

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

ARIADNE DE ALMEIDA BRANCO OLIVEIRA

**ESTUDO DAS RESPOSTAS DOS ASTRÓCITOS HIPOTALÂMICOS AO  
TRATAMENTO IN VITRO COM ÁCIDOS GRAXOS SATURADOS**

UBERLÂNDIA

2015

ARIADNE DE ALMEIDA BRANCO OLIVEIRA

**ESTUDO DAS RESPOSTAS DOS ASTRÓCITOS HIPOTALÂMICOS AO  
TRATAMENTO IN VITRO COM ÁCIDOS GRAXOS SATURADOS**

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

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

- O48c  
2015
- Oliveira, Ariadne de Almeida Branco, 1990-  
Estudo das respostas dos astrócitos hipotalâmicos ao tratamento in vitro com ácidos graxos saturados / Ariadne de Almeida Branco Oliveira. - 2015.  
80 f. : il.
- Orientadora: Renata Graciele Zanon.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas. Inclui bibliografia.
1. Citologia - Teses. 2. Astrócitos - Teses. 3. Cérebro - Teses. 4. Citocinas - Teses. I. Zanon, Renata Graciele. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas. III. Título.

## **AGRADECIMENTOS**

*Agradeço a Deus, por Seu amor e graça se fazerem presentes em todos os dias da minha vida.*

*A todos aqueles que me cercam de carinho e amor, que me sustentam nas dificuldades e me fazem querer ser cada dia melhor.*

*À minha orientadora Dra. Renata Zanon, pela oportunidade, paciência, dedicação e conhecimentos transmitidos.*

*Aos companheiros de laboratório, por toda a colaboração e auxílio prestados durante o desenvolvimento do trabalho.*

*A todos aqueles que nos auxiliaram e nos socorreram durante as inúmeras adversidades enfrentadas na fase experimental do trabalho.*

*Aos colaboradores externos, que muito acrescentaram e contribuíram com o trabalho abrindo as portas de seus laboratórios e dedicando parte de seu tempo para nos auxiliar em diversas etapas do trabalho.*

## RESUMO

Dietas ricas em gordura induzem a formação de sinais inflamatórios no hipotálamo que diminui sua capacidade de resposta aos hormônios leptina e insulina, envolvidos com o controle da saciedade e fome. O hipotálamo contém uma grande quantidade de células gliais destacando-se os astrócitos, que são incorporados em grupos heterogêneos de neurônios que participam do circuito de controle da homeostase energética, adicionalmente, estão envolvidos com vários processos, incluindo a neuroinflamação. Nesse sentido, o presente trabalho buscou estudar o papel dos astrócitos hipotalâmicos nas respostas frente ao excesso de ácidos graxos e a interação dessas células com neurônios também do hipotálamo. Para tanto, foram utilizadas culturas primárias de astrócitos hipotalâmicos e culturas primárias de neurônios hipotalâmicos. O meio removido de culturas de astrócitos tratados com ácido graxo (estereato ou palmitato) ou LPS (controle positivo) foi usado sobre culturas neuronais para posterior estudo da sinaptogênese *in vitro*, ainda, foi realizada a dosagem das citocinas presentes nesse meio condicionado com o kit CBA mouse-Th1/Th2/Th17 através de citometria de fluxo com o intuito de analisarmos o perfil de resposta inflamatória em função dos diferentes tratamentos. Com base nesse resultado, vimos que o tratamento com ácido graxo promoveu um perfil de resposta Th2 (anti-inflamatório), principalmente quando comparado ao controle LPS de perfil Th1 (pró-inflamatório). Após o tratamento, o RNA total dos astrócitos foi extraído para a realização do sequenciamento de transcritos por RNA-Seq. Através da análise dos genes diferencialmente expressos entre os grupos, observou-se que o tratamento com ácido graxo induziu uma resposta inflamatória, porém de menor intensidade em relação ao tratamento com LPS, e, ao mesmo tempo, alguns genes relacionados com neuroproteção também foram mais expressos por astrócitos tratados com ácido graxo, colaborando com os dados do CBA. A cultura de neurônio foi padronizada em nosso laboratório e, posteriormente, tratada com meio condicionado. Através de imunomarcagem, observou-se que o tratamento com o meio condicionado em astrócitos tratados com ácidos graxos reduziu a densidade sináptica total, atingindo, principalmente sinapses excitatórias, no entanto, o número de neurônios foi semelhante entre os tratamentos, porém, com a presença de um menor número de núcleos picnóticos com o tratamento de ácidos graxos. Estes resultados sugerem um papel ativo dos astrócitos frente à inflamação induzida pelo excesso de ácidos graxos participando da modulação da resposta inflamatória, aparentemente, com efeitos neuroprotetores.

**Palavras chave:** astrócitos, ácido graxo, hipotálamo.

## ABSTRACT

High-fat diets induce the formation of inflammatory signals in the hypothalamus which reduces their ability to respond to the hormones leptin and insulin, involved with the control of satiety and food intake. The hypothalamus contains a large amount of glial cells highlighting the astrocytes, which are incorporated in heterogeneous groups of neurons that participate in the control circuit of energy homeostasis, additionally, they are involved in various processes, including the neuroinflammation. In this sense, the present study aimed to investigate the role of hypothalamic astrocyte responses in front of excess fatty acids and the interaction of these cells with neurons of the hypothalamus. For that, we used primary cell cultures of hypothalamic astrocytes and primary cultures of hypothalamic neurons. The medium removed from astrocyte cultures treated with fatty acid (estereato or palmitate) or LPS (positive control) was used on neuronal cultures for further in vitro study of synaptogenesis, also, measurement of cytokines present in conditioned medium was performed with the CBA kit mouse-Th1 /Th2/Th17 by flow cytometry with the aim of analyzing the profile of inflammatory response considering the different treatments. In front of this result, we have seen that the treatment with fatty acid promoted a profile of Th2 response (anti-inflammatory), especially when compared to Th1 profile (pro-inflammatory) of the LPS control. After the treatment, the total RNA of astrocytes was extracted for the sequencing of transcripts by RNA-Seq. Through the analysis of the genes differentially expressed between the groups, it was observed that treatment with fatty acid induced an inflammatory response, however, with lesser intensity in relation to treatment with LPS, and, at the same time, some genes related to neuroprotection were more expressed in astrocytes treated with fatty acid, collaborating with the data of the CBA. The culture of neuron was standardized in our laboratory and, subsequently, treated with conditioned medium. By immunostaining, we observed that treatment with the conditioned medium in astrocytes treated with fatty acids reduced the total synaptic density, primarily affecting excitatory synapses, on the other hand, the number of neurons was similar between treatments, however, with the presence of a reduced number of pyknotic nuclei after the treatment with fatty acids. These results suggest an active role of astrocyte in inflammation induced by the excess of fatty acids, participating in the modulation of the inflammatory response, apparently, with neuroprotective effects.

**Key words:** astrocytes, fatty acid, hypothalamus.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Regulação funcional de neurônios hipotalâmicos do núcleo arqueado (ARC) responsivos à leptina e à insulina.....	13
Figura 2 – Modulação da inflamação hipotalâmica via receptor TLR4..	15
Figura 3 – Contribuições para a inflamação hipotalâmica.....	16
Figura 4 – Técnica TUNEL para identificação de apoptose, realizada em cortes de hipotálamo de animais controle. ....	17
Figura 5 – As diversas populações celulares no microambiente local do hipotálamo mediobasal.....	19
Figura 6 – Imunomarcção anti-GFAP e anti-NFκB após 5 dias de tratamento com estereato sobre astrócitos hipotalâmicos.....	20
Figura 7 – Imunomarcção anti-GFAP e anti-NFκB após 5 dias de tratamento com palmitato sobre astrócitos hipotalâmicos.....	21
Figura 8 - Ilustração da localização do hipotálamo no SNC.....	29
Figura 9 - Avaliação da qualidade do RNA total de astrócitos. ....	33
Figura 10 - Validação da biblioteca. Padrão Ladder 50pb.....	35
Figura 11 – Fotomicrografia mostrando cultura de neurônios hipotalâmicos extraída de embriões E12 (A) e E16 (B) após uma semana de cultivo. ....	38
Figura 12 – Culturas primárias de neurônios hipotalâmicos tratadas com meio condicionado. ....	40
Figura 13 – Culturas primárias de neurônios hipotalâmicos tratadas com meio condicionado..	41
Figura 14 – Imunofluorescência anti-βtubIII e citoquímica. ....	42
Figura 15 – Análise do meio condicionado.....	44
Figura 16 - – Diagrama de extremos e quartis. ....	47
Figura 17 – Diagrama de comparação entre as diferentes amostras.....	48

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Anticorpos primários utilizados. ....	30
Tabela 2 – Quantidade total de RNA. ....	32
Tabela 3 – Concentração obtida de mRNA das amostras. ....	34
Tabela 4 – Quantificação de cDNA. ....	34
Tabela 5 – Dados gerados na plataforma Ion Proton™ System. ....	35
Tabela 6 – <i>Reads</i> sequenciadas na plataforma <i>Ion Proton™ System</i> após tratamento de qualidade. ....	47
Tabela 7 – Genes diferencialmente expressos. ....	49
Tabela 8 – Genes agrupados de acordo com os principais processos biológicos ao quais participam da regulação. ....	52



## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

AFAP1 – do inglês (Actin Filament Associated Protein 1)

AG – Ácido Graxo

AgRP – Proteína Relacionada ao Agouti

AMP – Adenosina Monofosfato

AMPK – Proteína Quinase Adenosina Monofosfato

ARC – Núcleo Arqueado

ATP – Adenosina Trifosfato

BDNF – Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro

BSA – Soro de Albumina Bovina

CAB39 – do inglês (CALCIUM-BINDING PROTEIN 39)

CART – Transcrito regulado por cocaína e anfetamina

CBA – do inglês (Cytometric Bead Array)

CBEA/UFU – Centro de Bioterismo de Experimentação Animal da Universidade Federal de Uberlândia

CCK – Colocistoquinina

CI – Complexo I

CNTF – Fator Neurotrófico Ciliar

COL4A1 – do inglês (Collagen, Type IV, Alpha 1)

COL4A5 – do inglês (Collagen, Type IV, Alpha 5)

CRH – Hormônio Liberador de Corticotrofina

CSF – Fluido Cérebrospinal

CTRL – Controle

CYP26B1 – do inglês (Cytochrome P450, Family 26, Subfamily B, Polypeptide 1)

DAPI – 4'6'-diamidino-2fenil-indol

DMEM – do inglês (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)

ELISA – Ensaio Imunoenzimático

FAM168b – do inglês (Family With Sequence Similarity 168, Member b)

FGF – Fator de Crescimento Fibroblástico

FPKM – do inglês (Fragments Per Kilobase Of Exon Per Million Fragments Mapped)

F2R – (Coagulation Factor II (Thrombin) Receptor)

GABA – Ácido Gama-Aminobutírico

GDNF – do inglês (Glial Cell-line Derived Neurotrophic Factor)

GFAP – Proteína Ácida Fibrilar Glial  
GIP – Peptídeo Insulinotrópico Glicose Dependente  
GLP-1 – Peptídeo Análogo ao Glucagon  
GSH – Glutathione  
HSPA8 – do inglês (Heat Shock 70kda Protein 8)  
HSP70 – Proteína de Choque Térmico 70  
IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística  
IFN- $\gamma$  – Interferon Gama  
IHME – do inglês (Institute for Health Metrics and Evaluation)  
IKK $\beta$  – Inibidor do Fator Nuclear Kappa B  
IL – Interleucina  
IMC – Índice de Massa Corporal  
JNK – do inglês (c-Jun N-terminal protein Kinases)  
LH – Hipotálamo Lateral  
LKB1 – do inglês (Liver kinase B1)  
LPS – Lipopolissacáride  
MBH – Hipotálamo Médio Basal  
MCH – Hormônio Concentrador de Melanina  
ME – Eminência Mediana  
NADH – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo  
NDUFA7 – do inglês (NADH Dehydrogenase Ubiquinone 1 Alpha Subcomplex, 7)  
NF $\kappa$ B – do inglês (Fator Nuclear Kappa B)  
NGF – Fator de Crescimento Neural  
NPY – Neuropeptídeo Y  
NT3 – Neurotrofina3  
OMS – Organização Mundial de Saúde  
PBS – Tampão Fosfato Salino  
PCR – Reação Polimerase em Cadeia  
POMC – Proopiomelanocortina  
PSD-95 – Proteína 95 de Densidade Pos-sináptica  
PTP1B – Proteína Tirosina Fosfatase 1B  
PVN – Núcleo Paraventricular  
RGMA – do inglês (Repulsive Guidance Molecule A)  
ROS – Espécies Reativas de Oxigênio

Slc7a11 – do inglês (Solute carrier family 7, anionic amino acid transporter light chain, Xc, member 11)

SNC – Sistema Nervoso Central

SNP – Sistema Nervoso Periférico

SOCS3 – Supressor de Sinalização de Citocinas

STAT-3 – Fator de Transcrição 3

TGF- $\beta$  - Fator de Transformação do Crescimento beta

TLR4 – do inglês (Toll Like Receptor 4)

TNF- $\alpha$  – Fator de Necrose Tumoral alfa

TRH – Hormônio Liberador de Tireotrofina

TSP-1 – Trombospondina 1

UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro

VGAT – Anti-Vesicular GABA Transporter

Xc(-) – Transportador cistina-glutamato

## Sumário

1. INTRODUÇÃO .....	10
1.1 Sistema Nervoso Central e o controle do balanço energético .....	12
1.2 Processo inflamatório hipotalâmico frente à dieta hiperlipídica .....	13
1.3 Participação dos astrócitos no processo inflamatório e apoptose.....	17
1.4 Astrócitos, produção de citocinas e fatores de crescimento.....	22
2. OBJETIVO .....	25
2.1 Objetivo geral:.....	26
2.2 Objetivos específicos:.....	26
3. MATERIAL E MÉTODO .....	27
3.1 Animais .....	28
3.2 Cultura primária de astrócitos .....	28
3.3 Cultura primária de neurônios hipotalâmicos .....	28
3.4 Tratamento com ácidos graxos saturados e LPS .....	29
3.5 Tratamento das Culturas neuronais .....	30
3.6 Imunocitoquímica .....	30
3.7 Determinação de citocinas por citometria de fluxo .....	31
3.8 Sequenciamento de transcritos por RNA-Seq.....	32
3.8.1. Extração de RNA total .....	32
3.8.2. Construção de bibliotecas .....	33
3.8.3. Sequenciamento.....	35
3.8.4. Análises de Bioinformática .....	36
4. RESULTADOS.....	37
4.1 Padronização da cultura primária de neurônios hipotalâmicos.....	38
4.2 Culturas primárias de neurônios hipotalâmicos tratadas com meio condicionado....	39

4.3	Variação da produção de citocinas frente aos diferentes tratamentos .....	43
4.4	Sequenciamento de transcriptoma por RNA-Seq.....	45
4.4.1	Tratamento de qualidade das <i>reads</i> geradas.....	45
4.4.2	Montagem do transcriptoma e análise de expressão diferencial .....	48
5.	DISCUSSÃO .....	53
6.	CONCLUSÕES .....	62
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	64
8.	ANEXO .....	76

## **1. INTRODUÇÃO**

A obesidade é um dos maiores desafios de saúde pública do século XXI. Sua prevalência triplicou em muitos países da Organização Mundial da Saúde (OMS) desde a década de 1980, e o número de pessoas afetadas continuam a aumentar num ritmo alarmante, especialmente entre crianças. No mundo todo, há 2,1 bilhões de pessoas acima do peso, um salto em relação a 1980, quando o número chegava a 875 milhões (IHME, 2015). Segundo a OMS, entre 1980 e 2013, a proporção de adultos obesos no mundo subiu de 28,8% para 36,9% entre os homens e de 29,8% para 38,0% entre as mulheres. No Brasil, de acordo com levantamento realizado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o índice de pessoas com excesso de peso beira os 60%, ou seja, cerca de 82 milhões de adultos apresentam o índice de massa corporal (IMC) igual ou maior que  $25 \text{ kg/m}^2$  (sobrepeso). A obesidade, caracterizada por IMC igual ou superior  $30 \text{ kg/m}^2$ , foi diagnosticada em quase um terço do total de homens com excesso de peso e mais de um terço no caso das mulheres com excesso de peso (Pesquisa Nacional de Saúde, IBGE, 2013).

Além de causar várias dificuldades físicas e problemas psicológicos, o excesso de peso aumenta drasticamente o risco para o surgimento de uma série de doenças não transmissíveis, incluindo doenças cardiovasculares, câncer e diabetes. A epidemia da obesidade está ligada ao aumento da oferta de alimentos energéticos, com muitas calorias e gorduras (OMS, 2015). O IBGE analisou, em 2008 e 2009, o consumo alimentar pessoal no Brasil e mostrou excessivo consumo de açúcar por 61% da população e excessivo consumo de gordura saturada para 82% da população. As dietas ricas em gorduras são a principal causa de obesidade. 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).

O excesso de lipídios na dieta causa um processo inflamatório sistêmico (Visser *et al.*, 1999; Vgontzas *et al.*, 2000) com consequências importantes, principalmente, quando alcançam o centro controlador da fome e da saciedade localizado no Sistema Nervoso Central (SNC), o hipotálamo, causando inflamação e morte de neurônios responsáveis por secretar neuropeptídeos que promovem a sensação de saciedade (Moraes *et al.*, 2009). 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.

