 0,01$.

5.4 As culturas de CLU189 tratadas com meio condicionado tem a tendência de apresentar uma maior taxa de proliferação celular do que morte celular

Foi realizado o tratamento de culturas CLU189 conforme grupos mostrados na Figura 2 e terminado o tempo de tratamento de 3 ou 6 dias foi realizada a imunocitoquímica com os anticorpos anti-caspase3 e anti-Ki-67.

A quantidade de células foi mensurada após 3 e 6 dias de tratamento para avaliação do crescimento celular sob influência das condições aplicadas às células. No terceiro dia foi possível notar um crescimento significativo nas condições experimentais que receberam o AG diretamente (Figura 10A). Porém, as células tratadas com o meio condicionado foram semelhantes aos controles. Já no 6º dia de tratamento (Figura 10B), não houve diferença no número de células entre as diferentes condições experimentais. Entretanto, ao compararmos o número de células referente ao tempo de 6 dias, nas diferentes condições experimentais, com o número de células quantificadas no 3º dia, observamos que, com exceção da condição controle, há um menor número de células por condição experimental. Este fato, portanto, mostra uma redução no número de células, inclusive de maior magnitude nas culturas CLU189 tratadas diretamente com AGs. Ainda, comparando-se todos os grupos em relação ao número total de células por cultura não houve diferença estatisticamente significativa.

A morte celular por apoptose traduzida pela presença da caspase3 ativada foi quantificada nas culturas de 3 e 6 dias (Figura 11 e 12). As culturas tratadas por 3 dias apresentaram maior quantidade de células caspase3 positivas naquelas condições que receberam diretamente o AG. Já as culturas tratadas com o meio condicionado apresentaram uma taxa de células apoptóticas semelhante ao controle condicionado e ao controle somente com DMEM, sugerindo que o aumento de TNF- α no meio condicionado em astrócitos tratados com AGs não induziu aumento no número de neurônios apoptóticos, apontando possível neuroproteção conferida por esses meios condicionados (Figuras 9 e 11). Adicionalmente, as condições tratadas com meios condicionados apresentaram uma quantidade significativamente menor de células caspase3 positivas em relação à condição tratada diretamente com estereato (Tabela 6). Nas culturas tratadas por 6 dias a quantidade de células apoptóticas observada foi estatisticamente semelhante em todas as condições experimentais, tendo uma diminuição significativa apenas naquela tratada com meio condicionado em relação à cultura tratada com palmitato diretamente. No entanto, o gráfico da Figura 11 mostra que existe uma tendência de um menor número de células caspase3

positivas nas culturas tratadas com meio condicionado em astrócitos, tanto em astrócitos sem AG como naqueles nos quais foram adicionados AG (Tabela 6).

O outro marcador analisado nas culturas tratadas por 6 dias foi o ki-67, proteína presente somente nas células que estão em proliferação (Figura 13). A partir dos dados obtidos é possível observar que as culturas tratadas diretamente com AG apresentaram uma queda significativa na taxa de proliferação celular em relação ao controle (sem ácido graxo) e às culturas tratadas com meio condicionado, porém para essas últimas, sem significância estatística (Tabela 6). No entanto, as culturas tratadas com meio condicionado tem a tendência de apresentar uma maior taxa de proliferação celular do que morte celular, portanto, um meio com característica neuroprotetoras e não pró-apoptóticas (Figura 14).

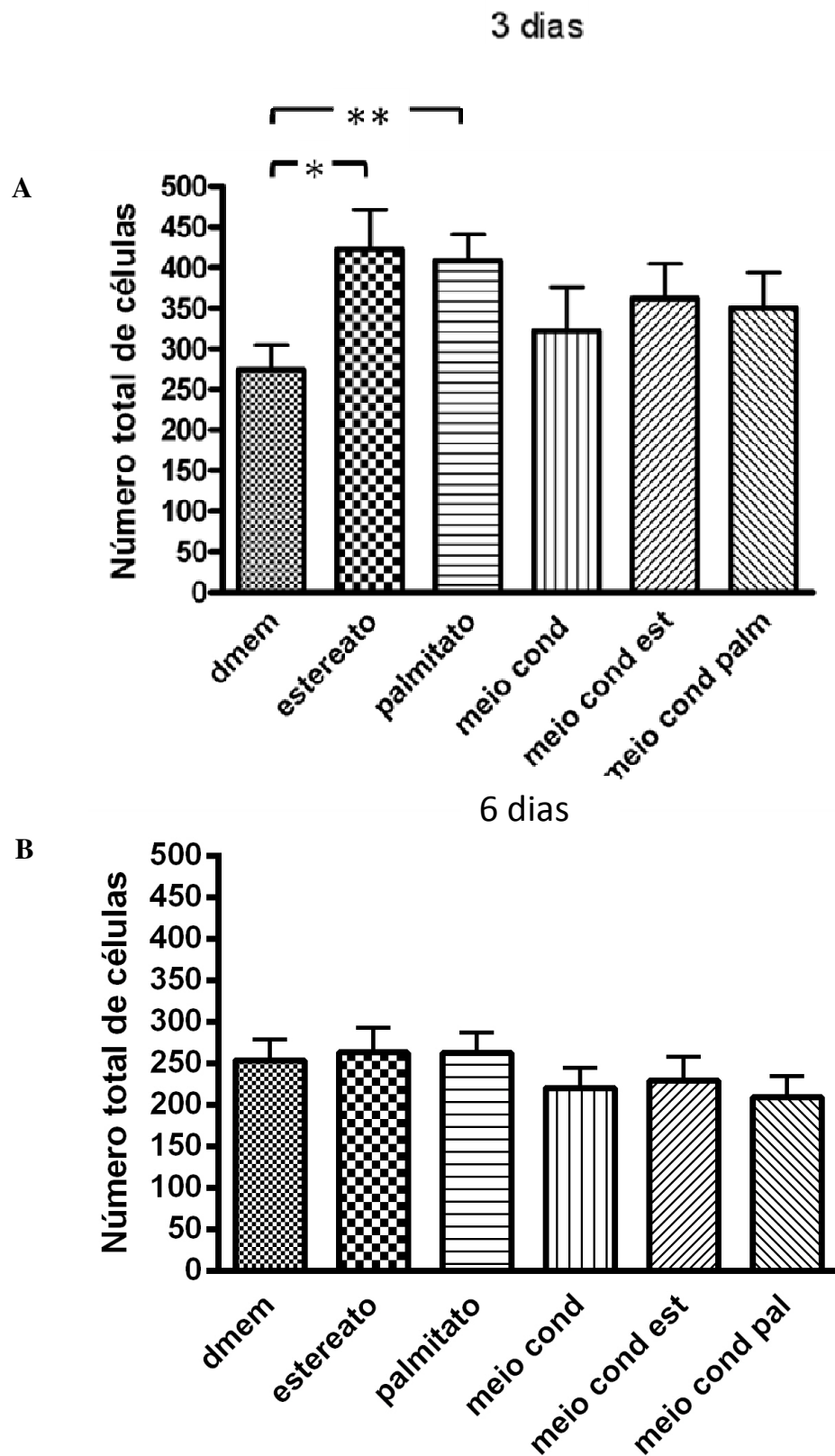


Figura 10: Quantidade de células em cultura ao longo do experimento, 3 dias (A) e 6 dias (B) para cada condição experimental. Testes U de Mann Whitney para (A) e ANOVA 1 critério com pós-teste de Bonferroni para (B). p [*] $p < 0,05$, [**] $p < 0,01$.