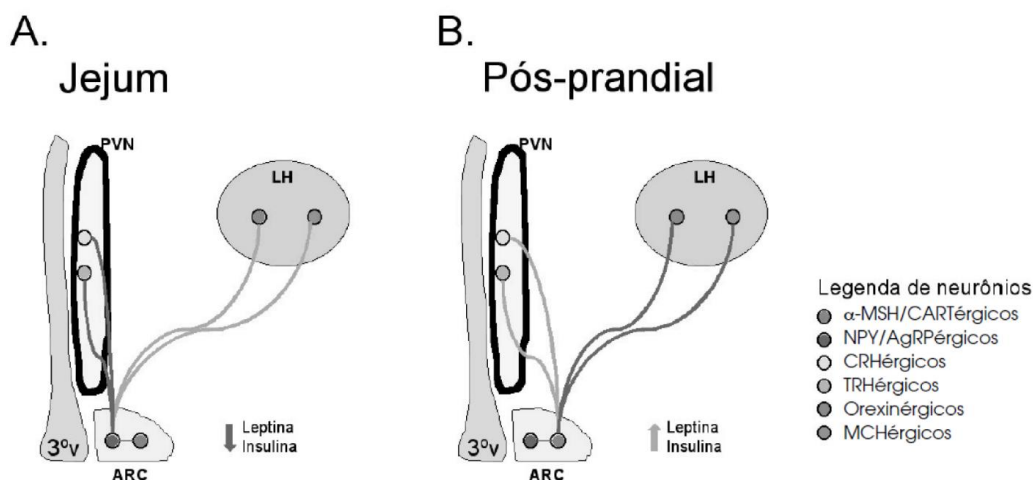
### **1.1 Sistema Nervoso Central e o controle do balanço energético**

O acoplamento entre o *status* energético corporal com os mecanismos que regulam fome, saciedade e termogênese é mantido por uma região específica do SNC, o hipotálamo. Neurônios hipotalâmicos especializados conectam essas informações através da sinalização central de leptina e insulina, dois dos principais hormônios reguladores da homeostase energética corporal (Figura 1).

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, controla o balanço entre fome e saciedade, e, pró- e anti-termogênese (Schwartz *et al.*, 2000; Velloso, 2009). Os neurônios de primeira ordem são capazes de detectar mudanças séricas súbitas ou crônicas de leptina e insulina e, como resposta, uma população de células expressa peptídeos estimuladores da fome (neuropeptídeo Y, NPY, e, proteína relacionada ao agouti, AgRP) e, por isso, denominados neurônios orexigênicos; enquanto, uma segunda população de células expressa peptídeos inibidores da fome (hormônio estimulador de melanócito alfa,  $\alpha$ -MSH, que é clivado a partir de proopiomelanocortina, POMC, e, transcrito regulado por cocaína e anfetamina, CART), denominados neurônios anorexigênicos. Os neurônios de segunda ordem do hipotálamo lateral sintetizam predominantemente a orexina e outro neuropeptídeo predominantemente anti-termogênico (hormônio concentrador de melanina, MCH), enquanto os neurônios do núcleo paraventricular produzem neuropeptídeos anorexigênicos (hormônio liberador de tireotrofina, TRH) e pró-termogênico (hormônio liberador de corticotrofina, CRH) (Schwartz *et al.*, 2000 Velloso, 2009).

Durante o jejum, predomina a sinalização que induz a fome, com expressão de NPY e AgRP e inibição da produção de POMC/MSH 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 outras substâncias como o hormônio intestinal colecistoquinina (CCK), peptídeo análogo ao glucagon (GLP-1) e peptídeo insulínico glicose-dependente (GIP) (Badman e Flier, 2005).





**Figura 1** – Regulação funcional de neurônios hipotálamicos do núcleo arqueado (ARC) responsivos à leptina e à insulina. A- Durante o jejum, baixos níveis de leptina e insulina levam à redução da produção de MSH e CART e ao aumento da produção de NPY e AgRP no ARC. Os neurônios NPY/AgRPérgicos inibem a produção de CRH e TRH no núcleo paraventricular (PVN) e estimulam a produção de orexina e MCH por neuronios do hipotálamo lateral (LH), promovendo aumento da fome e redução da termogênese. B- Após a alimentação, níveis elevados de leptina e insulina inibem a produção de NPY e CART e estimulam a produção de MSH e CART por neurônios do ARC. Neurônios MSH/CARTérgicos inibem a produção de orexina e MCH pelo LH e estimulam a produção de CRH e TRH pelo PVN, levando à saciedade e aumento da termogênese. 3°V, terceiro ventrículo.

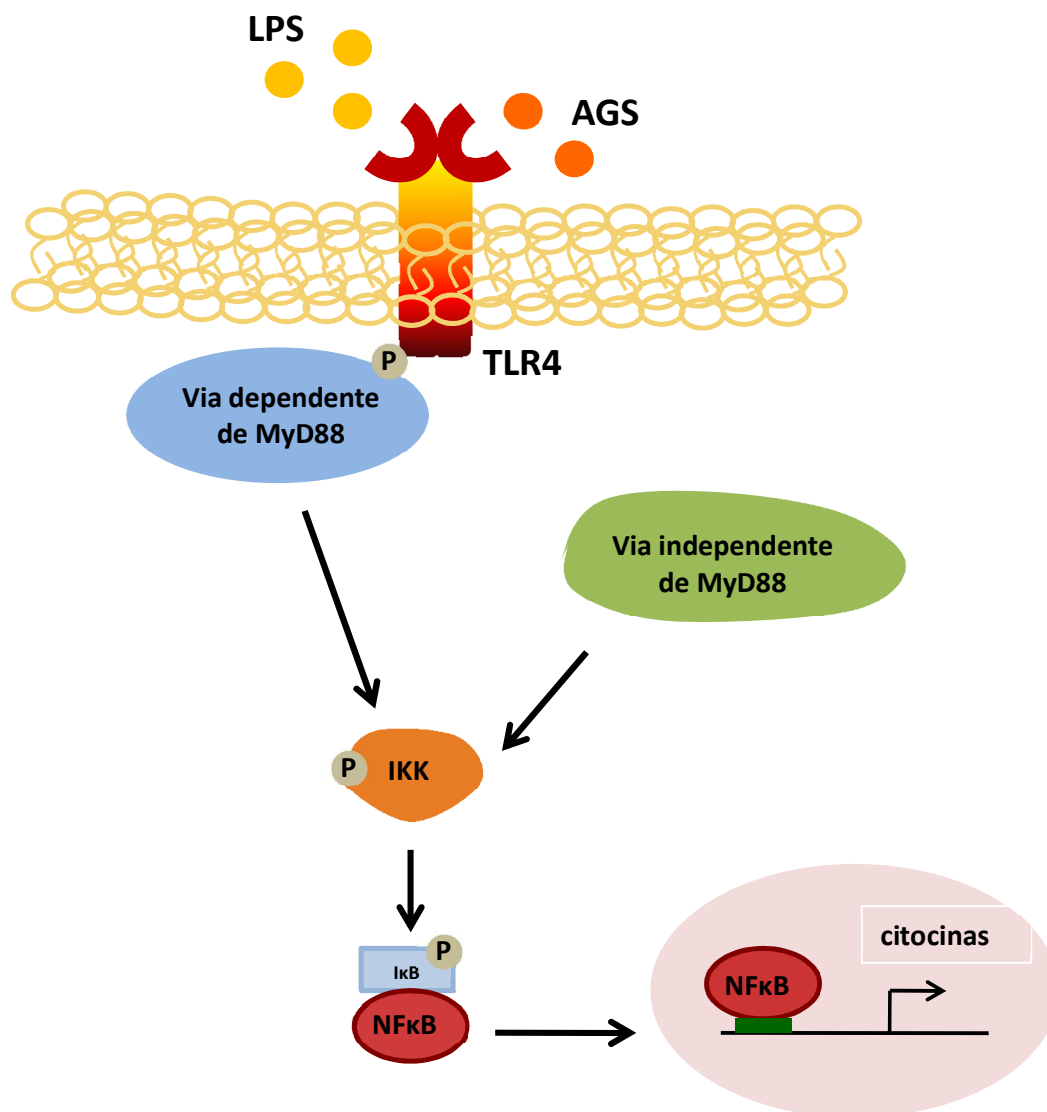
## 1.2 Processo inflamatório hipotálamico frente à dieta hiperlipídica

A obesidade associada à inflamação hipotálamica foi inicialmente descrita em 2005 depois de ter sido descobertas vias inflamatórias ativas no hipotálamo de ratos alimentados com dieta rica em gordura (De Souza *et al.*, 2005). Este trabalho revelou o aumento da regulação de citocinas inflamatórias como o TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 no hipotálamo. Estudos subsequentes mostraram que a neuroinflamação induzida pela dieta hiperlipídica promovia prejuízo aos circuitos neuronais relacionados com o controle homeostático das reservas corporais de energia, favorecendo assim o ganho de massa adiposa (Velloso, 2009).

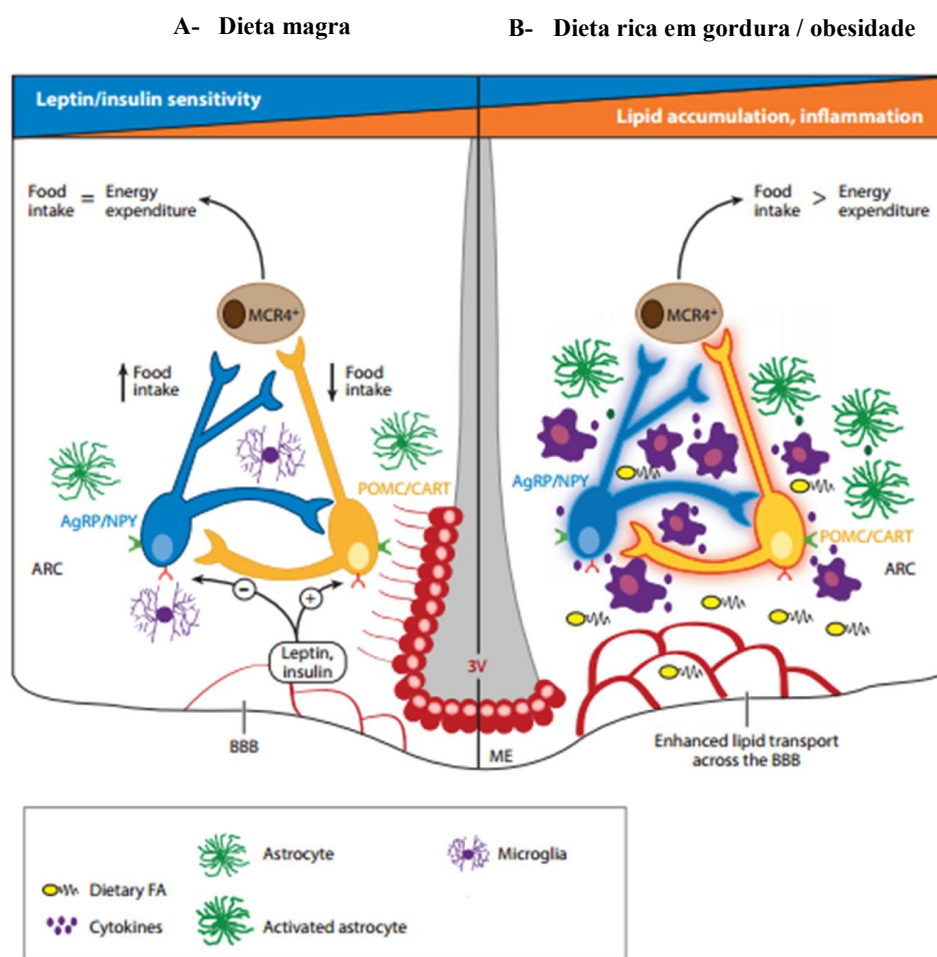
Dentro desse contexto, o consumo de dieta hiperlipídica induz a expressão de genes pró-inflamatórios no SNC que, via JNK e NF $\kappa$ B levam à transcrição gênica de citocinas que sustentam o processo inflamatório no hipotálamo (Milanski *et al.*, 2009). Esses sinais inflamatórios que culminam em alterações nas vias metabólicas de sinalização intracelular, como o fator de transcrição 3 (STAT3), o supressor de sinalização de citocina (SOCS3) e proteína tirosina fosfatase 1B (PTP1B), em conjunto, diminuem a responsividade do hipotálamo à leptina e insulina, provavelmente, devido ao estresse de retículo (Morentin e López, 2010). Dessa redução de resposta aos hormônios, instala-se um quadro de resistência à

leptina e insulina que, progressivamente, acarreta na perda do equilíbrio entre ingestão de alimentos e termogênese, contribuindo para um balanço energético positivo (De Souza *et al.*, 2005; Munzberg e Myers, 2005).

O mecanismo pelo qual o consumo de dietas hiperlipídicas ativa o processo inflamatório hipotalâmico tem sido extensivamente estudado. Milanski *et al.* (2009) identificaram a ativação de receptores da família *toll-like*, especialmente o TLR4 (*toll like receptor 4*- Figura 2 ), que é expresso tanto pela microglia quanto pelos astrócitos (Carpentier *et al.*, 2008). Dessa forma, ácidos graxos de cadeia longa ativam TLR4 e induzem estresse de retículo endoplasmático especialmente nos neurônios anorexigênicos hipotalâmicos do núcleo arqueado que produz um efeito negativo sobre a sinalização neuronal em resposta à leptina e insulina e compromete a secreção dos derivados anorexígenos, POMC/MSH e CART (Figura 3), correspondendo a um aumento do apetite e um balanço energético positivo (Zhang *et al.*, 2008).



**Figura 2** – Modulação da inflamação hipotalâmica via receptor TLR4. O receptor TLR4 atua como alvo molecular predominante de ácidos graxos saturados no hipotálamo, desencadeando uma rede de sinalização intracelular que induz resposta inflamatória.

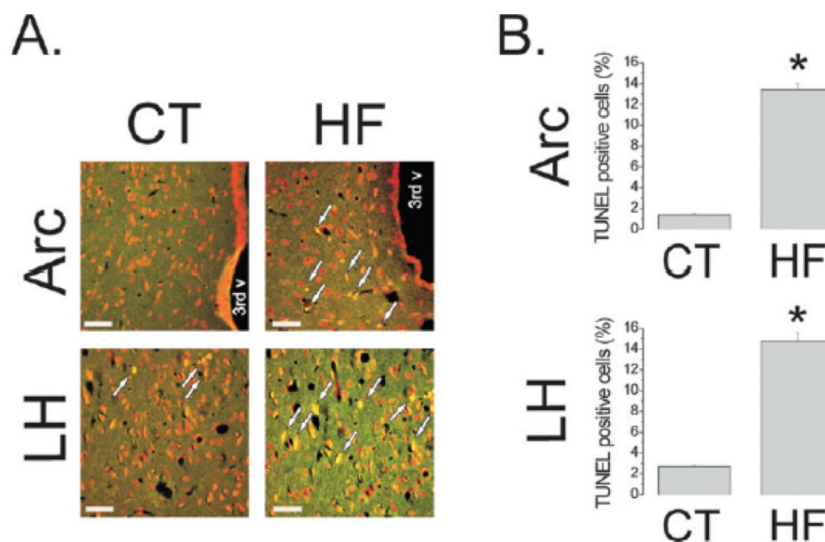


Fonte: Valdercos et al., 2015 (10.1146/annurev-physiol-021014-071656) – Open Access License.

**Figura 3** – Contribuições para a inflamação hipotalâmica. a) função hipotalâmica normal envolve uma interação recíproca entre neurônios AgRP/NPY e POMC/CART no núcleo arqueado do hipotálamo. Esses neurônios respondem a sinais de leptina e insulina e regulam tanto as vias de ingestão de alimentos e o gasto energético. b) No cenário de excesso alimentar crônico, este regulamento afinado é interrompido pelo acúmulo de nutrientes, incluindo por ácidos graxos, microglia e astrócitos (ambos os quais passam por uma forma específica de alteração morfológica e funcional) e citocinas inflamatórias que exercem efeitos múltiplos sobre uma variedade de tipos de células. Neste contexto inflamatório, a atividade normal dos neurônios AgRP/NPY e POMC/CART dá lugar a disfunção, com efeitos potencialmente prejudiciais sobre a homeostase da energia, glicose e lipídios.

Existem pontos de *cross-talk* 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 (*tumor necrosis factor*) (Siegel et al., 2003). Dessa forma, o processo inflamatório hipotalâmico pode promover apoptose de neurônios de núcleos envolvidos com a regulação da fome, saciedade e termogênese (Figura 4). Isso foi confirmado em um estudo que mostrou que o consumo prolongado de dieta hiperlipídica induziu uma resposta pró-

apoptótica preferencialmente em neurônios anorexigênicos. Com a morte neuronal ocorreu redução da densidade de sinapses nos núcleos arqueado e lateral do hipotálamo, um efeito que foi 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) - Open Access License

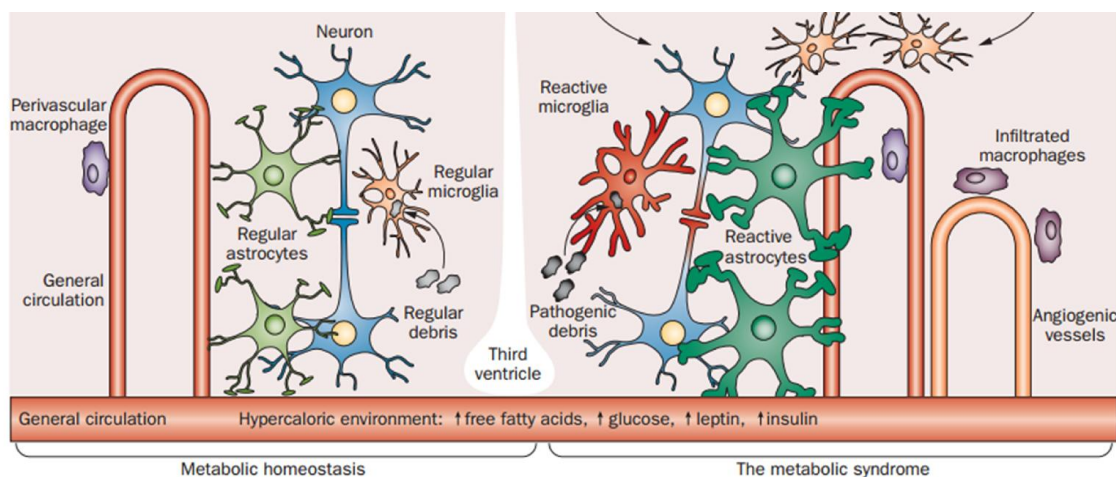
**Figura 4** – Técnica TUNEL para identificação de apoptose, realizada em cortes de hipotálamo de animais controle (CT) e alimentados com dieta hiperlipídica (HF). Em A, são mostrados seções da região do núcleo arqueado (Arc) e lateral (LH). As setas apontam neurônios marcados em amarelo, representando 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  $\mu$ m.