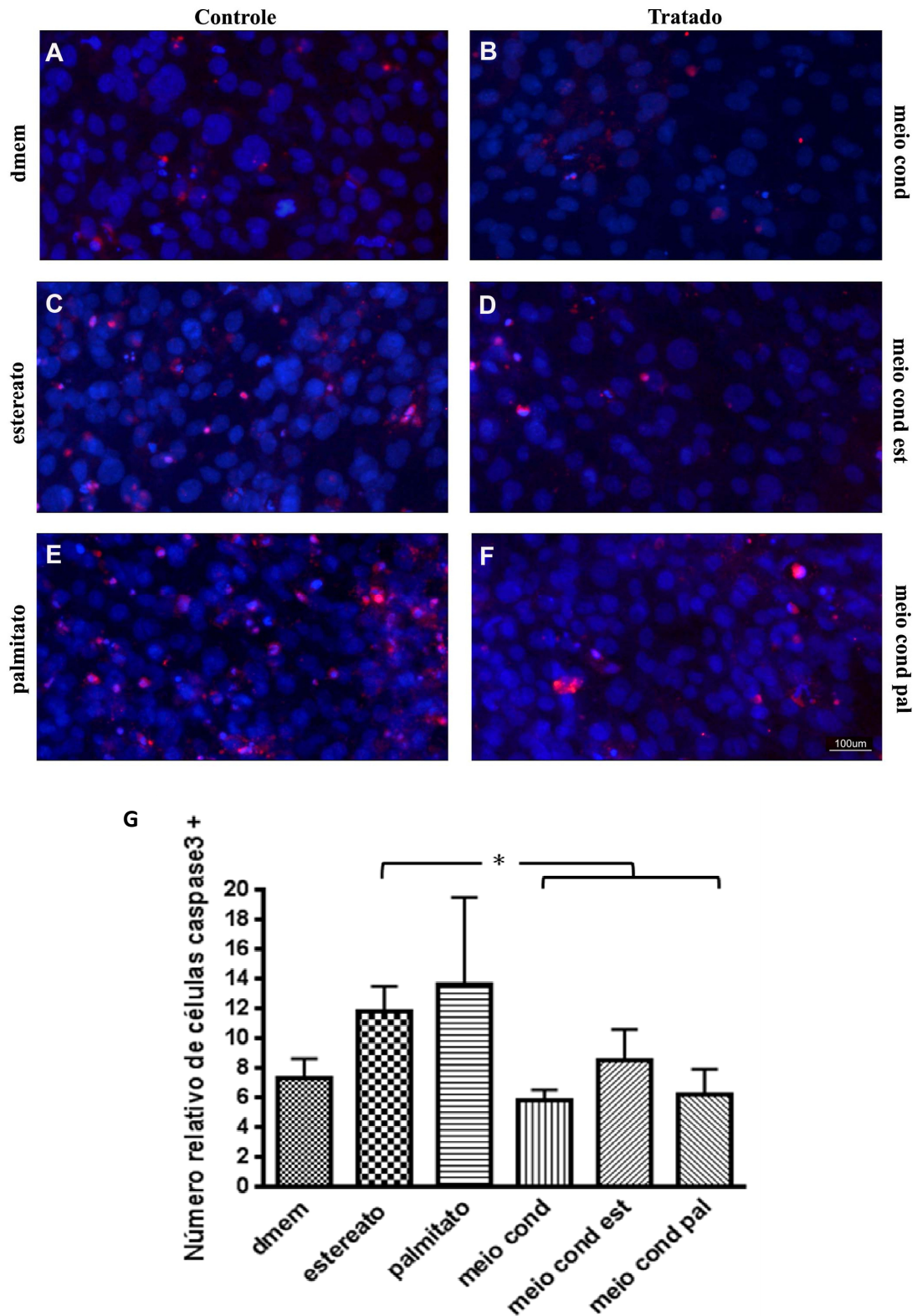


Figura 11: Cultura de CLU189 tratadas com ácido graxos de cadeia longa por 3 dias e, marcadas com DAPI (azul) e caspase3 (vermelho). As imagens A, C e E são culturas controles tratadas diretamente com o ácido graxo de cadeia longa. E, as imagens B, D e F são culturas tratadas com o meio condicionado obtido de cultura tratadas de astrócitos. O gráfico G, mostra a quantificação dos pontos de marcação anti-caspase3 em cada condição experimental. Escala = 100µm. Teste U de Mann Whitney. [*] $p < 0,05$.

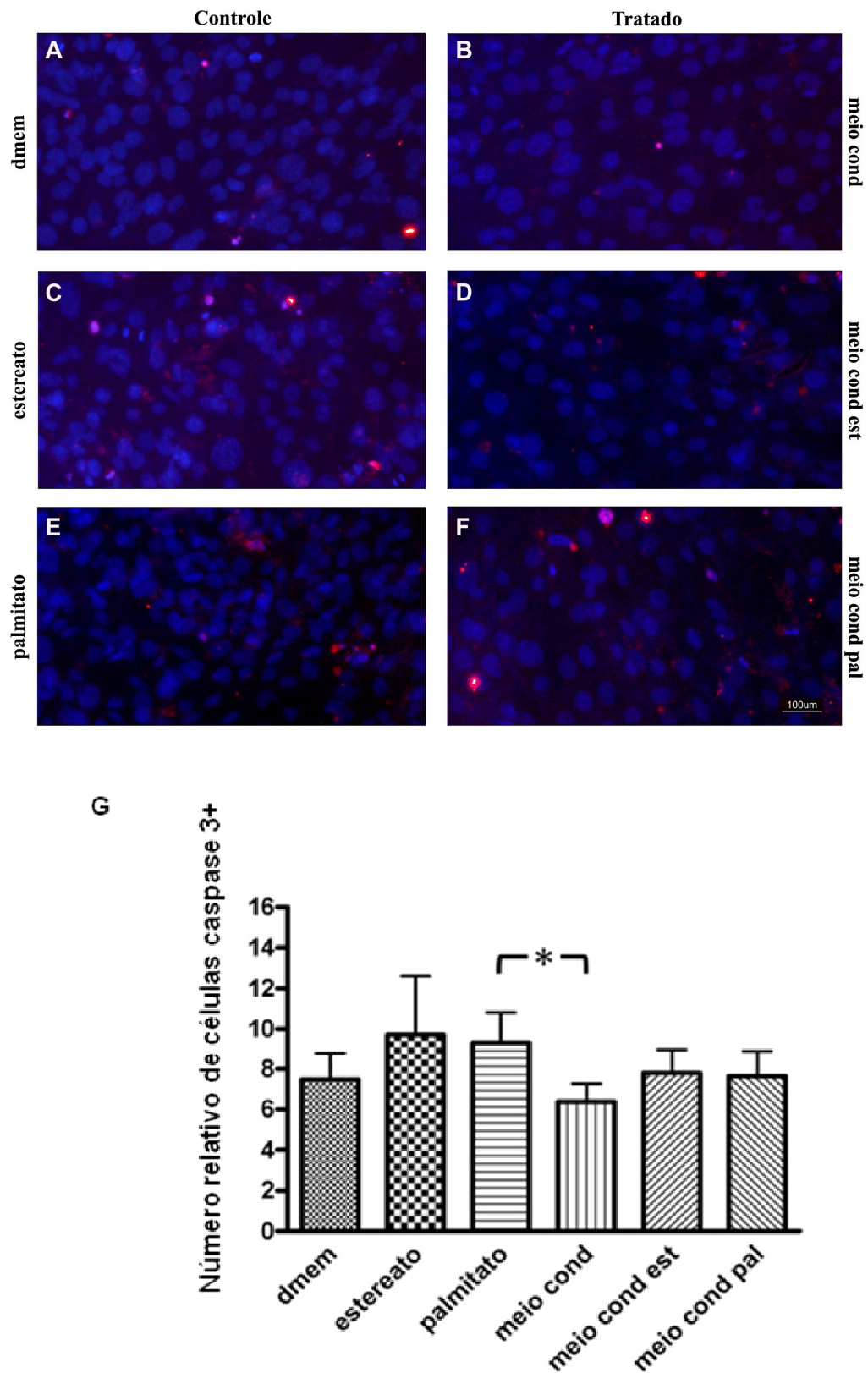


Figura 12: Cultura de CLU189 tratadas com ácido graxos de cadeia longa por 6 dias e, marcadas com DAPI (azul) e caspase3 (vermelho). As imagens A, C e E são culturas controles tratadas diretamente com o ácido graxo de cadeia longa. E, as imagens B, D e F são culturas tratadas com o meio condicionado obtido de cultura tratadas de astrócitos. O gráfico G, mostra a quantificação dos pontos de marcação anti-caspase3 em cada condição experimental. Escala = 100µm. Teste U de Mann Whitney. p [*] p<0,05.

CLU189			
Condição Experimental	Caspase		Ki-67
	3 dias	6 dias	6 dias
Dmem	7,38 ± 1,28	7,48 ± 1,25	30,36 ± 3,16 *
Dmem+estereato 200µM	11,89 ± 1,63 *	11,88 ± 4,19	12,36 ± 4,89 *
Dmem+palmitato 200µM	13,68 ± 5,85	9,33 ± 1,43 *	17,17 ± 1,38 *
Dmem condicionado em astrócito	5,81 ± 0,75 *	6,37 ± 0,85 *	22,99 ± 1,71 *
Dmem condicionado em astrócito estereato	8,53 ± 2,09	7,80 ± 1,13	21,10 ± 1,38 *
Dmem condicionado em astrócito palmitato	6,22 ± 1,75 *	7,63 ± 1,14	19,25 ± 6,50 *

Tabela 6: Número de células caspase e Ki-67 positivas após tratamento com estereato em astrócitos hipotalâmicos. Teste ANOVA 1 critério com pós-teste *t* de student. p [*] p<0,05.

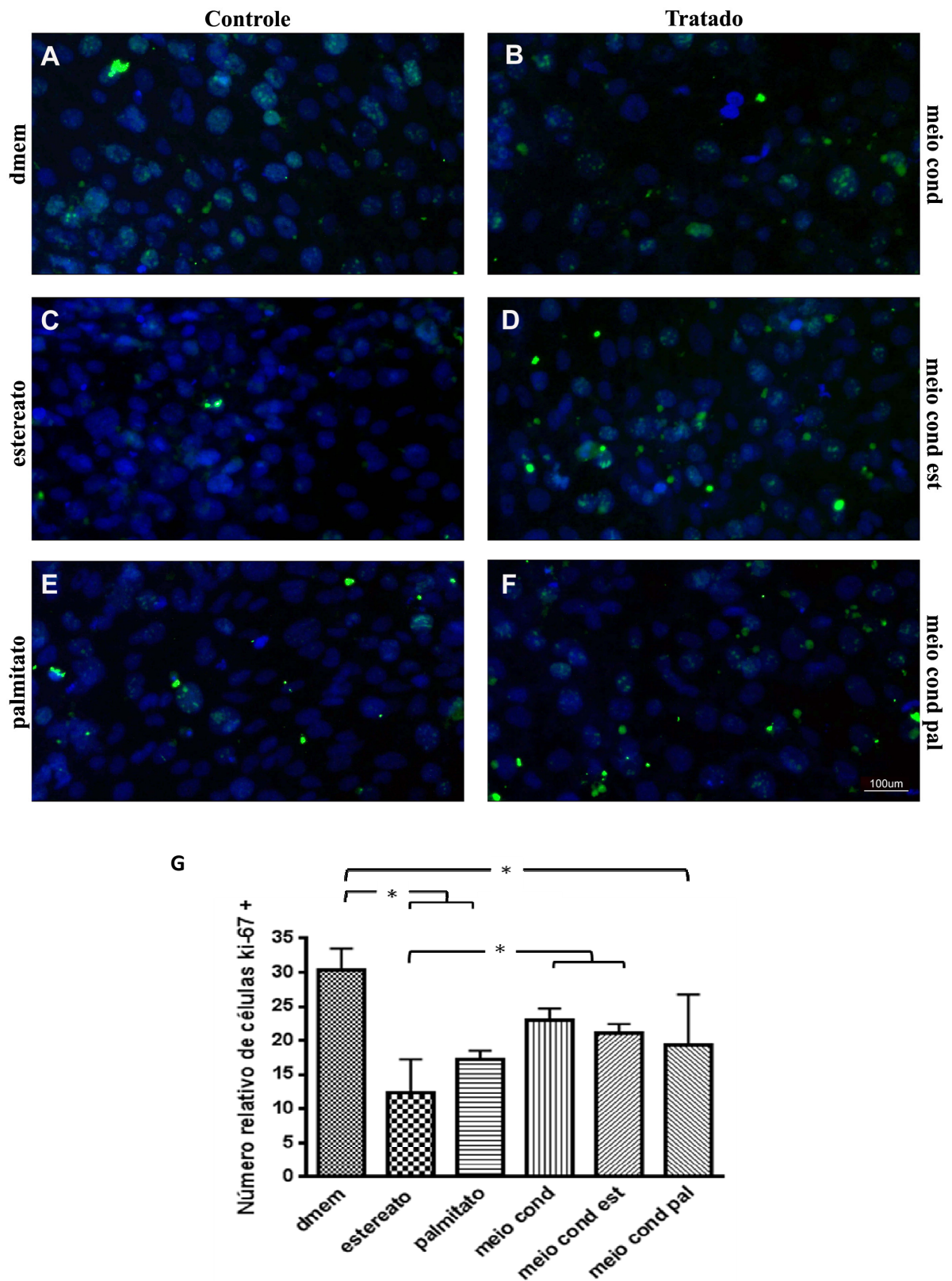


Figura 13: Cultura de CLU189 tratadas com ácidos graxos de cadeia longa por 6 dias e, marcadas com DAPI (azul) e ki-67 (verde). As imagens A, C e E são culturas controles tratadas diretamente com o ácido graxo de cadeia longa. E, as imagens B, D e F são culturas tratadas com o meio condicionado obtido de cultura tratadas de astrócitos. O gráfico G, mostra a quantificação dos pontos de marcação anti-ki-67 em cada condição experimental. Escala = 100µm. Teste ANOVA 1 critério com pós-teste de Bonferroni. p [*] p<0,05.