### 1.3 Participação dos astrócitos no processo inflamatório e apoptose

A morte neuronal no SNC é um evento que tem a participação dos constituintes da glia, a microglia e os astrócitos. O primeiro 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-alfa e IFN-gama, 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 enquanto os astrócitos assumem papéis importantes tanto na inflamação quanto no processo de eliminação sináptica e morte neuronal (Aldskogius *et al.*, 1999; Dong e Benveniste, 2001; Zanon e Oliveira, 2006).

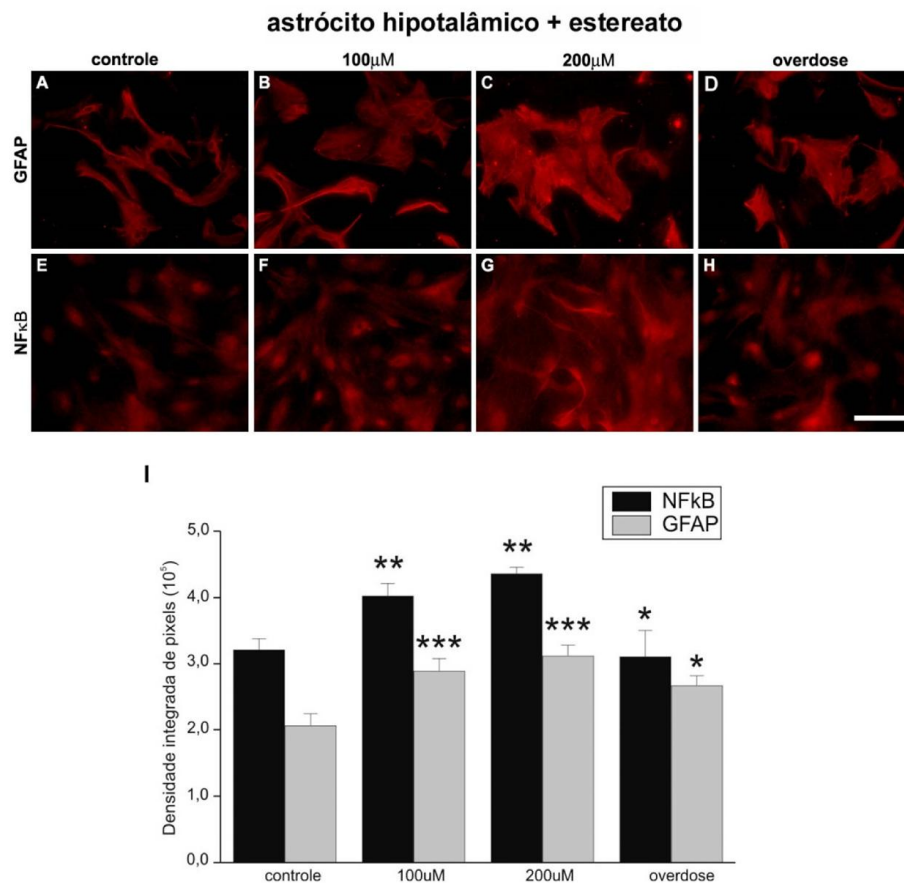
Ao contrário do proposto no passado, os astrócitos desempenham um papel ativo no SNC, participando em várias funções dentro do cérebro, incluindo o fornecimento de nutrientes para os neurônios, inflamação e a liberação de neuromoduladores, tais como o glutamato, o ATP e GABA (Sofroniew e Vinters, 2010). Adicionalmente, têm relação com os processos de manutenção e eliminação sináptica, sendo, atualmente, considerados a terceira parte da sinapse (Aldskogius *et al.*, 1999; Ullian *et al.*, 2001; Pekny *et al.*, 2007). Embora a sua função específica no hipotálamo seja mal compreendida, há indícios de que eles possam responder a eventos de sinalização que têm como alvo núcleos hipotalâmicos. Por exemplo, os astrócitos hipotalâmicos expressam várias isoformas do receptor de leptina (Oberheim *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2014), sugerindo que a leptina pode exercer efeitos diretos sobre eles. Os astrócitos podem também modular neurônios envolvidos na regulação metabólica, desempenhando papéis essenciais na transmissão da homeostase, expressando altos níveis de transportadores que fazem a remoção de neurotransmissores como glutamato, GABA e glicina da fenda sináptica (Sofroniew e Vinters, 2010). Além disso, após uma lesão tecidual, seja por trauma ou doença, os astrócitos tornam-se reativos (astrogliose ou astrogliose reativa – Figura 5). Processo caracterizado principalmente por hipertrofia das projeções astrocitárias e pelo aumento da expressão de proteínas do citoesqueleto conhecidas como filamentos intermediários, compostos por nestina, vimentina e GFAP (*glial fibrillary acid protein*) (Pekny *et al.*, 2007).

Dietas hiperlipídicas estão associadas com a presença de astrogliose dentro do hipotálamo, e, essa reação glial, possivelmente, envolvida no desenvolvimento de resistência à leptina e insulina (Thaler *et al.*, 2012; Marino *et al.*, 2011). Ao explorar o que desencadeia astrogliose como resposta à supernutrição de gorduras, estudos *in vitro* relataram aumento da expressão de TNF-alfa, IL-6 e IL-1 após tratamento com ácido graxo de cadeia longa, o que indica que os astrócitos respondam diretamente ao excesso de ácido graxo (Gupta *et al.*, 2012).



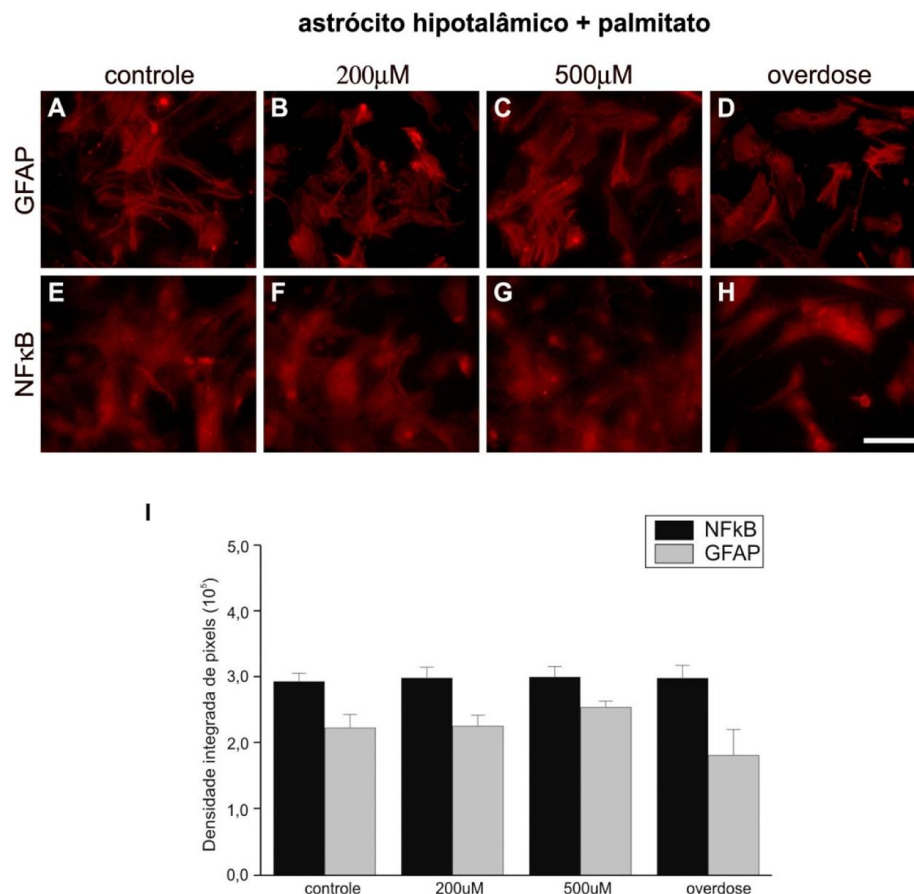
**Figura 5** – As diversas populações celulares no microambiente local do hipotálamo mediobasal e suas respectivas transições de condições basais a fases reativas na síndrome metabólica. Com exposição a um ambiente hipercalórico, microglia e astrócitos entram rapidamente estados reativos (Kalin, *et al.*, 2015).

Em suma, o processo inflamatório, bem como a apoptose no tecido nervoso, é um processo multicelular, tempo-dependente e regulado por uma variedade de eventos moleculares extra e intracelulares. Definir ações e papéis específicos dos astrócitos reativos, tanto na sua complexidade como na sua dinâmica temporal, representa um desafio. Num trabalho prévio, começamos a estudar a participação do astrócito nas respostas frente à presença de alto teor de gordura. Para tanto, em culturas purificadas de astrócitos do hipotálamo, pudemos observar que essas células apresentam-se comparativamente mais reativas, aumentando a expressão da proteína GFAP, após adição de palmitato e estereato diluídos em meio de cultura celular (Figuras 6 e 7). Além disso, os astrócitos reativos tratados com ácidos graxos de cadeia longa, principalmente com estereato, mostraram imunomarcacão para NFκB (Figura 6), um fator de transcrição ativado via TLR-4 que aumenta a transcrição de genes que codificam citocinas e moléculas de adesão perpetuando as respostas inflamatórias (Nishikori, 2005).



**Figura 6** – 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. [\*] p<0,05; [\*\*] p<0,01; [\*\*\*] p<0,001. Dados não publicados.





**Figura 7** – 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 aumenta a expressão de GFAP, mas não de NFκB, porém sem diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Escala = 100 μm. Dados não publicados.

Como continuação desta primeira etapa de investigação, buscou-se estudar a influência de meio de cultura condicionado em culturas de astrócitos tratados com estereato e palmitato, sobre culturas de linhagem de neurônios hipotalâmicos (CLU-189). 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 (conforme detectado pela técnica de ELISA), já que essa citocina se correlaciona com morte celular e neurodegeneração (Chao *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 2002; Bermel e Rudick, 2007). Porém, de acordo com os resultados obtidos, o meio condicionado induziu taxa de morte celular semelhante às culturas controles com nível de TNF reduzidos. Deste modo, observou-se que o meio condicionado em astrócitos tratados com ácidos graxos

em contato com os neurônios de linhagem não promoveram maior morte celular, demonstrando um efeito possivelmente neuroprotetor quando comparados os efeitos desses meios condicionados com o meio condicionado controle.

Diferentemente de linhagens neuronais como as CLU189, quando os neurônios são extraídos do tecido e cultivados, eles retêm os processos básicos subjacentes ao comportamento fisiológico, sendo capazes de gerar potenciais de ação e reestabelecerem conectividade *in vitro* (Belsham *et al.*, 2004). Sendo assim, usando como modelo experimental culturas primárias de neurônios hipotalâmicos podemos avaliar a influência do meio condicionado em astrócitos tratados com ácidos graxos sobre a rede neuronal, buscando dados como a densidade sináptica total bem como a proporção de sinapses inibitórias e excitatórias. Dessa forma, buscou-se estabelecer condições experimentais mais próximas às características dos neurônios *in vivo* através da padronização de culturas primárias de neurônios hipotalâmicos.

#### ***1.4 Astrócitos, produção de citocinas e fatores de crescimento***

Embora a microglia constitua as principais células residentes do Sistema Imune do cérebro, os astrócitos também são células imunocompetentes, e agem como reguladores importantes da inflamação cerebral (Farina *et al.*, 2007). Os astrócitos podem liberar uma grande variedade de citocinas e também são alvo de sinalização autócrina e parácrina de citocina por meio de diversos receptores que eles expressam (Valdearcos *et al.*, 2015).

Sendo uma importante fonte de fatores pró e anti-inflamatórios, os astrócitos apresentam papel fundamental na resposta imunológica e inflamatória no SNC (Dong e Benveniste, 2001). 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- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , entre outras (Dong e Benveniste, 2001; Piehl e Lidman, 2001; Nakagawa *et al.*, 2005). Suzumura *et al.* (2006) estudaram o efeito de citocinas produzidas pela glia sobre os processos de degeneração e regeneração neuronal. Seus resultados mostraram que as citocinas utilizadas (IL-1, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) não causaram morte celular. No entanto, outros autores observaram correlação entre produção das citocinas acima mencionadas com morte e degeneração neuronal e com diversas doenças neurodegenerativas (Chao *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 2002; Bermel e Rudick, 2007; Yamamoto *et al.*, 2007).

Citocinas pro-inflamatórias, apesar de contribuírem com respostas positivas num primeiro momento pós-lesional, como estimularem a produção de fatores neurotróficos (Dong

e Benveniste, 2001), logo se tornam excessivamente tóxicas para as células nervosas causando prejuízos, sustentando condições inflamatórias crônicas envolvidas na patogênese de doenças neurológicas como, por exemplo, o IFN gama na Esclerose Múltipla e na doença de Alzheimer (Dong e Benveniste, 2001; Yamamoto *et al.*, 2007). Muitas citocinas apresentam ações paradoxais de benefício e prejuízo, que dependem do tempo e da intensidade da lesão tecidual. Nesse caso temos, por exemplo, o TNF- $\alpha$  que é uma citocina multifuncional mediadora pró-inflamatória que em algumas situações apresenta dualidade funcional estando relacionada a neurodegeneração no SNC quando superexpressa em camundongos provocando gliose e desmielinização (Probert *et al.*, 1995) e, que também, é reconhecida como uma citocina reativa regulada em resposta a lesão traumática ou excitotóxica do cérebro exercendo portanto funções potencialmente neuroprotetoras (Wajant *et al.*, 2003).

Além de serem produtores de citocinas, os astrócitos também contribuem com a produção de fatores neurotróficos, sendo, no SNC, a principal fonte dessas substâncias. Os fatores neurotróficos constituem um grupo heterogêneo de polipeptídeos solúveis, que permitem sobrevivência, diferenciação, manutenção e, quando possível, a regeneração axonal no SNC e SNP, agindo através de receptores específicos (Halegoua *et al.*, 1991; Terenghi, 1999; Richardson, 1999). Eles podem ser classificados em três grupos: as neurotrofinas, os ligantes dos receptores GDNF (*glial cell-line derived neurotrophic factor*) e as citocinas neuropoiéticas (Ekester, 2004).

Astrócitos reativos são capazes de expressar NGF (fator de crescimento neural), CNTF (fator neurotrófico ciliar), e FGF-2 (fator de crescimento fibroblástico 2) (Lu *et al.*, 1991; Asada *et al.*, 1995; Frautschy, 1991). O fator de crescimento neural (NGF) é uma das principais neurotrofinas e desempenha papel fundamental na regeneração de nervos periféricos (SUN *et al.*, 2009). O CNTF tem demonstrado ser responsável por auxiliar na sobrevivência de neurônios motores tanto *in vitro* quanto *in vivo*, resgatando-os da morte natural programada (Hammanberg *et al.*, 2000). Sabe-se que o FGF-2 é uma proteína mitogênica capaz de agir em múltiplos tipos de células tal como fibroblastos e células da glia (Davis e Stroobant, 1990; Baird e Klagsbrun, 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). Evidências demonstram que as neurotrofinas BDNF e o NT-3 promovem brotamento e alongação 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).

O potencial das células da glia em expressar fatores neurotróficos conduziu à hipótese de que os astrócitos *in vivo* podem ser capazes de fornecer aos neurônios fatores necessários apropriados para a sua sobrevivência e manutenção. Por outro lado, como já vimos, expressam substâncias inflamatórias. Nossos resultados com as culturas de CLU189 indicam papel neuroprotetor para o meio condicionado em astrócitos que foram tratados com ácidos graxos saturados. Nosso intuito é analisar esse meio condicionado e as culturas de astrócitos no sentido de entendermos o seu envolvimento na inflamação hipotalâmica que ocorre na obesidade, bem como, analisar a interação dessas substâncias produzidas pelos astrócitos com neurônios da região hipotalâmica.

**2. OBJETIVO**

### **2.1 *Objetivo geral:***

Estudar o papel dos astrócitos nas respostas frente ao excesso de ácidos graxos e a interação dessas células com neurônios hipotalâmicos.

### **2.2 *Objetivos específicos:***

- Padronização da cultura neuronal hipotalâmica primária;
- Estudo da sinaptogênese em culturas neuronais primárias do hipotálamo tratadas com meio condicionado em astrócitos tratados com ácidos graxos;
- Determinar o perfil de expressão de citocinas nos meios condicionados em astrócitos tratados com ácidos graxos;
- Analisar a expressão gênica induzida pelo tratamento com ácidos graxos em astrócitos hipotalâmicos.

### **3. MATERIAL E MÉTODO**

### **3.1 Animais**

Foram utilizadas três ninhadas (cada: 5-6 animais neonatos no primeiro ou segundo dia pós-natal, ambos os sexos) de camundongos fêmeas Swiss para a cultura primária de astrócitos (Figura 8). Para a cultura primária de neurônios foram utilizados embriões E12 extraídos via cesárea de dez camundongos Swiss fêmeas adultas. Todos os experimentos com utilização de animais foram aprovados pelo Centro de Bioterismo de Experimentação Animal da Universidade Federal de Uberlândia (CBEA/UFU) sob o protocolo nº 097/10 – Anexo A.

### **3.2 Cultura primária de astrócitos**

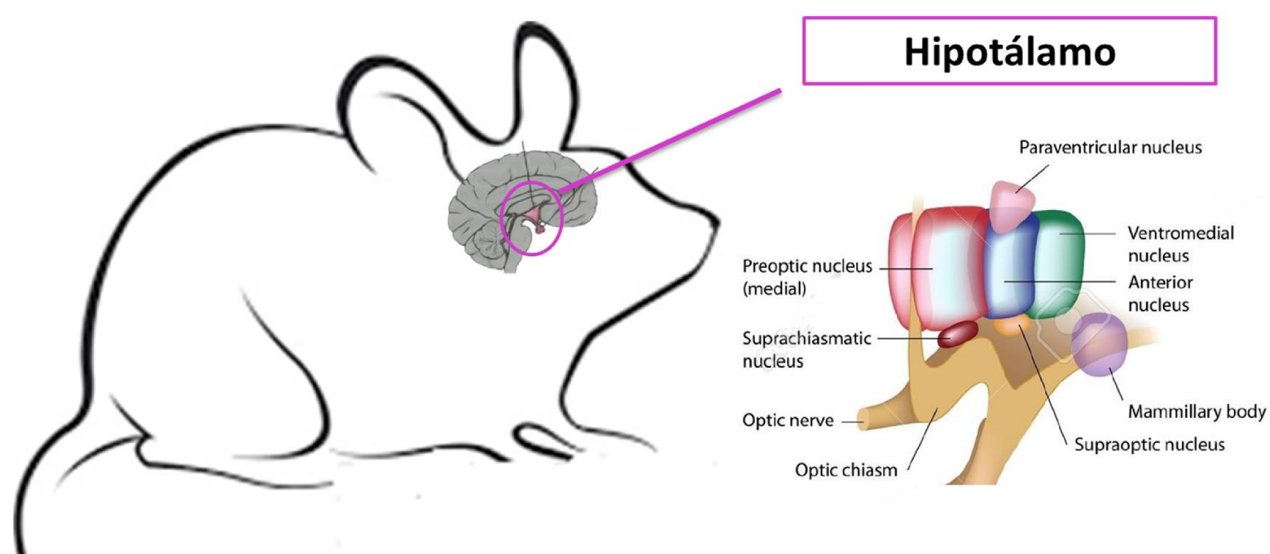
A extração de tecido foi realizada com material cirúrgico estéril. Culturas purificadas de astrócitos foram estabelecidas através da dissociação do hipotálamo de camundongos neonatos da linhagem Swiss (Figura 8). Sequencialmente, foram realizadas a fragmentação e tripsinização dos hipotálamos durante 10 minutos a 37°C em tampão fosfato sem cálcio e magnésio (PBS flush, 0,1M, pH 7,4, com antibiótico, Nutricell). Os fragmentos celulares precipitados foram descartados e a solução com células sobrenadante foi transferida para um tubo falcon de 15 mL contendo 400µL de albumina bovina diluída a 4% em meio de cultura DMEM. O tubo com células foi submetido à centrifugação (1.500 RPM por 10 minutos). O sobrenadante foi eliminado e o precipitado foi semeado em garrafa de cultura de 25cm<sup>2</sup> e estocadas em incubadora sob temperatura de 37°C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> até atingir a confluência. Após a confluência celular na garrafa de cultivo, as células foram descoladas com tripsina, homogeneizadas e semeadas em volume igual em 4 garrafas de 25cm<sup>2</sup> para a obtenção de culturas mais puras. Pelo menos três repiques foram usados para a purificação das culturas de astrócitos, anteriormente a cada repique celular, as garrafas foram agitadas por pelo menos cinco minutos para descolamento de células menores como oligodendrócitos e microglias.

### **3.3 Cultura primária de neurônios hipotalâmicos**

Previamente, placas de cultura de 6 e 24 poços foram tratadas com poli-D-lisina (0,25 mL por poço; 5µg/mL, Sigma – P6407), incubadas em temperatura ambiente por pelo menos 2h. Posteriormente, o excesso de líquido foi retirado e as placas foram lavadas duas vezes com PBS flush e incubadas *overnight* a 37°C. Durante o processo de padronização da cultura de neurônios foram utilizados embriões de camundongos Swiss E12 a E18. Para a extração do hipotálamo foi realizada a cesárea para a retirada dos embriões que foram mantidos em meio PBS flush gelado com antibiótico. Os hipotálamos foram extraídos e triturados com auxílio de



pinça fina em meio Neurobasal (2mL, Gibco - 21103) acondicionados em tubo Falcon de 15 mL. Em seguida, o tecido foi dissociado aproximadamente 15 vezes com auxílio de pipeta Pasteur de vidro e, após descanso de cinco minutos, houve a formação de precipitado no fundo do tubo e coletou-se o sobrenadante, o qual foi transferindo para um novo tubo com 1mL de meio Neurobasal. A quantidade de neurônios foi contada com auxílio de câmara de Neubauer e um número de  $5 \times 10^5$  células/mL foi semeado em cada poço na placa de 6 orifícios e  $10^5$  células/mL em cada poço da placa de 24 orifícios. As culturas foram mantidas em meio Neurobasal acrescido do suplemento B-27 (2%, Gibco - 17504), L-Glutamina (1% Sigma – G7513), Antibiótico (0,10% Sigma – P4333) e Ara-C (0,01% Sigma – C6645) em incubadora a 37°C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.



**Figura 8** - Ilustração da localização do hipotálamo no SNC.

### **3.4 Tratamento com ácidos graxos saturados e LPS**

Baseado no trabalho prévio de Milanski *et al.* (2009) os ácidos graxos (AG) que causaram uma reação inflamatória mais intensa no hipotálamo foram os ácidos esteárico (AG1/18 carbonos) e palmitato (AG2/16 carbonos). Ambos os ácidos foram diluídos em álcool para a produção de solução estoque e em seguida diluídos em solução de BSA em concentração 3:1 (AG:BSA) e administrados numa concentração de 200µM nas culturas de astrócitos conforme foi testado em trabalho de iniciação científica desenvolvido anteriormente pela aluna Érica Vieira no Laboratório de Neurociência – UFU. Para o experimento de produção de meio condicionado realizou-se administração de AG em culturas purificadas de

astrócitos, o meio foi mantido em contato com os astrócitos por três dias e, em seguida, recolhidos e congelados para posterior análise e utilização no tratamento das culturas neuronais. Como aperfeiçoamento dos experimentos desenvolvidos pelo grupo, adicionamos posteriormente o tratamento das culturas com Neurobasal+LPS (1%) ou Neurobasal+Álcool para produção de meios condicionados controles positivo e negativo, respectivamente.

### **3.5 Tratamento das Culturas neuronais**

Após o terceiro dia de tratamento das culturas de astrócitos com AG1 e AG2 o meio de cultura (condicionado) foi recolhido, suplementado com B27, L-Glutamina, antibiótico e Ara-C, e adicionado sobre culturas purificadas de neurônios hipotalâmicos. Após o tempo de manutenção de sete dias, as culturas foram fixadas com formalina (formaldeído 4%) e conservadas com PBS/glicerol (2:1) a 4°C para realização da imunocitoquímica.

### **3.6 Imunocitoquímica**

As culturas foram colocadas em temperatura ambiente para a climatização, sendo então, lavadas por duas vezes em PBS 0,01M, pH 7,4. Em seguida, as células foram incubadas pelo período de uma hora em câmara úmida com 150µL de solução de albumina bovina 5%. Após este período, os anticorpos primários diluídos em PBS-Tween foram aplicados, com período de incubação de 18 a 24 horas sob temperatura de 4°C em câmara úmida. Os anticorpos primários empregados estão apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1** – Anticorpos primários utilizados.

<b>Anticorpos Primários</b>	
<b>Camundongo - Sinaptofisina (1:200, Millipore)</b>	Proteína presente nas vesículas de neurotransmissor nos terminais pré-sinápticos
<b>Camundongo - VGAT (1:500, Synaptic System)</b>	Transportador vesicular de GABA
<b>Coelho - GABA<sub>A</sub>γ2 (1:500, Synaptic System)</b>	Receptor GABA
<b>Coelho - PSD-95 (1:500, Cell Signaling)</b>	Proteína de densidade pós-sináptica
<b>Camundongo - βIII-tubulina (1:1000, Promega)</b>	Microtúbulo encontrado quase exclusivamente em neurônios.

Em sequência à primeira incubação, as culturas foram lavadas em PBS 0,01M e incubadas com os anticorpos secundários conjugados com partícula fluorescente Alexa Fluor

488 ou 564, anti-IgG de coelho ou camundongo (Molecular Probes, 1:1000, 488; 1:500, 546) por 2 horas, protegidos da luz. As culturas foram lavadas em PBS 0,01M e mantidas em glicerol/PBS (1:1) contendo DAPI (4'-6'-diamino-2-fenil-indol) marcador citoquímico de núcleo que marca DNA. O material foi então observado e documentado utilizando-se microscópio confocal (TCS-SP5, Leica) e microscópio ótico TS200 de epifluorescência da Nikon.

As sinapses excitatórias e inibitórias foram analisadas pela imunomarcção para PSD-95/Sinaptofisina e VGAT/GABA<sub>A</sub>ry2 respectivamente. Dez imagens de campos aleatórios das culturas foram obtidas por microscopia confocal (Invertido, Zeiss 510 Meta) e usadas para a quantificação do número de *puncta* com o programa ImageJ (1.46r, National Institute of Health, USA). Para as duplas marcações, os canais verde e vermelho foram colocalizados e o número de *puncta* analisados com o plug-in “*Puncta Analyze*” do programa ImageJ.

A análise estatística de todos os resultados, obtidos foi realizada com o auxílio do programa GraphPad Prisma 5 (versão 5.03), utilizando-se o ANOVA um critério com pós-teste adequado à distribuição dos dados. Para todos os testes, o nível de confiança utilizado foi de 95% ( $p < 0,05$ ).

### ***3.7 Determinação de citocinas por citometria de fluxo (Cytometric Bead Array – CBA)***

As dosagens das citocinas IL-2, IL-4, IL-10, IL-17A, IFN- $\gamma$  e TNF no meio condicionado foram realizadas pelo método CBA, utilizando-se o *kit CBA mouse-Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit* (BD Cytometric Bead Array, San Jose, CA, USA). Em resumo, o meio condicionado e os padrões de citocinas do kit foram incubados com microesferas de captura recobertas com anticorpos específicos para as respectivas citocinas e com o anticorpo de detecção marcado com ficoeritrina (PE). Após as incubações foi adicionado 500 $\mu$ L da solução de lavagem e centrifugado por 10 minutos a 1.400 RPM à 18°C. O sobrenadante foi aspirado deixando aproximadamente 200 $\mu$ L da solução para as aquisições em citômetro de fluxo, BD FACS Calibur (BD Bioscience, San Diego, CA, USA). Os resultados foram gerados utilizando o BD FACS Diva Software e expressos em gráficos.

Os resultados foram tratados com o teste de normalidade para verificar o padrão de distribuição de citocinas das amostras de acordo com cada tratamento. Para dados paramétricos utilizamos o teste ANOVA um critério com pós-teste de Bonferroni e para os

dados não-paramétricos foi usado o teste *U de Mann-Whitney*. O nível de significância para valor de *P* foi 0,05 (indicados nos gráficos com "\*\*").

### 3.8 Sequenciamento de transcritos por RNA-Seq

Através dos recentes avanços tecnológicos no sequenciamento de DNA, atualmente é possível realizar o sequenciamento massivo de cDNA a partir de RNA celular, sendo esse processo conhecido como RNA-seq (GARBER *et al.*, 2011). Para essa técnica algumas etapas foram realizadas e estão descritas abaixo:

#### 3.8.1. Extração de RNA total

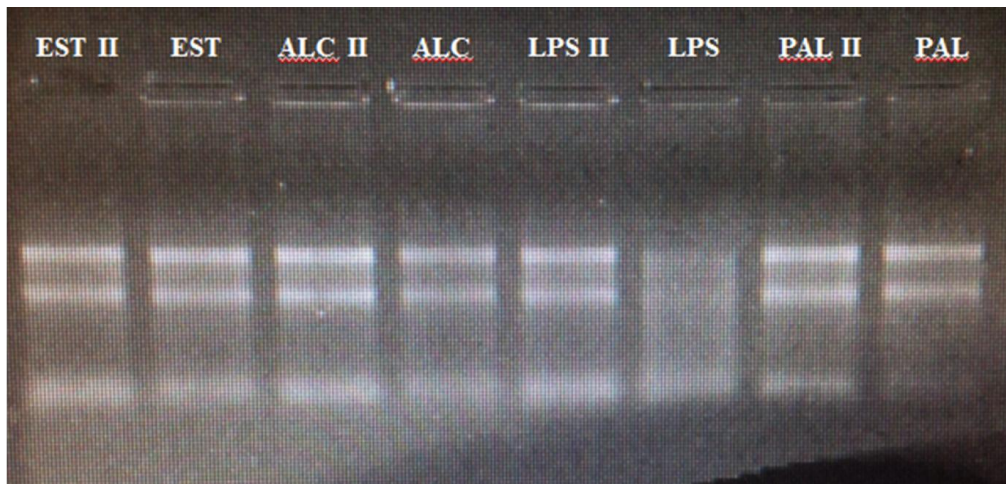
O RNA total foi extraído das culturas purificadas de astrócitos utilizando 2 mL do reagente Trizol (AMRESCO) por garrafa correspondente a cada tratamento, homogeneizadas em seguida com auxílio do *cell scraper*. Em seguida, foram adicionados 200 µL de clorofórmio, as amostras foram homogeneizadas em vórtex por 15 segundos e mantidas por 3 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 12.000xg por 15 minutos a 4°C e a parte aquosa, na qual se encontra o RNA, foi transferida para um novo tubo. Nesta etapa, foram adicionados 250 µL de isopropanol à fase aquosa, deixando incubar em temperatura ambiente por 10 minutos seguidos por centrifugação. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 500 µL de etanol 75%. O sobrenadante foi novamente descartado e após a secagem o precipitado foi suspenso em 30 µL de água DEPC.

A qualidade destas amostras de RNA foi verificada no equipamento Agilent 2100 Bioanalyzer. As concentrações obtidas após extração do RNA total são apresentadas na Tabela 2.

**Tabela 2** – Quantidade total de RNA.

Amostra	Ng
Controle	202,1
Controle LPS	584,3
Tratado Estereato	238,1
Tratado Palmitato	350,3

Para análise da qualidade do RNA, 1 µg da amostra foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% desnaturante em tampão TAE 5X, corado com brometo de etídio (Figura 9).



**Figura 9** - Avaliação da qualidade do RNA total de astrócitos. Eletroforese em gel de agarose 1%.

Como observado no gel o RNA total de astrócitos apresentou duas bandas bem definidas em quase todas as amostras. Apenas uma amostra apresentou leve arraste (amostra LPS), mas também foi considerada viável e com boa qualidade para a construção da biblioteca assim como as demais amostras.

### **3.8.2. Construção de bibliotecas**

Para depleção do RNA ribossomal (rRNA), o RNA total foi incubado com sondas específicas para captura de rRNA utilizando kit *RiboMinus* (Invitrogen) segundo recomendações do fabricante. A qualidade do RNA foi checada pelo software BD FACSDiva V8.0 e a quantificação do RNA purificado foi feita por espectrofotometria (NanoDrop ND-1000). As concentrações das amostras seguem na Tabela 3.

**Tabela 3** – Concentração obtida de mRNA das amostras.

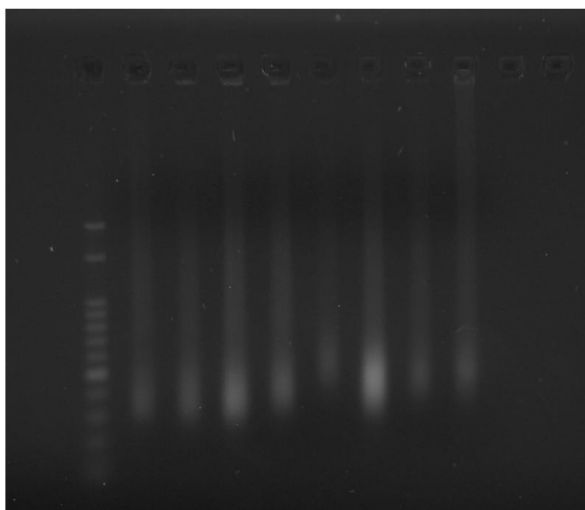
<b>Amostra</b>	<b>ng/<math>\mu</math>L</b>
<b>Controle</b>	24,7
<b>Controle LPS</b>	79,1
<b>Tratado Estereato</b>	44,3
<b>Tratado Palmitato</b>	33,4

As bibliotecas de cDNA foram preparadas utilizando *kit Ion Total RNA-Seq V2* (Life Technologies) segundo recomendações do fabricante. Somente moléculas maiores que 100 pb foram selecionadas utilizando sistema E-gel (Invitrogen). Em seguida cDNAs foram purificados em microcolunas utilizando *kit QIAquick PCR Purification* (Quiagen) seguindo recomendações do fabricante. As amostras foram então quantificadas em duplicata utilizando *kit QuBit dsRNA Assay* (Invitrogen) por espectrofotometria (NanoDrop ND-1000/ Tabela 4).

**Tabela 4** – Quantificação de cDNA.

<b>Amostra</b>	<b>ng/<math>\mu</math>L</b>
<b>Controle</b>	29,5
<b>Controle LPS</b>	33,8
<b>Tratado Estereato</b>	39,7
<b>Tratado Palmitato</b>	26,6
<b>Controle II</b>	40,6
<b>Controle LPS II</b>	12,9
<b>Tratado Estereato II</b>	26,3
<b>Tratado Palmitato II</b>	21,7

Os fragmentos amplificados apresentaram bandas de aproximadamente 200pb como ilustrado na Figura 10, esses foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão EDTA corado com brometo de etídio.



**Figura 10** - Validação da biblioteca. Padrão Ladder 50pb.

### 3.8.3. Sequenciamento

As bibliotecas recém-construídas foram utilizadas como moldes em PCR de emulsão usando o kit *Ion PI™ Hi-Q™ Chef Kit* (Life Technologies) em sistema automatizado *Ion Chef* (Life Technologies). As amostras foram depositadas em Chip PI IC. O sequenciamento foi realizado em sequenciador de nova geração *Ion Proton* (Life Technologies) utilizando kit *Ion PI Sequencing IC 200* (Life Technologies) segundo recomendações do fabricante.