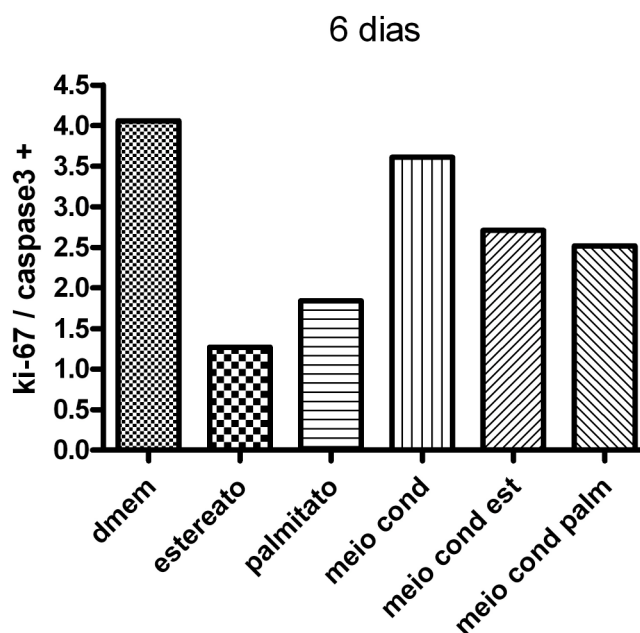


Figura 14: Relação do número de células ki-67 positivas pelo número de células caspase 3 positivas após 6 dias de tratamento. As barras das culturas tratadas com meio condicionado mostra a maior tendência de multiplicação celular do que morte por apoptose comparativamente com as culturas tratadas diretamente com estereato e palmitato.

5.5 O meio condicionado não consegue promover a neuroproteção quando administrado juntamente com AG

Tendo em vista os nossos resultados com meio condicionado que indicaram um possível papel neuroprotetor desse meio retirado dos astrócitos sobre as células CLU189 decidimos testar dois grupos adicionais com 6 dias de tratamento (Figura 15). Estes grupos foram tratados simultaneamente com o meio condicionado em astrócito controle + AG diretamente, estereato ou palmitato. O resultado observado foi que o meio condicionado não conseguiu proteger a cultura quando a este foi adicionado AG em relação à quantidade de células apoptóticas (Figura 16), apesar de mostrar uma pequena vantagem numérica em relação à taxa de multiplicação celular indicada pela quantidade de células ki-67 positivas (Figura 17). Durante o período do experimento verificamos, ao acompanhar o comportamento da cultura, a mudança muito rápida de cor do meio de cultura para um tom amarelado indicando a acidificação do meio de cultura celular. Diante desse ambiente não ideal para a multiplicação e sobrevivência das células não conseguimos estudar o que havíamos proposto. Acreditamos que a rápida redução do pH do meio ocorreu devido ao meio condicionado já ser levemente mais ácido em relação a um meio de cultura “fresco”, isso por causa do seu

conteúdo de metabólitos celulares astrocitários. Adicionado a isso, ainda houve a acidificação decorrente dos próprios ácidos graxos colocados em contato com os neurônios. Sendo assim, não podemos dizer que não houve a neuroproteção observada nos experimentos anteriores porque provavelmente tivemos morte celular induzida pela acidificação do meio de cultura desses dois grupos adicionais.

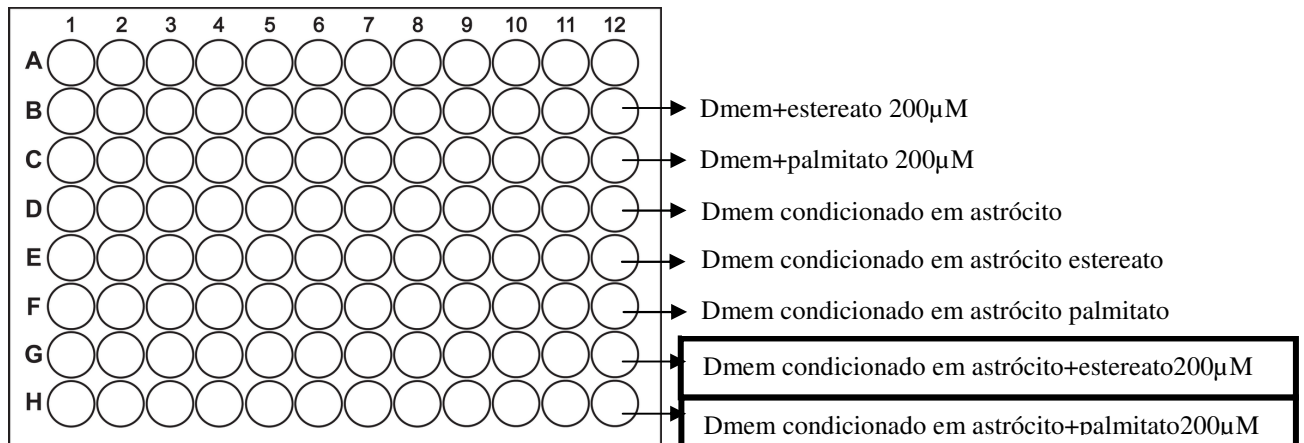


Figura 15: Representação esquemática da placa de 96 poços com os grupos de cultura de CLU189 tratadas com diferentes condições experimentais por 6 dias. Destacados em retângulos pretos os 2 grupos adicionais.

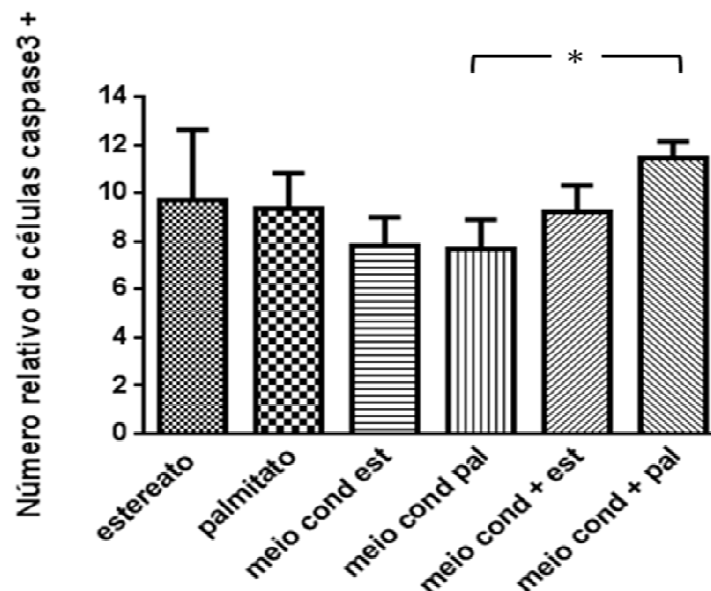


Figura 16: Gráfico que representa a taxa de morte celular pela quantificação de caspase3+ nos diferentes grupos experimentais em culturas após 6 dias de tratamento. Note que grupos adicionais representadas pelas últimas barras não tiveram diferença dos grupos com ácidos graxo em contato direto nas CLU189. p [*] p<0,05.