Foram geradas oito bibliotecas do tipo *single* referente à duplicata das amostras tratadas e controles. Foram obtidas 70.026.821 reads, variando em tamanhos de 113-72 pb. Os resultados obtidos nesta plataforma são mostrados na Tabela 5.

**Tabela 5** – Dados gerados na plataforma Ion Proton™ System.

Amostra	Tipo de Biblioteca	Tamanho médio das reads	Número de reads
Controle	<i>Single</i> *	93 pb	8.284.187
Controle LPS	<i>Single</i>	98 pb	5.666.082
Tratado Estereato	<i>Single</i>	98 pb	11.689.013
Tratado Palmitato	<i>Single</i>	107 pb	12.280.934

<b>Controle II</b>	<i>Single</i>	122 pb	9.684.233
<b>Controle LPS II</b>	<i>Single</i>	145 pb	8.702.857
<b>Tratado Estereato II</b>	<i>Single</i>	121 pb	5.144.373
<b>Tratado Palmitato II</b>	<i>Single</i>	122 pb	7.056.647

\**Single*: o sequenciador faz a leitura dos fragmentos de apenas um lado para o outro.

#### 3.8.4. Análises de Bioinformática

Do ponto de vista da bioinformática, a análise de dados RNA-Seq, mais especificamente a comparação e análise da expressão genética, foi constituída pelas fases de alinhamento, sumariação, normalização, expressão diferencial e a anotação dos genes de interesse.

As *reads* geradas pelo *Ion Proton* foram recortadas de acordo com o programa *FastQ Quality Trimmer* implementado no pacote *Galaxy* de domínio público. As sequências que apresentaram qualidade avaliada pelo índice *Solexa* menor que 20 foram eliminadas. *Reads* com alta qualidade foram utilizadas para mapeamento contra o genoma de referência utilizando programa *TopHat (Galaxy)*. A taxa de expressão diferencial de cada gene foi calculada utilizando o programa *CuffDiff (Galaxy)* e os valores foram normalizados pelo método de normalização de biblioteca utilizando a média geométrica. Os valores de FPKM (fragmentos por kilobase de genoma por milhões de *reads* mapeados) foram calculados e o teste-*t* estatístico foi realizado para estimar a significância entre as médias de abundância em FPKM de cada amostra. Erros do tipo I foram controlados com a aplicação da correção de Benjamini-Hochberg para testes múltiplos (Trapnell *et al.*, 2010).

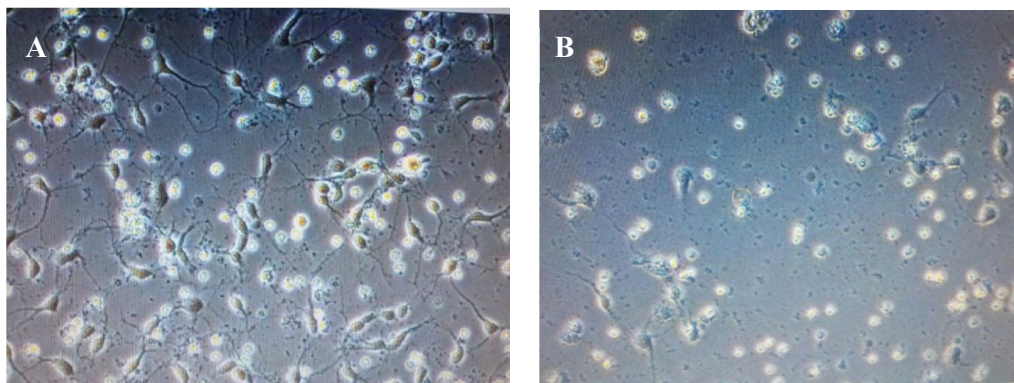


## **4. RESULTADOS**

#### 4.1 Padronização da cultura primária de neurônios hipotalâmicos

O processo de estudo para padronização de culturas primárias de neurônios se deu através da análise comparativa entre protocolos já estabelecidos e experiências internas do grupo através da colaboração com a Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ/2013) e Universidade de Gênova (UniGe/2012). As culturas desenvolvidas pelo nosso grupo foram baseadas principalmente no protocolo utilizado na UFRJ (Diniz *et al.*, 2012).

Após testes com diferentes fases de desenvolvimento dos embriões viu-se que culturas realizadas com embriões entre os dias gestacionais E12-E14 (Figura 11A) apresentaram maior qualidade e melhor desenvolvimento *in vitro* quando comparadas com outras culturas de embriões em fase mais avançada de desenvolvimento (E16-E18). Culturas realizadas com embriões E14-E16 (Figura 11B) também se mostraram viáveis, contudo apresentaram quantidades relativamente inferiores de neurônios e muitos debris celulares quando comparadas.



**Figura 11** – Fotomicrografia mostrando cultura de neurônios hipotalâmicos extraída de embriões E12 (A) e E16 (B) após uma semana de cultivo.

Ao longo de todo o processo de padronização foram inseridas algumas etapas que estão descritas a seguir:

- Todo o processo de extração passou a ser realizado sobre placas de gelo a fim de diminuir a morte dos neurônios durante os períodos de procedimentos cirúrgicos;
- As pontas das pipetas Pasteur de vidro foram queimadas para se tornarem mais abauladas para não danificarem os neurônios durante o processo de dissociação;
- Após alguns testes, optou-se por não centrifugar o sobrenadante com células após a dissociação para evitar a degradação dos neurônios;
- A adição de Ara-C foi considerada viável para a contenção da proliferação de células da glia desde o primeiro dia de cultivo.

- As trocas de meio ficaram determinadas em intervalos máximos de 4 dias, substituindo apenas metade do meio por meio novo.

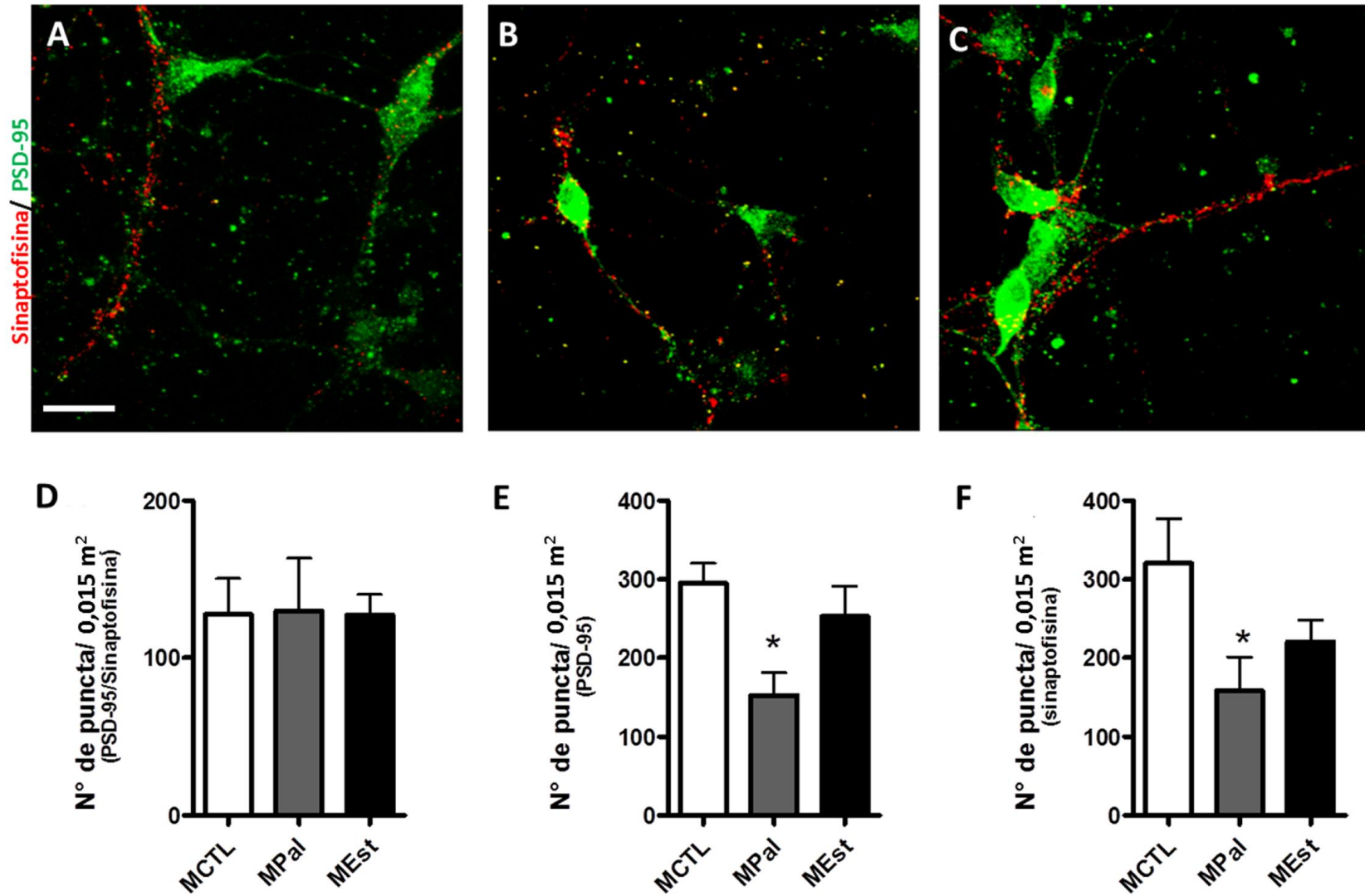
Após a obtenção das culturas padronizadas não foi possível prosseguir com os tratamentos com meio condicionado devido a fatores externos de interferências como contaminações, demora na manutenção de equipamentos danificados e quedas/picos constantes de energia que acabavam por ocasionar a morte da cultura tendo em vista a alta sensibilidade da mesma.

#### ***4.2 Culturas primárias de neurônios hipotalâmicos tratadas com meio condicionado***

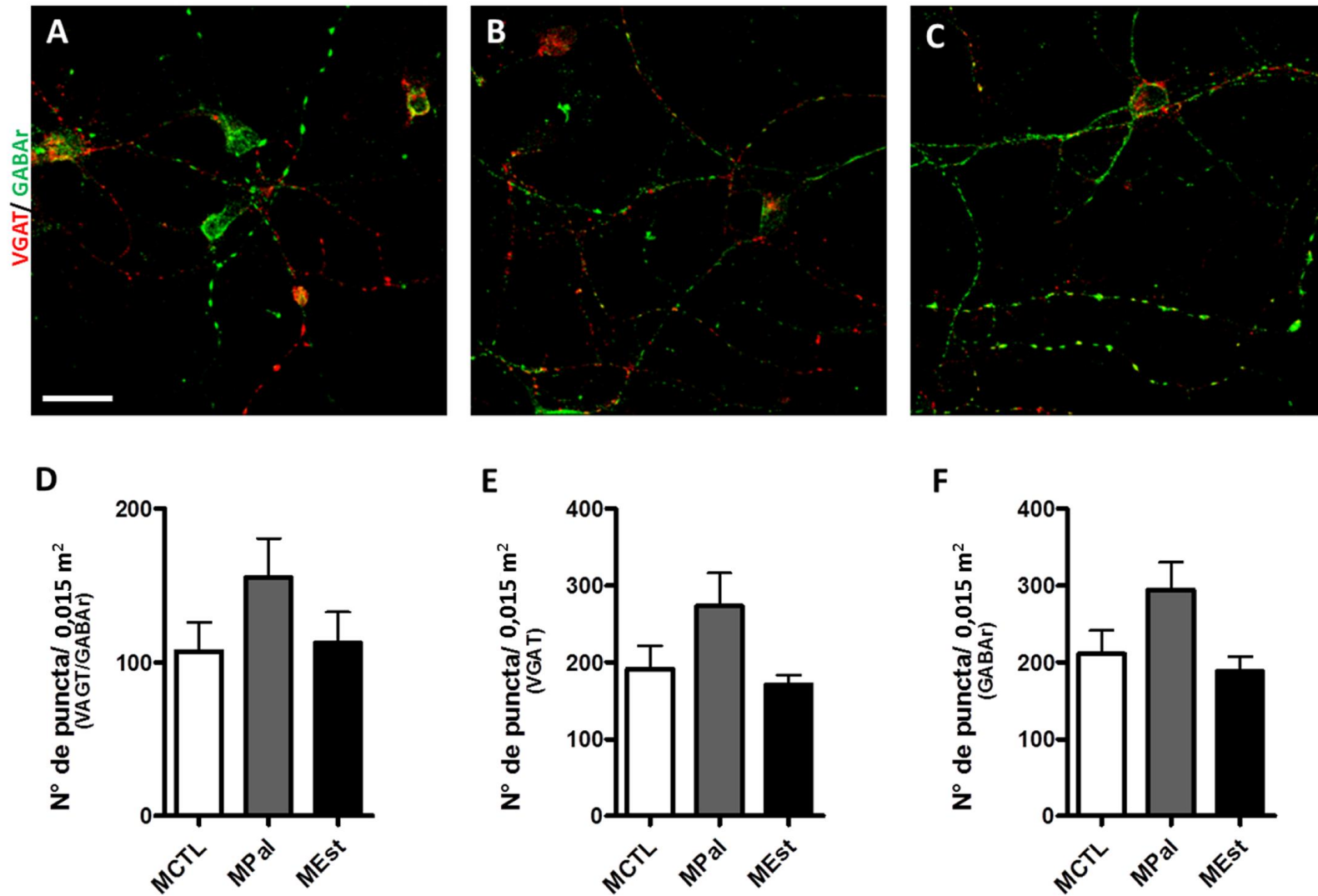
Foram realizadas imunomarcações em culturas neuronais a fim de se estudar a viabilidade celular e a sinaptogênese nas diferentes condições de tratamento. Sobre as culturas neuronais, foi adicionado meio condicionado em astrócitos tratados com AG1 ou AG2 e, ainda, meio condicionado somente em astrócitos sem tratamento.

A densidade sináptica total foi analisada por meio da imunomarcação anti-sinaptofisina (Figura 12) em que foi observada a diminuição da densidade sináptica nos tratamentos com os ácidos graxos em relação ao controle (Figura 12F). Sendo as sinapses excitatórias mais afetadas (Figura 12E). Em relação às sinapses inibitórias, identificadas através da marcação para VGAT/GABA<sub>A</sub> respectivamente (Figura 13) foi observado maior número de sinapses no grupo tratado com palmitato em relação ao controle (Figura 13D).

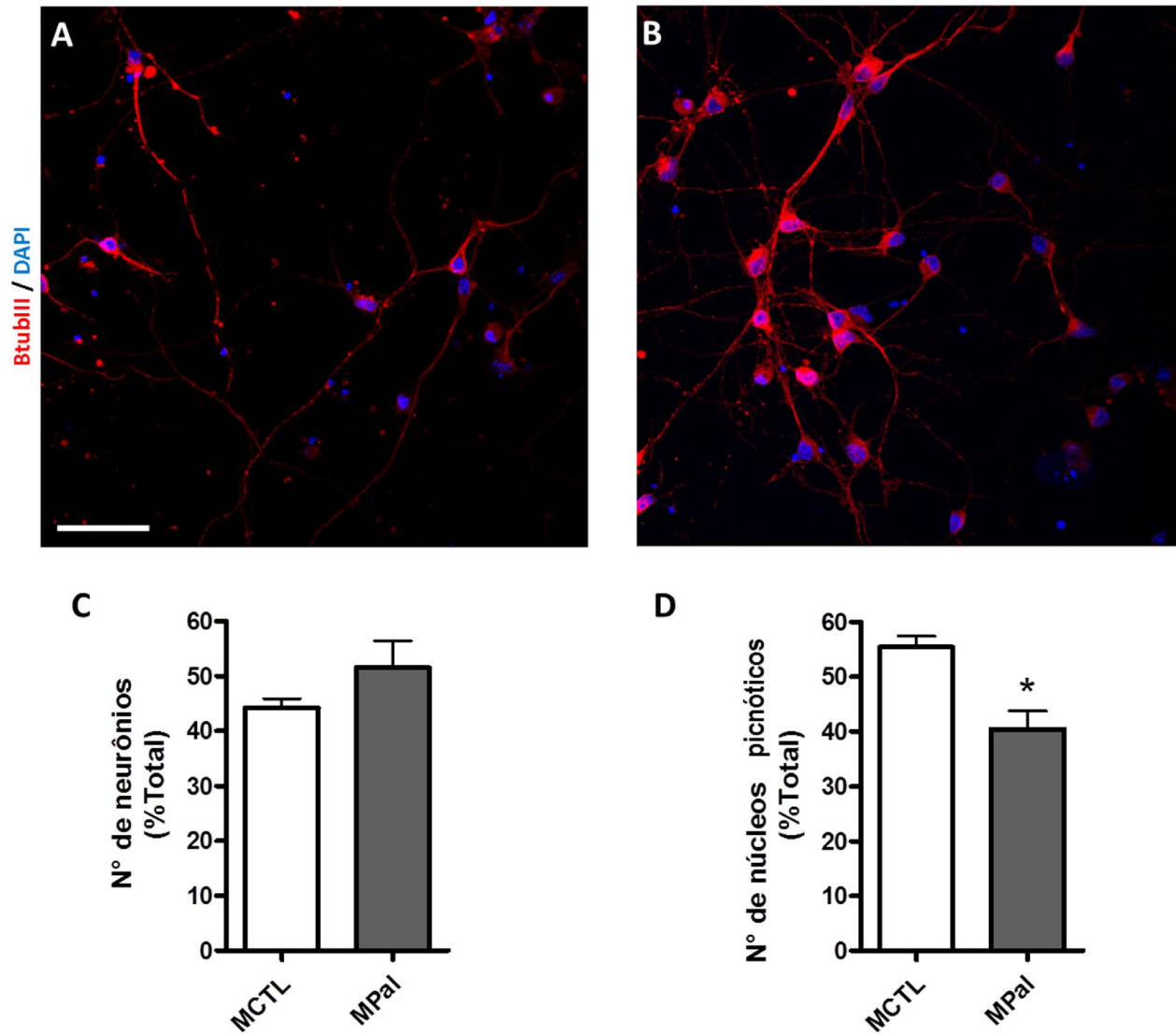
Através da imunomarcação anti- $\beta$ III-tubulina foi possível analisar a porcentagem de neurônios totais nas culturas tratadas com palmitato e o controle (Figura 14). Assim, as culturas tratadas com palmitato apresentaram maior número de neurônios quando comparadas ao controle (Figura 14C). No entanto, com maior número de células com núcleos picnóticos (Figura 14D).