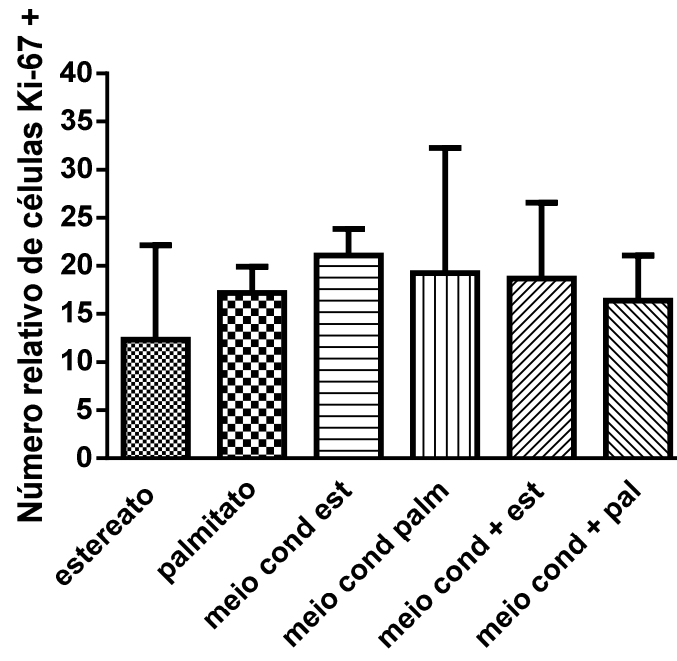


Figura 17: Taxa de multiplicação celular pela quantificação de ki-67+ nos diferentes grupos experimentais em culturas após 6 dias de tratamento. Note que as culturas tratadas com meio condicionado em astrócito + ácidos graxos apresentou uma tendência de maior taxa de proliferação celular em relação às culturas tratadas diretamente com AG.

6. DISCUSSÃO

A íntima relação dos astrócitos com as sinapses e neurônios é bem conhecida (Ullian, 2004). Sua capacidade de modulação da transmissão nervosa, até mesmo, a amplificação desses sinais, o controle da homeostase e sua habilidade de comunicação através da alteração dos níveis de cálcio intracelular e da liberação de gliotransmissores, tudo isso, nos leva a considerar a participação dessas células em processos ou controles nervosos vistos até então como exclusivamente de responsabilidade de neurônios (García-Cáceres, 2013). Frente a todo esse novo conhecimento sobre os astrócitos, alguns trabalhos vem investigando seu envolvimento com o controle do metabolismo energético, que por sua vez abrange o controle da fome, saciedade e da termogênese. Os circuitos nervosos que atuam nesse controle metabólico se localizam no hipotálamo, exatamente, nos núcleos: arqueado, paraventricular e lateral (Schwartz *et al.*, 2000; Velloso, 2009).

Em animais, os estudos apontam que a alimentação hiperlipídica é um componente importante na etiologia da obesidade, já que dietas hiperlipídicas comprovadamente levam ao excesso de gordura corporal (Lima *et al.*, 2007). Uma série de estudos recentes tem fornecido uma base sólida para a hipótese de que na obesidade induzida por dieta, o hipotálamo é alvo de um processo inflamatório que leva a uma regulação deficiente da homeostase energética (Velloso, 2009).

Tendo em vista que o principal componente da glia do SNC são os astrócitos e suas variadas funções, estas células foram o principal alvo de nosso estudo. Como vimos, os astrócitos são células morfologicamente complexas e suas características dependem da área do SNC a que pertencem (Freeman, 2010). Contribuindo com essa afirmação vimos no item revisão bibliográfica desse trabalho as particularidades metabólicas e na expressão de receptores envolvidos com os hormônios reguladores da fome/saciedade presentes em astrócitos da região hipotalâmica. Nesse sentido, em nossos resultados, que também confirmam a especificidade dos astrócitos, ficou bastante claro que os astrócitos hipotalâmicos responderam de forma diferente do mesmo tipo celular extraído do córtex cerebral de roedores neonatos (Figuras 4, 5, 6, 7 e 8).

Nossos resultados também indicaram um aumento da expressão de NFκB, fator que regula a expressão de genes essenciais ao processo inflamatório, após tratamento com estereato sobre astrócitos hipotalâmicos. Indicando a possível participação dessas células em vias inflamatórias ativadas por receptor do tipo *Toll* (TLR-4) e, possivelmente, também envolvidas no processo de apoptose e expressão de citocinas pro-inflamatórias que também tem relação com o aumento da expressão de NFκB (Milanski *et al.*, 2009; Guo *et al.*, 2011).

A via de sinalização NF κ B pode ser desencadeada pela citocina TNF- α (Park, 2010). O TNF- α é uma molécula pró-inflamatória potente sintetizada no SNC pelos astrócitos, microglia e neurônios (Park, 2010). Apesar de todo astrócito ser capaz de sintetizar TNF- α , de acordo com os nossos resultados, os astrócitos hipotalâmicos tratados com ácido graxo responderam de forma mais intensa com a produção de TNF ao tratamento quando comparados com astrócitos corticais e quando comparados às culturas tratadas somente com DMEM. Corroborando com Freeman (2010) que diz que as características dos astrócitos são dependentes da área do SNC a que pertencem.

Nossos primeiros resultados nos sugeriram que os astrócitos hipotalâmicos ao se tornarem reativos frente aos altos níveis de ácidos graxos e intensificarem a expressão de NF κ B e a produção de TNF- α possivelmente contribuiriam com o desenvolvimento/manutenção do processo inflamatório, como mostrado em outro trabalho publicado por Gupta *et al.* (2012). Porém, os dados obtidos a partir do tratamento dos neurônios com meio condicionado em astrócitos tratados e não tratados com ácidos graxos contraria nossa primeira ideia, mostrando um possível papel neuroprotetor do meio condicionado nos astrócitos em contato com AGs (Figura 10 e 11).

Os astrócitos quando reativos promovem uma hiperprodução de citocinas e quimiocinas (Dong e Benveniste, 2001; Piehl e Lidman, 2001; Nakagawa *et al.*, 2005). Nesse contexto, foi o que verificamos para os astrócitos hipotalâmicos submetidos ao tratamento com AG, o meio retirado dessas células para análise mostrou um aumento significativo de TNF- α (Figura 8).

Ao realizar o tratamento das culturas CLU189 com o meio condicionado era esperado que este meio promovesse uma taxa de apoptose maior do que os controles, devido à alta concentração de TNF- α no meio, já que essa citocina se correlaciona com morte celular e neurodegeneração (Chao *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 2002; Bermel e Rudick, 2007). Porém, ao observamos os resultados obtidos, o meio condicionado induziu taxa de morte celular semelhante em relação às culturas controles com nível de TNF reduzidos (Figura 10 e 11).