**Figura 12** – Culturas primárias de neurônios hipotalâmicos tratadas com meio condicionado. Imunofluorescência anti-sinaptofisina e anti-PSD95 em culturas primárias de neurônios hipotalâmicos após uma semana de tratamento com o meio condicionado. A figura mostra o controle (A) e culturas tratadas com meio condicionado palmitato e estearato de (B e C), respectivamente. As quantificações de pontos estão apresentados nos gráficos D, E e F. Escala = 20  $\mu$ m.



**Figura 13** – Culturas primárias de neurônios hipotalâmicos tratadas com meio condicionado. Imunofluorescência anti- VGAT e anti- GABA em culturas primárias de neurônios hipotalâmicos após uma semana de tratamento com o meio condicionado. A figura mostra o controle (A) e culturas tratadas com meio condicionado palmitato e estearato de (B e C), respectivamente. As quantificações de pontos estão apresentados nos gráficos D, E e F. Escala = 20  $\mu$ m.



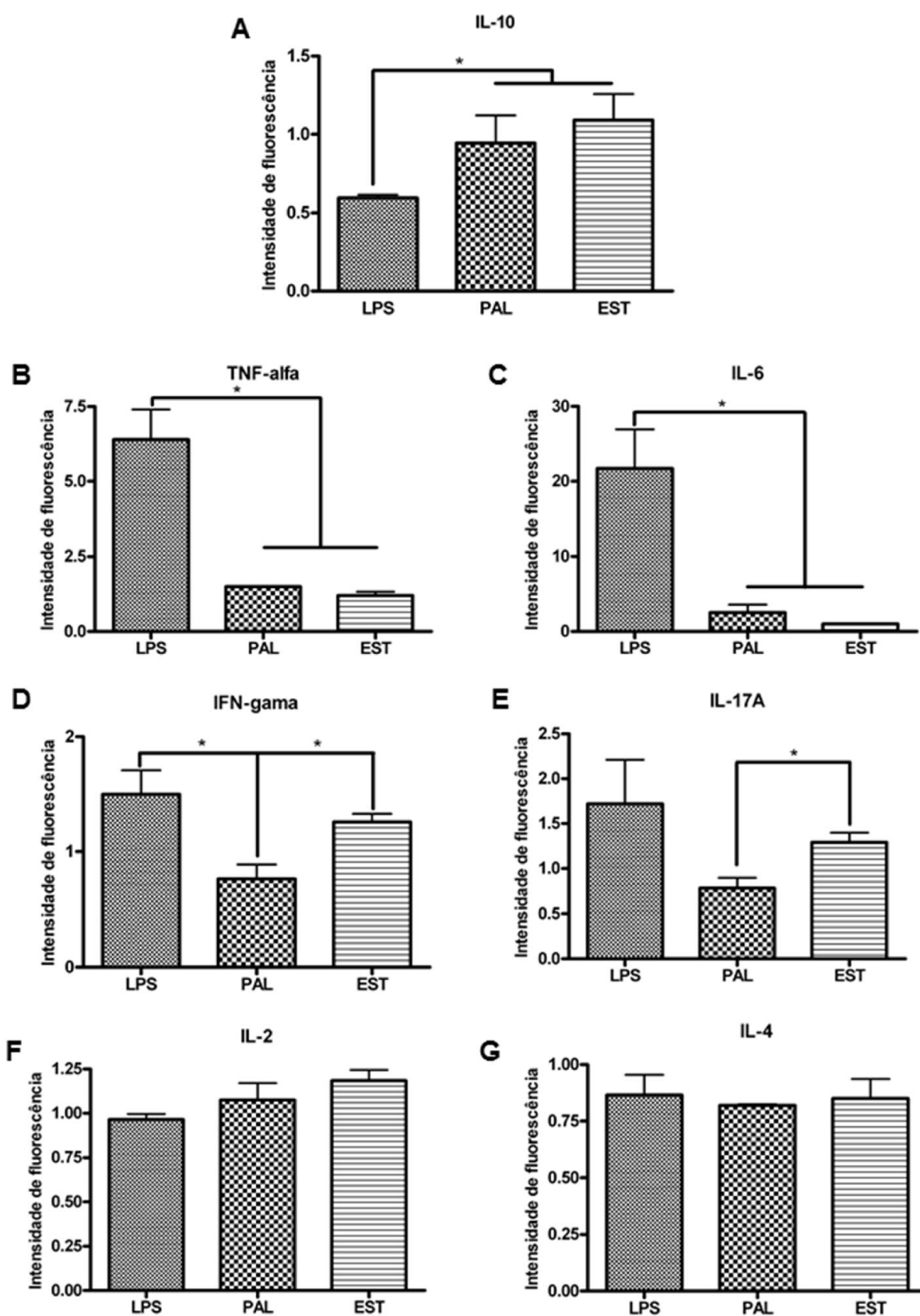
**Figura 14** – Imunofluorescência anti- $\beta$ tubIII e citoquímica para núcleo usando DAPI em culturas primárias de neurônios hipotalâmicos após uma semana de tratamento com o meio condicionado. A figura mostra o controle (A) e cultura tratada com meio condicionado palmitato (B). As quantificações de células e núcleos picnóticos estão apresentadas nos gráficos C e D. Escala 40 $\mu$ m.

### ***4.3 Variação da produção de citocinas frente aos diferentes tratamentos***

Os níveis das citocinas pró e anti-inflamatórias foram determinados por citometria de fluxo pelo método CBA em que os resultados foram analisados em relação ao controle negativo e comparados entre os grupos tratados e controle positivo (LPS).

Deste modo, a Figura 15 mostra que os níveis de IL-10, TNF-  $\alpha$ , IL-6, IFN-  $\gamma$  e IL-17A apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre as amostras tratadas e LPS, porém o mesmo não foi observado para as citocinas IL-2 e IL-4.

O tratamento com LPS estimulou a liberação de quantidades maiores de TNF- $\alpha$ , IL-6, IFN- $\gamma$  e IL-17A quando comparado às amostras tratadas com ácido graxo, sendo todas essas citocinas consideradas pró-inflamatórias. Por outro lado, a produção de IL-10, citocina anti-inflamatória, apresentou resultado significativamente maior nos grupos tratados com ácido graxo quando comparados ao grupo tratado com LPS. Não foram detectadas diferenças entre as amostras tratadas com estereato e palmitato.



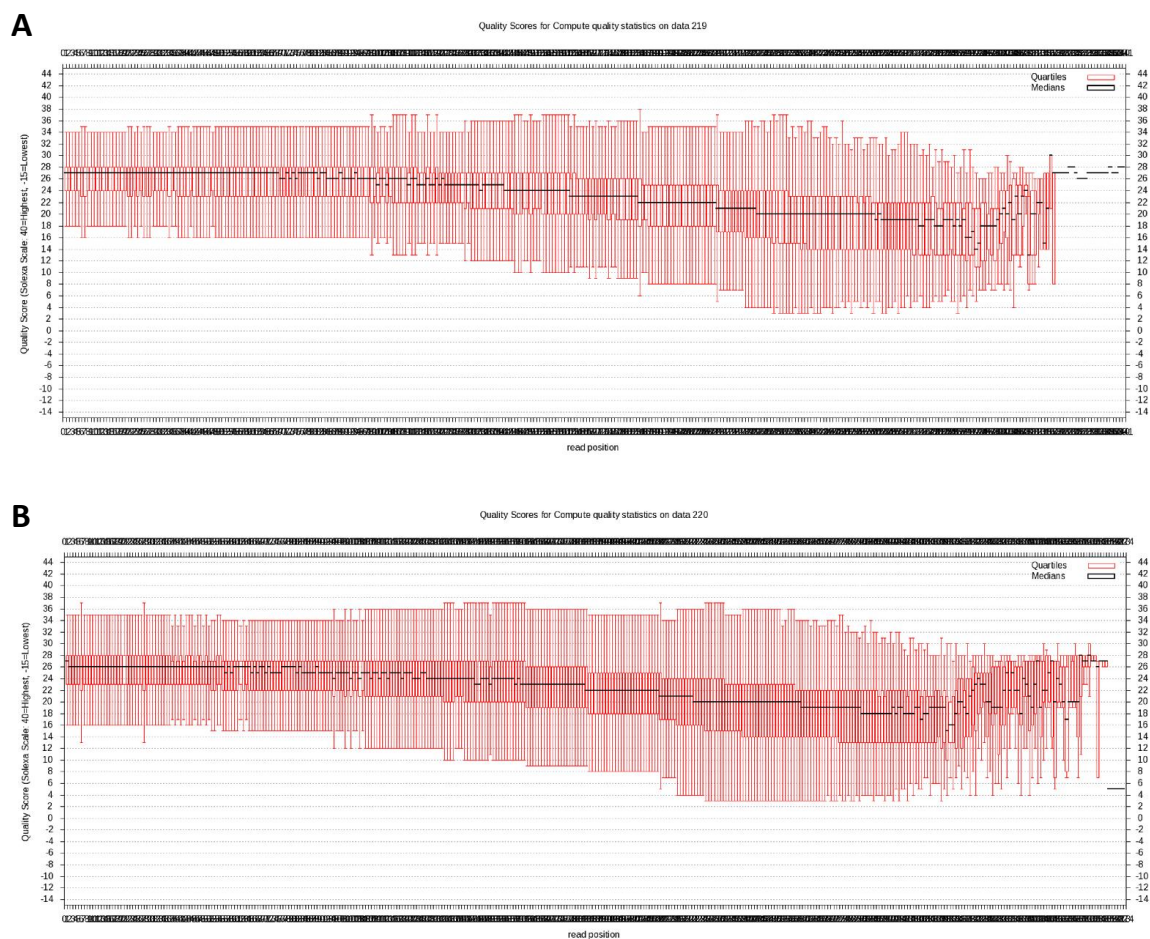
**Figura 15** – Análise do meio condicionado obtido através do tratamento de culturas primárias de astrócitos com ácidos graxos saturados e LPS. Intensidade média de fluorescência para citocinas diversas presentes nos grupos tratados e controle. **A)** IL-10; **B)** TNF-alfa; **C)** IL-6; **D)** IFN-gama; **E)** IL-17A; **F)** IL-2; **G)** IL-4.



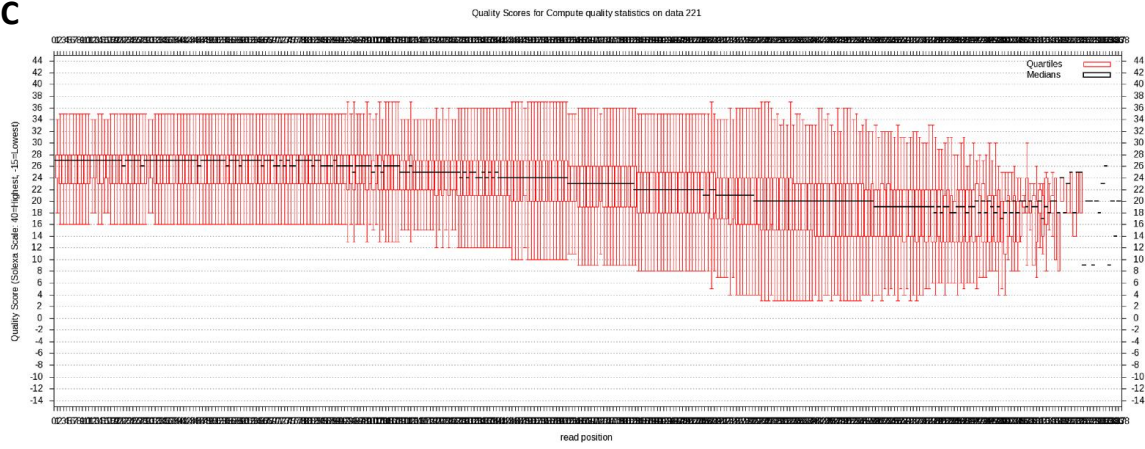
## 4.4 Sequenciamento de transcriptoma por RNA-Seq

### 4.4.1 Tratamento de qualidade das *reads* geradas

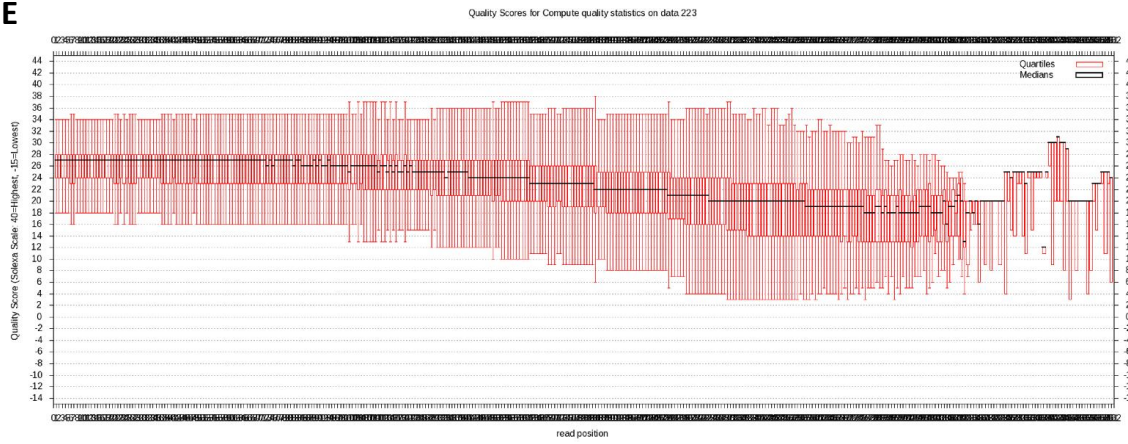
Através do programa *TopHat (Galaxy)* foi verificada a qualidade das *reads* e os dados gerados podem ser visualizados nos gráficos a seguir em que **A** e **B** representam os grupos controles, **C** e **D** grupos controle LPS, **E** e **F** grupos tratados estereato e **G** e **H** tratados palmitato. A Figura 16 mostra uma visão geral dos valores de qualidade das bases em cada posição nos arquivos gerados após o sequenciamento das bibliotecas. Assim, nota-se que a média de qualidade por base gerada para as bibliotecas foi baixa, o que interferiu no mapeamento dos genes tendo em vista que apenas as *reads* com alta qualidade (maior que 15 *Phred*) foram utilizadas para o mapeamento do genoma de referência.



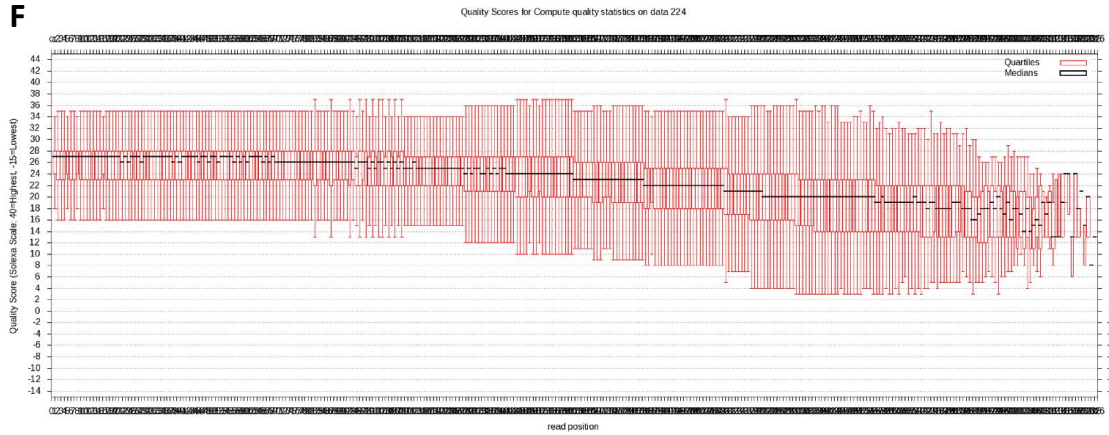
C



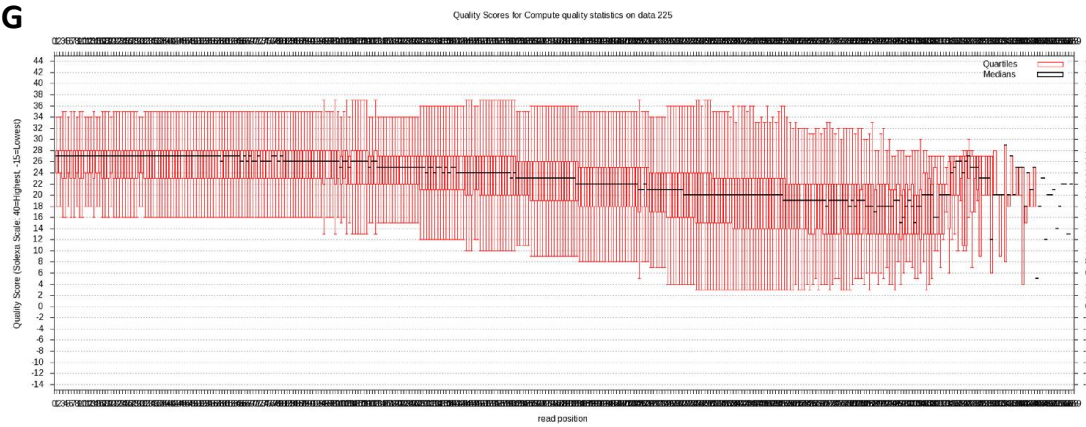
E



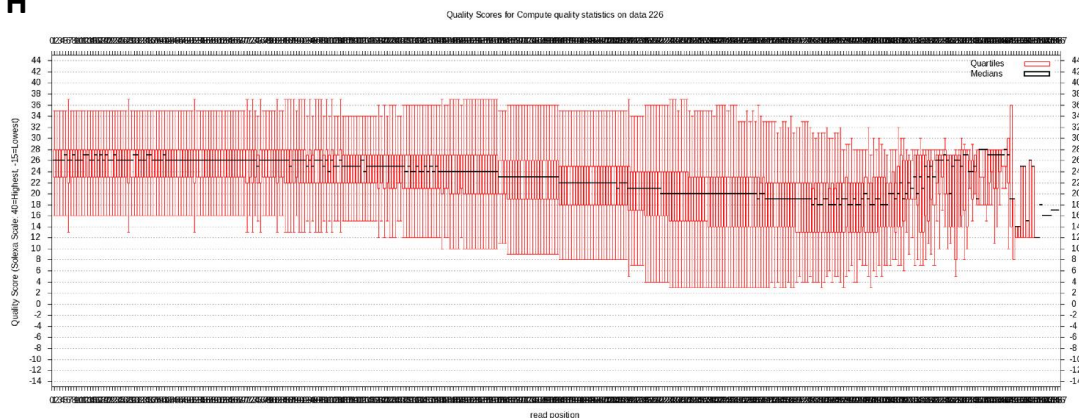
F



G



H



**Figura 16** – Diagrama de extremos e quartis mostrando o valor de qualidade por base gerados na plataforma Ion Proton™ System. Para cada posição, faixa interna representa a amplitude inter-quartil (25-75%) e a linha horizontal preta representa a qualidade.

Após a avaliação de qualidade das *reads* foi realizado um tratamento para remoção das bases de baixa qualidade (*reads* menores do que 20pb). Após este tratamento foram excluídas em média 56% das *reads* relativas às duas bibliotecas geradas. O número de *reads* contendo a sequência *leader* foi aproximado nas bibliotecas geradas. As *reads* obtidas de boa qualidade para as bibliotecas foram de apenas 44% (Tabela 6).

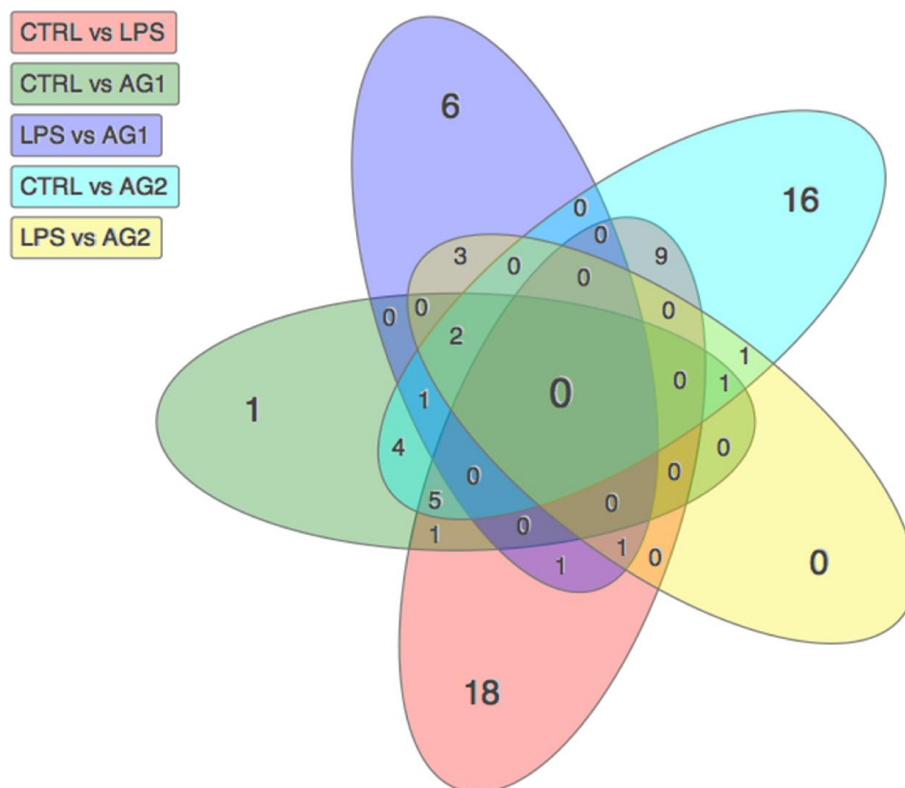
**Tabela 6** – *Reads* sequenciadas na plataforma Ion Proton™ System após tratamento de qualidade.

Amostra	<i>Reads</i> totais	<i>Reads</i> mapeadas (TopHat)	<i>Reads</i> mapeadas (%)
Controle	5.666.082	2.502.855	44,2
Controle II	8.702.857	2.834.408	32,6
Controle LPS	8.284.187	3.602.252	43,5
Controle LPS II	9.684.233	4.099.163	42,3
Tratado Estereato	11.689.013	6.732.711	57,6
Tratado Estereato II	5.144.373	2.074.174	40,3
Tratado Palmitato	12.280.934	6.710.640	54,6
Tratado Palmitato II	7.056.647	2.628.064	37,2



#### 4.4.2 Montagem do transcriptoma e análise de expressão diferencial

O programa *Cuffdiff* foi utilizado para comparar as amostras e detectar possíveis mudanças significativas na expressão diferencial para cada gene (Figura 17).



**Figura 17** – Diagrama de comparação entre as diferentes amostras. CTRL: controle; LPS; AG1: Tratado Estereato; AG2 Tratado Palmitato. Em rosa comparação entre amostras controle e LPS, em verde controle e tratado estereato, em azul LPS e tratado estereato, azul claro controle e tratado palmitato e em amarelo LPS e tratado palmitato. As intersecções de cores representam expressão diferencial significativa em comum, e a quantidade de genes é indicada pelos números.

Foram detectados 81 genes considerados diferencialmente expressos que foram comparados entre os grupos experimentais para observação do aumento ou diminuição da expressão em relação aos controles negativos e positivos. Os resultados obtidos podem ser observados na Tabela 7.

Tabela 7 – Genes diferencialmente expressos.

GENE	C x LPS	C x Pal	C x Est	LPS x Pal	LPS x Est	Pal x Est
AF357425	*	*	*	ns	ns	ns
Afap1	*	*	*	ns	ns	ns
Apoe	*	ns	ns	ns	#	*
Arhgef2	*	*	ns	ns	ns	ns
Cab39	*	*	*	ns	ns	ns
Cbx6,Npcd,Nptxr	*	*	*	ns	ns	ns
Cercam	*	*	ns	ns	ns	ns
Chpf2,Mir671	ns	ns	ns	ns	ns	#
Ckap4	ns	*	ns	ns	ns	ns
Col4a1	ns	*	*	ns	Ns	ns
Col4a5	*	*	*	ns	ns	ns
Col5a1	ns	*	ns	ns	ns	ns
Cped1	*	ns	ns	ns	ns	ns
Ctsl	ns	*	ns	ns	ns	ns
Cxcl5	ns	*	ns	ns	ns	ns
Cyp26b1	ns	*	*	ns	ns	ns
Eif3b	*	*	*	ns	ns	ns
Emp2	ns	*	ns	ns	ns	ns
Emr1	*	ns	ns	ns	ns	ns
Epb4.112	*	*	ns	ns	ns	ns
Etfb	#	*	ns	ns	ns	ns
Extl3	*	ns	ns	ns	ns	ns
F2r	ns	*	ns	ns	ns	ns
Fam168b	ns	*	ns	ns	ns	ns
Fat4	ns	ns	ns	ns	#	ns
Fgfr1	*	ns	ns	ns	ns	ns
Fosl2	ns	ns	ns	ns	#	ns
Fxyd1	ns	*	ns	*	ns	ns
Gbp4,Gbp9	*	ns	ns	ns	ns	ns
H2afx	ns	ns	ns	ns	*	ns
Hcfc1	*	ns	ns	ns	ns	ns
Hs6st2	ns	*	ns	ns	ns	ns
Hspa8	ns	ns	ns	#	#	ns
Igdcc4	*	ns	ns	ns	ns	ns
Jag1	*	ns	ns	ns	ns	ns
Klhl13	ns	*	ns	ns	ns	ns
Lhfpl2	ns	*	ns	ns	ns	ns
Mef2d	ns	*	ns	ns	ns	ns
Mir125a,Spaca6	*	ns	ns	ns	#	ns
Mir6901,Sned1	*	ns	ns	#	#	ns
Mir705,Rab11fip5	*	ns	ns	#	#	ns
Mir719,Nupl1	#	ns	ns	*	#	ns
Mir8097,Rnf19a	ns	ns	ns	*	ns	*
Mmp3	ns	ns	ns	ns	#	ns
Mpeg1	*	ns	ns	ns	ns	ns
Mtss1l	*	ns	ns	ns	ns	ns
Myh10	*	ns	ns	ns	ns	ns
Myl12a	ns	*	ns	ns	ns	ns
Myo18a	*	ns	ns	ns	ns	ns

Ndufa7	#	*	*	ns	ns	ns
Ndufb7	#	ns	ns	ns	ns	ns
Nfic	*	*	ns	ns	ns	ns
Nfix	*	*	ns	ns	ns	ns
Ptprs	*	ns	ns	ns	ns	ns
Rabggtb,Snord45c	ns	*	ns	ns	ns	*
Rbm33	*	ns	ns	ns	ns	ns
Rgma	ns	*	ns	ns	ns	ns
Rin1	ns	ns	ns	ns	#	ns
Rpl5	*	ns	ns	#	#	m
Rpn1	*	*	ns	ns	ns	ns
Rps21	ns	*	*	ns	ns	ns
Scarna3a	ns	*	ns	ns	ns	ns
Sdha	*	ns	*	ns	ns	ns
Sfrp1	*	ns	ns	ns	ns	ns
Slc39a14	*	ns	ns	ns	ns	ns
Slc7a11	ns	*	*	ns	ns	ns
Snora64	ns	*	*	ns	#	ns
Snord100	ns	*	*	#	ns	ns
Snord123	ns	*	*	ns	#	ns
Snord35b	ns	ns	ns	#	#	ns
Snord4a	ns	ns	ns	ns	#	ns
Snord87	ns	ns	ns	#	#	ns
Sod2	*	ns	ns	ns	ns	ns
Tnks1bp1	ns	*	ns	ns	ns	ns
Trim25	*	ns	ns	ns	ns	ns
Trim7	*	ns	*	ns	ns	ns
Ube4b	ns	*	ns	ns	ns	ns
Unc119	ns	ns	*	ns	ns	ns
Zcchc24	ns	*	ns	ns	ns	ns

ns: não significativo; (\*): aumento da expressão; (#): diminuição da expressão.

Analisando a tabela acima, observou-se que para alguns genes o tratamento com ácido graxo apresentou respostas semelhantes às culturas tratadas com LPS quando são comparadas ao controle (C). Nessa situação, notamos o aumento da expressão dos genes af357425, afap1, cab39, cbx6, col4a5 e eif3b. No entanto, um maior número de genes apresentou um padrão de expressão diferente entre as culturas tratadas com LPS e ácido graxo quando ambas são comparadas ao controle. Nesse tipo de resposta se enquadram os seguintes genes: cped1, emr1, extl3, fgfr1, gbp4, gbp9, igdcc4, jag1, mpeg1, mtss1l, myh10, myo18a, rbm33, sfrp1, slc3914, sod2, trim25 (aumentados somente no LPS); col4a1, cyp26b1, F2r, fam168b, rps21, rgma, slc7a11, snora64, snord100, snord123 (aumentados nos tratamentos com ácidos graxos). E, ainda, comparando as respostas diferenciais entre as culturas tratadas com LPS e com ácido graxo temos uma diminuição da expressão dos genes hspa8, mir705, mir6901, rpl5, snord35b e snord87.

A fim de facilitar a compreensão a cerca dos mecanismos relacionados à resposta das culturas astrocitárias aos tratamentos com ácido graxo, a Tabela 8 apresenta os genes agrupados de acordo com suas principais características e funções biológicas. Esta organização permitiu melhor avaliar as características funcionais de cada gene e selecionar aqueles de maior relevância, de acordo com o tema tratado, para serem discutidos abaixo.

**Tabela 8** – Genes agrupados de acordo com os principais processos biológicos aos quais participam da regulação.

Relação de processos biológicos associados aos genes									
Apoptose	Regulação da expressão gênica	Síntese de proteínas de membrana /transporte	Síntese de proteínas da matriz extracelular	Resposta Inflamatória	Adesão celular	Síntese de proteínas reguladoras da respiração celular	Componentes do retículo endoplasmático	Regulação e síntese proteica	Fenótipo não identificado
Afap1	AF357425	Emp2	Chpf2	Afap1	Cercam	Etfb	Ckap4	Cab39	Mir125a,Spaca6
F2r	Fgfr1	Emr1	Col4a1	Arhgef2	Fat4	Ndufa7	Cped1	Gene Cbx6	Scarna3a
Myo18a	H2A	Fxyd1	Col4a5	Apoe	Fgfr1	Ndufb7	Rpn1	Ctsl	Snord35b
Sfrp1	Hcfc1	Igdcc4	Col5a1	Cxcl5		Sdha		Eif3b	Snord123
	Mef2d	Jag1	Extl3	Cyp26b1		Zcchc24		Fosl2	
	Nfic	Lhfp12	Hs6st2	F2r				klhl13	
	Nfix	Slc39a14	Mmp3	Fam168b				Mir8097,Rnf19a	
	Rabggtb	Slc7a11		Gbp4,Gbp9				Rbm33	
	Snord45c			Sfrp1				Rpl5	
	Tnks1bp1			Trim25				Rps21	
				Unc119				Snora64	
				Cxcl5				Snord100	
				F2r				Snord4a	
				Hspa8				Snord87/ Ube4b	



## **5. DISCUSSÃO**

O hipotálamo neuroendócrino é constituído por uma matriz complexa de fenótipos neuronais distintos, cada um expressando um conjunto específico de neuropeptídeos, neurotransmissores e receptores (Everitt e Hokfelt, 1990), responsável pela regulação do balanço energético e do metabolismo da glicose. Neste trabalho, através de revisão bibliográfica, mostramos que a inflamação hipotalâmica aparentemente é a principal causa da obesidade (Kälin *et al.*, 2015; Valdearcos *et al.*, 2015).

Nesse contexto, mediante a dieta hiperlipídica, vias inflamatórias são ativadas em áreas do hipotálamo que exercem controle central sobre a glicose, gordura e o metabolismo energético. Em particular, a inflamação ocorre no hipotálamo mediobasal (MBH), que contem o núcleo arqueado (ARC) (Hundal *et al.*, 2002). A disfunção neuronal está associada com a reatividade imune inata gerada pela interação entre os neurônios e outras populações de células no hipotálamo durante as mudanças metabólicas geradas pelo ambiente hiperlipídico (Kälin *et al.*, 2015). A resposta reativa é caracterizada pela glia com secreção de citocinas e aumento dos níveis de sinais intracelulares inflamatórios (Michelucci *et al.*, 2015).

Tendo em vista que o mais abundante componente da glia do SNC são os astrócitos e a variedade funcional e plasticidade dessas células, nosso estudo buscou compreender o envolvimento dos astrócitos nesse ambiente rico em ácidos graxos (AGs). Como desenvolvimento do processo de investigação, buscamos padronizar culturas primárias de neurônios hipotalâmicos a fim de melhor avaliarmos a interação desses com substâncias produzidas por astrócitos tratados com AGs. Algumas metodologias experimentais aplicadas em pesquisas relacionadas à inflamação hipotalâmica usam embriões mais maduros para a obtenção da cultura primária (Belsham *et al.*, 2015; Bélanger *et al.*, 2011; Burcelin *et al.*, 2003), porém em nossas experiências, estabelecemos o período gestacional E12-E14 como a melhor fase para a aquisição de culturas com boa qualidade em termos de morfologia e desenvolvimento dos neurônios. Entretanto, durante o desenvolvimento e domínio deste procedimento diversos problemas técnicos limitaram a evolução do processo investigativo.

O fornecimento de animais para a obtenção das culturas foi relativamente restrito devido a grande demanda enfrentada pelo CBEA/UFU e o longo período de espera entre a aquisição, cruzamento e gestação dos animais. Durante este mesmo período, a universidade passou por reformas nas suas instalações elétricas, que causaram quedas constantes no abastecimento de energia, prejudicando a manutenção das culturas na incubadora, fazendo com que esta permanecesse por horas fora da temperatura ideal, ocasionando a morte dos neurônios e tornando a cultura inviável. Subsequentemente, os equipamentos foram

danificados e permaneceram cerca de nove meses em conserto, o que dificultou ainda mais a continuidade dos experimentos.

Com isso, apesar do desenvolvimento do domínio da técnica e a produção de meio condicionado tratado com ácido graxo, LPS e controle, não foi possível concluir os tratamentos das culturas de neurônios para análise imunocitoquímica. Os resultados aqui apresentados foram obtidos durante o período de aprendizagem da técnica de obtenção de culturas primárias de neurônios hipotalâmicos realizado na UFRJ. Deste modo, foram avaliados aspectos na quantificação da densidade sináptica e morte celular *in vitro*, através de imunocitoquímica, de culturas de neurônios hipotalâmicos após adição de meio de cultura condicionado em culturas purificadas de astrócitos tratados com ácidos graxos de cadeia longa em comparação a cultura controle. Durante este período, o grupo ainda não havia acrescentado o controle positivo LPS.