Uma possível explicação para esta ocorrência é de que o TNF- α é responsável por regular processos fisiológicos diferentes no SNC e, ao se ligar em receptores presentes nas células-alvo, desencadeia cascatas de sinalização que controlam inúmeros processos celulares como viabilidade celular, desenvolvimento neuronal, expressão gênica, homeostasia iônica e integridade sináptica (Park, 2010). A transdução de sinal gerada pelo TNF- α é dependente do tipo de receptor que estará sendo por ele estimulado, que pode ser o TNF-RI ou TNF-RII. O TNF-RI é expresso no SNC expressando genes importantes para processos biológicos

diversos como crescimento celular, morte celular e inflamação e o TNF-RII é expresso principalmente na glia e células endoteliais ativando vias de transdução de sinais pro-inflamatórias e anti-apoptótica (Santello, 2012).

Camara *et al.* (2013) verificaram que animais knockout para TNF- α apresentam significativa redução do nível de NGF (fator de crescimento de nervo) no córtex pré-frontal e hipocampo, e ainda, em animais knockout para o receptor TNF-RII, os autores observaram redução dos níveis de NGF e BDNF (fator de crescimento derivado do cérebro).

Por outro lado, podemos sugerir que o efeito esperado pelo aumento do TNF pode ter sido suprimido ou reduzido, de alguma forma, pela presença de outras substâncias no meio condicionado em astrócitos tratados com AGs. Dentro disso, a resposta mais intensa de astrogliose induzida pelo tratamento de AG (Figura 5 e 6) pode ter levado à constituição de um meio com características neuroprotetoras e não pró-apoptóticas como era esperado. Colaborando com essa sugestão sabemos que na astrogliose ocorre secreção de diversos fatores (Santello, 2012), dentre eles fatores estão a metaloproteinase de matriz do tipo 3 (MMP-3), o colesterol, o próprio TNF- α , trombospondina e fator de crescimento β (TGF- β) que inicialmente são responsáveis por ações negativas, porém, tardiamente, promovem a neuroplasticidade e estabilidade sináptica (Laird, 2008).

Outros fatores produzidos na astrogliose são conhecidos como fatores neurotróficos que são proteínas sinalizadoras endógenas que promovem sobrevivência e estimulam populações específicas de neurônios. Eles podem ser classificados em três grupos: as neurotrofinas, os ligantes dos receptores GDNF (fator neurotrófico derivado da glia) e as citocinas neuropoiéticas (Ekestern, 2004). Em nosso trabalho não dosamos nenhum tipo de fator neurotrófico, mas eles podem ser uma das explicações da neuroproteção observada em nossos resultados. Diante dessa hipótese trazemos um breve comentário sobre os efeitos dessas substâncias.

O fator neurotrófico ciliar (CNTF), por exemplo, pode reduzir consideravelmente a perda neuronal após axotomia periférica em animais neonatos e, além disso, aumenta em 60% a sobrevivência de neurônios em cultura (Sendtner *et al.*, 1991). O GDNF, por sua vez, é produzido *in vivo* e em cultura de astrócitos e também apresenta importantes efeitos neuroprotetores, diminuindo a morte celular programada, a degeneração após axotomia do nervo facial em animais adultos e neonatos em até 80% (Bohn, 2004), e tem importante função no tratamento da doença de Parkinson, resgatando a função motora e protegendo os neurônios dopaminérgicos (Peterson e Nutt, 2008). Evidências demonstram que as neurotrofinas, principalmente o BDNF e a neurotrofina-3 (NT-3), promovem brotamento e

elongação axonal após lesão nervosa periférica e durante o desenvolvimento (Mendell *et al.*, 2001). Além desses, diversas moléculas e substâncias atuam protegendo as células nervosas e contribuindo com o processo regenerativo tecidual, como as proteínas de choque térmico (Kalmar *et al.*, 2002) e o fator de crescimento endotelial vascular (Zachary, 2005).

Outra forma de avaliarmos a eficácia do meio condicionado em fornecer neuroproteção aos neurônios em cultura foi acrescentando aos experimentos dois novos grupos: meio condicionado em astrócito controle + AG diretamente, estereato ou palmitato (Figura 16 e 17). O objetivo destes grupos era de avaliar se os fatores produzidos pelos astrócitos que não receberam tratamento eram capazes de promover proteção aos neurônios quando estes foram tratados com ácido graxo. No entanto, quando avaliamos estas culturas, o meio condicionado não foi capaz de promover nenhuma diferença de resposta em relação às culturas de CLU189 tratadas diretamente com AGs, mostrando, portanto, um número de células apoptóticas mais elevado em relação às culturas tratadas com meio condicionado. Essa resposta foi observada, provavelmente, devido a drástica redução do pH do meio, deixando o meio ácido, gerando um ambiente tóxico às células.

Nossos experimentos com CLU189 em que adicionamos diretamente ácidos graxos às culturas mostraram através dos resultados obtidos maior proliferação celular nos 3 primeiros dias de tratamento juntamente com uma maior taxa de apoptose, o que acabou fazendo com que essas culturas apresentassem a maior queda de número de células no sexto dia de tratamento. Esse conjunto de alterações sugere que os neurônios, sem qualquer intermediação de outro tipo celular, responderam ao contato com AGs, o que pode ser decorrente da expressão de receptores *Toll-like 4* pelos próprios neurônios, significando que essas células não são passivas no processo de neuroinflamação decorrente de alto teor de gordura no hipotálamo durante a obesidade, dessa forma, nossos resultados vão ao encontro dos achados de Zhang *et al.* (2013) que mostraram que neurônios hipocampais participam da inflamação via dependente de MyD88 mediada por TLR4.

Frente às respostas celulares analisadas nesse trabalho novas ideias de investigações nos impele na colocação de objetivos que buscam detalhar três diferentes aspectos: 1) a constituição de fatores de crescimento do meio condicionado em astrócitos estimulados por ácidos graxos; 2) o estudo da ação do TNF- α relacionada à sobrevivência neuronal e; 3) a via de resposta neuronal em contato direto com ácidos graxos. A continuidade da pesquisa nos levará à melhor compreensão tanto de nossos resultados atuais como do mecanismo de apoptose e interação neurônio-glia no hipotálamo na ingestão de dietas com alto teor de

gordura que culminam com a inflamação hipotalâmica e, consequente, com o descontrole do balanço fome/saciedade/gasto energético, causando a obesidade.

7. CONCLUSÃO

O tratamento com ácido graxo de cadeia longa, principalmente o estereato, promoveu maior reatividade, aumento da expressão de NF κ B e do nível de TNF- α em astrócitos do hipotálamo em relação aos corticais e aos controles mostrando a especificidade de resposta de astrócitos do hipotálamo, área que controla a homeostase energética.

O meio condicionado obtido de astrócitos tratados com ácidos graxos apresentou maior quantidade de TNF- α , porém, quando em contato com os neurônios não promoveu maior morte celular, ao contrário, demonstrou um efeito possivelmente neuroprotetor quando comparamos os efeitos desses meios condicionados com o meio condicionado controle.

Os ácidos graxos apresentaram ação direta, sem qualquer intermediação ou interação com outro tipo celular, sobre os neurônios CLU189 promovendo inicialmente aumento no número e proliferação celular seguido de apoptose. Demonstrando a susceptibilidade dessas células no processo inflamatório decorrente da ingestão de dietas hiperlipídicas.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

1. AHIMA, R.S. Digging deeper into obesity. *The J Clin Investigation*, v. 121, n. 6, p. 2076-2079, 2011.
2. ALDSKOGIUS, H.; LIU, L.; SVENSSON, M. Glial responses to synaptic damage and plasticity. *J Neurosci Res*, v. 58, n. 1, p. 33-41, 1999.
3. ARRUDA, A. P. *et al.* Hypothalamic inflammation and thermogenesis: the Brown adipose tissue connection. *J Bioenerg Biomembr*, v. 43, p. 53-58, 2011.
4. BADMAN, M.K., FLIER, J.S. The gut and energy balance: visceral allies in the obesity wars. *Science*, vol. 307, n.5717, pp.1909-14, 2005.
5. BERMEL, R.A., RUDICK, R.A. Interferon-beta treatment for multiple sclerosis. *Neurotherapeutics*, vol. 4, pp. 633-46, 2007.
6. BOHN, M. C. Motoneurons crave glial cell line-derived neurotrophic factor. In *Exp Neurol*, v. 190, p. 263-75, 2004.
7. BOUZIER-SORE, A.; PELLERIN, L. Unraveling the complex metabolic nature of astrocytes. *Frontiers in cellular neuroscience*, v. 7, p. 1-9, 2013.
8. CAMARA, M. L. *et al.* TNF- α and its receptors modulate complex behaviours and neurotrophins in transgenic mice. *Psychoneuroendocrinology*, v. 38, p. 3102—3114, 2013.
9. CARLOS ROBERTO DOUGLAS. *Tratado de fisiologia aplicada às ciências médicas*. Editora: Guanabara Koogan, 2006.
10. CHAO, C.C., HU, S., SHENG, W.S., BU, D., BUKRINSKY, M.I., PETERSON, P.K. Cytokine-stimulated astrocytes damage human neurons via a nitric oxide mechanism. *Glia*, vol. 16, pp. 276-84, 1996.
11. CHEN, J., COSTA, L.G., GUIZZETTI, M. Assessment of Cholesterol Homeostasis in Astrocytes and Neurons. *Methods Mol Biol*, vol.758, pp.403-14, 2011.
12. DE SOUZA, C.T.; *et al.* Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. *Endocrinology*, v. 146, n. 10, p. 4192-4199, 2005.
13. DONG, Y.; BENVENISTE, E.N. Immune function of astrocytes. *Glia*, v. 36, n. 6, p. 180-190, 2001.
14. EKESTERN, E. Neurotrophic factors and amyotrophic lateral sclerosis. *Neurodegener Dis*, v. 1, p. 88-100, 2004.
15. FREEMAN, M.R. Specification and morphogenesis of astrocytes. *Science*, v. 330, n. 6005, p. 774-778, 2010.
16. GARCÍA-CÁCERES, C. *et al.* Hypothalamic astrocytes in obesity. *Endocrinal Metab Clin N Am*, v. 42, p. 57-66, 2013.

17. GARCÍA-CÁCERES, C.; *et al.* Differential Acute and Chronic Effects of Leptin on Hypothalamic Astrocyte Morphology and Synaptic Protein Levels. *Endocrinology*, v. 152, n. 5, p. 1809-1818, 2011.
18. GUILLOD-MAXIMIN, E.; *et al.* Acute Intracarotid Glucose Injection Towards the Brain Induces Specific c-fos Activation in Hypothalamic Nuclei: Involvement of Astrocytes in Cerebral Glucose-Sensing in Rats. *Journal of Neuroendocrinology*, v. 16, n. 5, p. 464-471, 2004.
19. GUILLOD-MAXIMIN, E.; *et al.* Adiponectin Receptors are Expressed in Hypothalamus and Colocalized with Proopiomelanocortin and Neuropeptide Y in Rodent Arcuate Neurons. *J Endocrinol*, v. 200, n. 1, p. 93-105, 2009
20. GUO, Y.L.; SHEN, W.; DU, F. Effect of picoside II on expressions of TLR4 and NFkappaB in rats with cerebral ischemia reperfusion injury. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi*, v. 31, n. 1, p. 58-61, 2011.
21. GUPTA, S. *et al.* Saturated long chain fatty acids activate inflammatory signaling in astrocytes. *J Neurochem.*, v. 120, n. 6, p. 1060-1071, 2012.
22. HSUCHOU, H.; *et al.* Obesity Induces Functional Astrocytic Leptin Receptors in Hypothalamus. *Brain*, v. 132, n. 4, p. 889-902, 2009.
23. IBGE. Pesquisa de orçamentos familiares 2008-2009 : análise do consumo alimentar pessoal no Brasil / IBGE, Coordenação de Trabalho e Rendimento. Rio de Janeiro: *IBGE*, p.150, 2011.
24. KALMAR, B. *et al.* Upregulation of heat shock proteins rescues motoneurons from axotomy-induced cell death in neonatal rats. *Exp Neurol*, v. 176, p. 87-97, 2002.
25. KIM, I.J., BECK, H.N., LEIN, P.J., HIGGINS, D. Interferon gamma induces retrograde dendritic retraction and inhibits synapse formation. *J Neurosci*, vol. 22, pp. 4530-39, 2002.
26. KRAFT, A.D.; MCPHERSON, C.A.; HARRY, G.J. Heterogeneity of microglia and TNF signaling as determinants for neuronal death or survival. *Neurotoxicology*, v. 30, p. 785-793, 2009.
27. KURTZ, A., ZIMMER, A., SCHNÜTGEN, F., BRÜNING, G., SPENER, F., MÜLLER, T. The expression pattern of a novel gene encoding brain-fatty acid binding protein correlates with neuronal and glial cell development. *Development*, vol. 120, n.9, pp.2637-49, 1994.
28. LAIRD, M. D.; *et al.* Opposing roles for reactive astrocytes following traumatic brain injury. *Neurosignals*, v.16, p. 154-164, 2008.
29. LIMA, L.P.; SAMPAIO, H.A.C. Caracterização socioeconômica, antropométrica e alimentar de obesos graves. *Ciência & Saúde Coletiva*, v. 4, n. 12, p. 1011-1020, 2007.

30. MCCARTHY, K.D.; DEVELLIS, J. Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *J Cell Biol*, v. 85, p. 890-902, 1980.
31. MENDELL, L. M. *et al.* Neurotrophins and synaptic plasticity in the mammalian spinal cord. In *J Physiol*, v. 533, p. 91-7, 2001.
32. MILANSKI, M.; *et al.* Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity. *J Neurosci*, v. 29, n. 2, p. 359-370, 2009.
33. MORAES, J.C.; *et al.* High fat induces apoptosis of the hypothalamic neurons. *Plos one*, v. 4, n. 4, p. e5045, 2009.
34. MORENTIN, P.B.M., LÓPEZ, M. Mens Sana In Corpore Sano: Exercise and Hypothalamic ER Stress. *PLoS Biology*, vol. 8, n. 8, p. e1000464, 2010.
35. MORTON, G. J., SCHWARTZ, M. W. Leptin and the Central Nervous System Control of Glucose Metabolism. *Physiol Rev*, v.91, p. 389–411, 2011.
36. MUKHOPADHYAY, D.; MUKHERJEA, M. Role of Fatty Acid Binding Protein in the Modulation of Inhibitory Effect of Fatty Acids on Fatty Acid Synthase and ATP-Citrate Lyase in Developing Human Brain. *Indian J. Biochem Biophys*, v. 35, n. 5, p. 296-302, 1998.
37. MUNZBERG, H.; MYERS, M.G.; J.R. Molecular and anatomical determinants of central leptin resistance. *Nat Neurosci*, v. 8, n. 5, p. 566-570, 2005.
38. NAKAGAWA, T., YABE, T., SCHWARTZ, J. P. Gene expression profiles of reactive astrocytes cultured from dopamine-depleted striatum. *Neurobiol Dis*, vol. 20, pp. 275-82, 2005.
39. NGARMUKOS, C.; BAUR, E.L.; KUMAGAI, A.K. Co-localization of GLUT1 and GLUT4 in the blood–brain barrier of the rat ventromedial hypothalamus. *Brain Research*, v. 900, n.1, p. 1-8, 2001.
40. OGDEN, C.L.; *et al.* The epidemiology of obesity. *Gastroenterology*, v.132, n. 6, p. 2087-2102, 2007.
41. OMS, http://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/overweight/en/, 2008.
42. PAN, W.; *et al.* Astrocyte Leptin Receptor (ObR) and Leptin Transport in Adult-Onset Obese Mice. *Endocrinology*, v. 149, n. 6, p. 2798-2806, 2008.
43. PARK, K.M.; BOWERS, W.J. Tumor necrosis factor-alpha mediated signaling in neuronal homeostasis and dysfunction. *Cell signal*, v.22, n.7, p. 977-983, 2010.

44. PEKNY, M., WILHELMSSON, U., BOGESTAL, Y.R., PEKNA, M. The Role of Astrocytes and Complement System in Neural Plasticity. *Int Rev Neurobiol*, vol.82, pp.95-111, 2007.
45. PENKY, M. *et al.* The dual role of astrocytes and reactive gliosis. *Neuroscience letters*, ARTIGO IN PRESS.
46. PETERSON, A. L.; NUTT, J. G. Treatment of Parkinson's disease with trophic factors. *Neurotherapeutics*, v. 5, p. 270-80, 2008.
47. PIEHL, F. E LIDMAN, O. Neuroinflammation in the Rat--CNS Cells and Their Role in the Regulation of Immune Reactions. *Immunol Rev*, vol. 184, pp. 212-25, 2001.
48. RIBOTTA, M. G., MENET, V., PRIVAT, A. Glial Scar and Axonal Regeneration in the CNS: Lessons from GFAP and Vimentin Transgenic Mice. *Acta Neurochir Suppl*, vol. 89, pp. 87-92, 2004.
49. ROMANATTO, T. *et al.* Deletion of tumor necrosis factor-alpha receptor 1 (TNFR1) protects against diet-induced obesity by means of increased thermogenesis. *J Biol Chem*, v. 284, n. 52, p. 36213-36222, 2009.
50. ROMANATTO, T. *et al.* TNF-alpha acts in the hypothalamus inhibiting food intake and increasing the respiratory quotient—effects on leptin and insulin signaling pathways. *Peptides*, v. 28, n. 5, p. 1050-1058, 2007.
51. SANTELLO, M.; VOLTERRA, A. TNF- α in synaptic function: switching gears. *Trends in neuroscience*, v.35, n. 10, p. 638-647, 2012.
52. SCHWARTZ, M.W.; *et al.* Central Nervous System Control of Food Intake. *Nature*, v. 404, n. 6778, p.661-671, 2000.
53. SENDTNER, M. *et al.* Effect of ciliary neurotrophic factor (CNTF) on motoneuron survival. *J Cell Sci Suppl*, vol. 15, pp. 103-9, 1991.
54. SIEGEL, R.M., MUPPIDI, J., ROBERTS, M., PORTER, M., WU, Z. Death Receptor Signaling and Autoimmunity. *Immunol Res*, vol. 27, pp.499–512, 2003.
55. SOFRONIEW, M.V. Reactive astrocytes in neural repair and protection. *Neuroscientist*, vol. 11, pp. 400-7, 2005.
56. STEPHENSON, D.; *et al.* Transcription Factor Nuclear Factor-Kappa B Is Activated in Neurons After Focal Cerebral Ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, v. 20, p. 592-603, 2000.
57. STREIT, W.J.; KREUTZBERG, G.W. Response of endogenous glial cells to motor neuron degeneration induced by toxic ricin. *J Comp Neurol*, v. 268, n. 2, p. 248-263, 1988.
58. ULLIAN, E.M., SAPPERSTEIN, S.K., CHRISTOPHERSON, K.S., BARRES, B. A. Control of Synapse Number by Glia. *Science*, vol. 291, pp. 657-61, 2001.

59. ULLIAN, E.M.; *et al.* Role for glia in synaptogenesis. *Glia*, v.47, p. 209-216, 2004.
60. VELLOSO, A.L. The brain is the conductor: diet induction inflammation overlapping physiological control of body mass and metabolism. *Arq Bras Endocrinol Metab*, v. 53, n. 2, p. 151-158, 2009.
61. YANASE, H.; *et al.* Cellular localization of the diazepam binding inhibitor (DBI) in the gastrointestinal tract of mice and its coexistence with the fatty acid binding protein (FABP). *Arch Histol Cytol*, v. 64, p. 449-460, 2001.
62. YOUNG, J.K. Anatomical Relationship Between Specialized Astrocytes and Leptin-Sensitive Neurones. *J. Anat*, v. 201, n. 1, p. 85-90, 2002.
63. YOUNG, J.K. Immunoreactivity for diazepam binding inhibitor in Gomori-positive astrocytes. *Regulatory Peptides*, v. 50, p. 159-166, 1994.
64. YOUNG, J.K.; BAKER, J.H.; MULLER, T. Immunoreactivity for Brain-Fatty Acid Binding Protein in Gomoripositive Astrocytes. *Glia*, v. 16, n. 3, p. 218-26, 1996.
65. ZACHARY, I. Neuroprotective role of vascular endothelial growth factor: signalling mechanisms, biological function, and therapeutic potential. *Neurosignals*, v. 14, p. 207-21, 2005.
66. ZANON, R. G., OLIVEIRA, A. L. R. (2006). MHC I upregulation influences astroglial reaction and synaptic plasticity in the spinal cord after sciatic nerve transection. *Experimental Neurology*, v. 200, pp. 521-531.
67. ZHANG, G. X. *et al.* The role of TLR4-mediated MyD88-dependent pathway in neuroinflammation in hippocampal neurons of rats. *Chinese Journal of Applied Physiology*, v. 29, n. 1, p. 42-6, 2013.



Universidade Federal de Uberlândia

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)

Avenida João Naves de Ávila, nº. 2160 - Bloco J - Campus Santa Mônica -
Uberlândia-MG –

CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4131; e-mail: ceua@propp.ufu.br;

www.comissoes.propp.ufu.br

**ANÁLISE FINAL Nº 097/10 DO COMITÊ DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE
ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 040/10**

Projeto Pesquisa: "Influência da adição de ácidos graxos: astrogliose, sobrevivência neuronal e densidade sináptica."

Pesquisador Responsável: Renata Graciele Zanon

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

OBS: O CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEUA PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 23 de junho de 2010