Esses resultados mostraram um decréscimo na densidade sináptica das culturas de neurônios hipotalâmicos tratadas com estereato e palmitado, especialmente em relação às sinapses excitatórias, sugerindo que o tratamento com o meio condicionado de astrócitos interfere na plasticidade sináptica *in vitro*. A plasticidade sináptica é a capacidade dos neurônios em alterar a quantidade e intensidade de suas sinapses, no entanto, os astrócitos apresentam também a capacidade de modular vários aspectos das sinapses, tendo em vista que, fazem contatos com sítios sinápticos onde liberam fatores solúveis que podem aumentar o número de sinapses, fornecem isolamento sináptico restringindo a propagação de neurotransmissor para as sinapses vizinhas e liberam compostos neuroativos que podem influenciar diretamente a transmissão sináptica (Barker e Ullian, 2010). Adicionalmente, astrócitos reativos, como observamos em nossas células *in vitro* e tratadas com AGs, são antigenicamente semelhantes aos astrócitos imaturos, sugerindo que seriam capazes de voltar a expressar muitos dos mesmos sinais que promovem a formação e eliminação de sinapses durante o desenvolvimento do Sistema Nervoso (Stevens *et al.*, 2007). Nessa mesma direção, outra contribuição dos astrócitos reativos para a regulação da função sináptica é a produção de fatores tróficos, moléculas da matriz extracelular e sinais que promovem a limpeza de proteínas tóxicas, como a proteína beta-amiloide, e ainda, por auxiliarem a fagocitose de axônios em degeneração (Wyss-Coray *et al.*, 2001)

Esses fatores neurotróficos podem ainda contribuir para o resgate ou proteção de neurônio *in vitro* (Eriksen e Druse, 2001; Hailer *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 1998; Wang e Cynader, 1999). Nossos resultados mostraram uma diminuição de núcleos picnóticos (indicativos de morte celular) nas culturas tratadas com meio condicionado em relação ao

controle, o que sugere maior sobrevivência das células em cultura. Fatores tróficos ou de crescimento seriam responsáveis por esse efeito neuroprotetor. Nesse sentido, os fatores NGF, BDNF e GDNF (Bruno *et al.*, 2001; Mizuta *et al.*, 2001), o fator de crescimento de fibroblastos-2 (Albrecht *et al.*, 2002) e citocinas inflamatórias (Eskes *et al.*, 2002; D'Onofrio *et al.*, 2001; Pavelko *et al.*, 2003) mostram capacidade de proteção de células nervosas.

Citocinas são os principais agentes da cascata neuroinflamatória (Rothwell e Hopkins 1995; Rothwell 1999; Allan e Rothwell 2003). As citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 estão envolvidas na patogênese de doenças neurodegenerativas e traumatismo encefálico. Em contraste, as citocinas anti-inflamatórias TGF- $\beta$ 1, IL-4 e IL-10 reduzem o potencial de lesão por regulação negativa das citocinas pró-inflamatórias e estimulam a reparação de tecidos (Ledeboer *et al.*, 2000; Vitkovic *et al.*, 2001). Portanto, o equilíbrio da interação molecular entre citocinas pró e anti-inflamatórias determina o resultado da resposta imune (Mahmoud *et al.*, 2013). Conduzindo respostas de degeneração se citocinas pró-inflamatórias estão excessivas, enquanto, a maior quantidade de citocinas anti-inflamatórias está associada com a susceptibilidade a infecções sistêmicas (Munoz *et al.*, 1991; Kasai *et al.*, 1997).

A função imune dos astrócitos é reconhecida tendo em vista que são uma fonte abundante de citocinas e de outros mediadores inflamatórios na lesão cerebral e infecção (Dong e Benveniste, 2001; Gorina *et al.*, 2009; Sofroniew e Vinters, 2010). Deste modo, foi nosso interesse avaliar o perfil das citocinas produzidas pelos astrócitos sob os tratamentos com AGs. A estimulação dos astrócitos com o tratamento LPS mostrou aumentar a produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-6 e IFN- $\gamma$ ), concordando com relatos anteriores (Lu *et al.*, 2010; Gorina *et al.*, 2011). Nossos resultados mostraram ainda que, no que diz respeito à manutenção do equilíbrio de citocinas, o tratamento de ácidos graxos saturados em astrócitos apresentou valores reduzidos de citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-6 e aumento da citocina anti-inflamatória IL-10 em relação ao tratamento com LPS.

TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-6 mostraram um perfil mais inflamatório para as repostas dos astrócitos tratados com LPS. No entanto, vale destacar que, a quantificação realizada para nível de fluorescência foi relativa à emissão controle (sem tratamento), assim sendo, as culturas tratadas com AGs também mostraram aumento da expressão dessas citocinas, porém em menor intensidade do que as células tratadas com LPS. Mostrando, portanto, que os astrócitos podem sim influenciar o processo inflamatório hipotalâmico.

A ligação entre a citocina TNF- $\alpha$  e obesidade foi estabelecida há duas décadas em estudos do tecido adiposo, no qual, o bloqueio à sinalização de TNF melhorou a sensibilidade à insulina em ratos obesos (Hotamisligil *et al.*, 1993). Em um estudo anterior do nosso grupo,

foi mostrado que os astrócitos hipotalâmicos frente aos altos níveis de ácidos graxos intensificaram a expressão de NFκB e a produção de TNF-α como também mostrado por Gupta *et al.* (2012). O IFN-γ, que também mostrou níveis diferentes para os tratamentos com LPS e AGs, produz muitos dos seus efeitos biológicos através da ativação da via de JAK-STAT-NFκB, embora outras vias possam ser ativadas (Cho *et al.*, 2007; Gough *et al.*, 2008). Já a IL-6 pode promover efeitos pró ou anti-inflamatórios, dependendo das circunstâncias do ambiente (Valdearcos *et al.*, 2015). Esta exerce efeitos neurotróficos e neuroprotetores e ainda pode funcionar como um mediador da inflamação, desmielinização e astrogliose, dependendo do contexto celular. Avaliações anteriores determinaram que a fonte predominante de IL-6 no SNC é de astrócitos ativos (Van Wagorner e Benveniste, 1999).

Dentre os resultados em relação aos níveis de citocinas, foi interessante a alta concentração da IL-10 no meio condicionado de astrócitos tratados com ácidos graxos. Em Ropelle *et al.* (2010) observou-se que a infusão de IL-10 recombinante no terceiro ventrículo promoveu a restauração da homeostase energética nos ratos obesos mediante a anulação do estresse de retículo, bloqueando a ativação IKKβ, e a fosforilação STAT3. Adicionalmente, Valdearcos *et al.* (2015) sugerem ainda a IL-10 como um alvo potencial para pesquisas relacionadas à inflamação hipotalâmica induzida por dieta.

Relembrando que é o equilíbrio entre citocinas anti e pró-inflamatórias modula as respostas imunes, podemos considerar que os astrócitos estimulados com ácidos graxos *in vitro* contribuíram com a manutenção desse equilíbrio, regulando de forma mais suave a expressão de citocinas pró-inflamatórias e, concomitantemente, aumentando de forma mais intensa a síntese de IL-10. Podemos sugerir um possível mecanismo protetor para os astrócitos nessa situação como também já foi sugerido por Hamby e Sofroniew (2010), sendo que para esses autores, os astrócitos realizam uma regulação negativa da resposta inflamatória que protege os neurônios de citocinas pró-inflamatórias excessivas.

Para uma análise mais abrangente das respostas dos astrócitos diante à adição de AGs recorreremos à técnica RNAseq que verificou os genes diferencialmente expressos entre os grupos de culturas de astrócitos. Nossos resultados apontaram a expressão diferenciada de poucos genes por motivos implícitos ao tempo de coleta e extração do RNA total das amostras após tratamento e, diante disso, procurou-se estudar cada gene diferencialmente expresso, e, quando este, com seu papel biológico, mostrou ter potencial para dar suporte à participação dos astrócitos na inflamação ou na neuroproteção, para esses genes, realizamos buscas na literatura científica de forma mais aprofundada. Dessa forma, os próximos parágrafos tratam desses genes, lembrando que em nossos resultados tivemos genes

diferencialmente expressos em relação ao controle, sendo, nesse caso, os tratamentos com AGs e LPS com respostas semelhantes ou respostas diferentes entre si.

Primeiramente verificamos as semelhanças entre os tratamentos com AGs e LPS. Temos, assim, o aumento da expressão dos genes Afap1 (*Actin filament associated protein 1*), Cab39 (*Calcium-binding protein 39*) e Col4a5 (*Collagen, type IV, alpha 5*) que foram associados à possível atividade protetora dos astrócitos.

A proteína codificada pelo gene Afap1 é parceira de ligação a Src quinase que desempenha um papel fundamental na diferenciação, proliferação e sobrevivência celular (Brown e Cooper, 1996). Pouco se conhece sobre a função das AFAPs no sistema nervoso. Estudos indicam que AFAPs são amplamente expressas no cérebro e cerebelo em desenvolvimento, porém diminuem no cérebro adulto, permanecendo elevadas apenas em regiões que se submetem a neurogênese contínua, sugerindo um papel na diferenciação de neurônios (Clump *et al.*, 2003). Harder *et al.* (2008) sugerem ainda que AFAP possa ser uma das proteínas de ligação cruzada à actina que regulam o crescimento dinâmico do cone de actina em resposta a atividade de Src.

O gene cab39 codifica a proteína que é componente de um complexo que se liga e ativa LKB1 (*Liver kinase B1*) sendo requerida para estabilizar a interação entre CAB39/LKB1 (Zequiraj *et al.*, 2009). LKB1 é uma proteína quinase serina/treonina que fosforila e ativa diretamente a proteína quinase adenosina-monofosfato (AMPK - Boudeau *et al.*, 2003). A AMPK desempenha um papel regulador da homeostase energética celular controlando o metabolismo dos lipídeos e da glicose em resposta a alterações nos níveis de energia e nutrientes celulares (Shackelford e Shaw, 2009). A ativação da AMPK no cérebro tem sido associada à sobrevivência em resposta a diferentes tipos de estresse, incluindo a depleção de glicose, estresse oxidativo gerado pela proteína  $\beta$  amiloide e ao glutamato (Culmsee *et al.*, 2001). Adicionalmente, LKB1 se mostrou essencial para manter a função e polaridade normal de um subconjunto crucial de neurônios no cérebro (Sun *et al.*, 2010). Shaw *et al.* (2004) mostraram ainda que LKB1 é essencial para proteger as células da apoptose em resposta a agentes que elevam AMP intracelular tendo em vista que células deficientes em LKB1 se mostram hipersensíveis à apoptose induzida por stress energético.

O gene Col4a5 codifica uma das seis subunidades da proteína colágeno alfa do tipo IV que é um dos principais componentes das membranas basais (Khoshnoodi *et al.*, 2008), um dos elementos da matriz extracelular, apresentando-se como regulador importante da morfogênese, crucial para a regulação da adesão, migração e sobrevivência de diversos tipos celulares (Ortega e Werb, 2002). O gene Col4a1 (*Collagen, type IV, alpha 1*) também codifica

a proteína colágeno do tipo IV, e apresentou expressão diferencial para o tratamento com ácidos graxos. Astrócitos reativos expressam uma variedade de fatores e proteínas necessárias para a remodelação do tecido em torno do local da lesão, que têm papel direto na modulação da matriz extracelular (Sofroniew e Vinters, 2010). Liesi e Kauppila (2001) mostraram que astrócitos expressam e depositam colágeno tipo IV na matriz extracelular quando são induzidos por citocinas e TGF-1 $\beta$ , sugerindo a participação do colágeno na formação da cicatriz glial após a lesão da medula espinhal de ratos. A matriz de colágeno formada após lesão cerebral traumática em ratos revelou reduzir o volume da lesão, a perda neuronal e o déficit cognitivo (Shin *et al.*, 2015). Além disso, colágeno tipo IV induz a expressão de trombospondina-1 (TPS-1) em astrócitos reativos após lesão cerebral (Yonezawa *et al.*, 2010), sendo que TSP-1 está envolvida na angiogênese e recuperação sináptica (Christopherson *et al.*, 2005).

Assim como o gene *col4a1*, os genes *Cyp26b1* (*Cytochrome P450, family 26, subfamily B, polypeptide 1*), *Ndufa7* (*NADH dehydrogenase ubiquinone 1 alpha subcomplex, 7*) e *Slc7a11* (*Solute carrier family 7, anionic amino acid transporter light chain, Xc, member 11*) apresentaram aumento na expressão apenas para o tratamento com AGs quando comparados ao LPS.

*Cyp26b1* codifica um membro da superfamília do citocromo P450. As proteínas monooxigenases do citocromo P450 estão envolvidas em muitas reações que catalisam o metabolismo de drogas, síntese de colesterol, esteróides e outros lipídeos (Berka *et al.*, 2011). As isoformas do P450 foram determinados em astrócitos humanos e de ratos e foram consideradas funcionalmente ativas (Malaplate *et al.*, 2004). O citocromo P450 está envolvido em várias funções do cérebro, tais como a síntese de neuroesteróides, o metabolismo do ácido araquidônico (AA) ou o metabolismo de xenobióticos e especialmente de substâncias psicoativas (Kapitulnik e Strobel, 1999). Deste modo, acredita-se que o citocromo P450 expressos nos astrócitos desempenham um papel no metabolismo do cérebro e na neuroproteção (Malaplate *et al.*, 2004).

O gene *ndufa7* codifica uma subunidade do Complexo I (CI) que é o primeiro complexo do sistema de fosforilação oxidativa mitocondrial que catalisa a transferência de elétrons a partir da oxidação do NADH para a ubiquinona (Ugalde *et al.*, 2004). Deficiências no CI da cadeia respiratória são causas frequentes de doenças mitocondriais e têm sido associadas a doenças neurodegenerativas (Schapira e Orth, 2001). A inibição parcial do CI em terminais nervosos mostrou-se ser suficiente para as mitocôndrias *in situ* gerarem mais espécies reativas de oxigênio (ROS) (Tretter *et al.*, 2004), sendo que vários estudos têm

demonstrado que o estresse oxidativo é uma importante evidência envolvida na patogênese das doenças neurodegenerativas (Schapira, 1999; Giasson *et al.*, 2002). Assim, a inibição do CI mostrou afetar a cadeia transportadora de elétrons, resultando na geração de ROS inerentemente superior em neurônios dopaminérgicos e que, ao longo do tempo, podem levar ao estresse oxidativo e ao déficit de ATP, acabando por resultar em morte celular (Tretter *et al.*, 2004).

O principal antioxidante celular glutatona (GSH) é uma linha de defesa importante contra o estresse oxidativo, e a sua deficiência pode lesionar o cérebro (Mizui *et al.*, 1992; Bobyn *et al.*, 2002). A síntese de GSH é limitada pela disponibilidade da cisteína, a qual é facilmente oxidada em cistina no meio extracelular do cérebro (Miura *et al.*, 1992). O transportador cistina-glutamato, denominado Xc(-), medeia a entrada de cistina em troca de glutamato intracelular em células de mamíferos e é composto de uma subunidade de cadeia leve (xCT, codificada pelo gene *Slc7a11*) (Mastroberardino *et al.*, 1998). A expressão basal da subunidade xCT é mais elevada na barreira hematoencefálica e no fluido cerebrospinal (CSF), sugerindo um papel de tamponamento redox no plasma e CSF (Sato *et al.*, 2002), sendo que este também é expresso em neurônios e astrócitos do córtex cerebral (Melendez *et al.*, 2005; Burdo *et al.*, 2006). Estudos *in vitro* têm mostrado que a atividade Xc(-) pode existir em astrócitos maduros e neurônios imaturos (Murphy *et al.*, 1990; Schubert e Piasecki, 2001; Lewerez *et al.*, 2003). Os resultados de Shin *et al.* (2006) indicaram que xCT pode fornecer neuroproteção, aumentando a exportação glutatona a partir de células não neuronais, tais como astrócitos. Assim, podemos sugerir que o aumento da expressão do gene *ndufa7* e *slc7a11* identificado no RNAseq pode estar associado com a tentativa da regulação da produção de ROS e controle do estresse oxidativo.

Coletivamente, de acordo com os papéis biológicos associados à expressão dos genes *Afp1*, *Cab39*, *Col4a5*, *Cyp26b1*, *Ndufa7* e *Slc7a11* sugere um papel neuroprotetor da resposta modulada pelos astrócitos frente ao tratamento com ácidos graxos.

O tratamento com palmitato apresentou o aumento da expressão de um número relativo de genes em relação ao controle que não foram observados no tratamento com estereato e diferente da resposta ao LPS tais como os genes *F2r* (*Coagulation factor II (thrombin) receptor*), *Fam168b* (*Family with sequence similarity 168, member b*) e *Rgma* (*Repulsive guidance molecule a*). Estes genes estão respectivamente relacionados a processos inflamatórios (Huang e Karparkin, 2000; Niessen *et al.*, 2008), regulação da apoptose (Matsunaga *et al.*, 2004) e modulação do crescimento axonal neuronal (Mishra e Heese, 2011).



Diferentemente dos outros resultados apresentados, o gene Hspa8 (*Heat shock 70kDa protein 8*) apresentou redução nos tratamentos com ácido graxo em comparação ao LPS. Este gene codifica a proteína de choque térmico 70 (Hsp70) que possui funções que podem estar associadas ao câncer, doenças neurodegenerativas e diabetes (Mayer e Bukau, 2005; Bruce *et al.*, 2003). A Hsp70 apresenta ação moduladora sobre a resposta imunológica (Johnson & Fleshner, 2006) em doenças crônicas como o diabetes, a obesidade e a resistência insulínica (Chung *et al.*, 2008; Rodrigues-Krause e Krause., 2012). A diminuição da expressão de Hsp70 parece ser um fator primário que leva ao desenvolvimento de diabetes tipo 2 (Bruce *et al.*, 2003). Portanto, a diminuição da expressão de Hsp70 nos nossos resultados aponta diretamente uma resposta do astrócito no envolvimento com a patogênese da inflamação e diabetes, estando, nesse caso, contribuindo com as doenças.

Frente ao conjunto de respostas celulares analisadas nesse trabalho podemos dizer que os astrócitos hipotalâmicos não permanecem inertes ao excesso de ácidos graxos em seu microambiente, respondendo com aumento de atividade que, aparentemente, apesar de envolvida, por um lado, com as vias inflamatórias e morte celular, por outro lado, parece ter papel de controlar a nocividade das substâncias inflamatórias, promovendo, portanto, neuroproteção. Apesar disso, novas etapas de investigação ainda serão realizadas: 1) analisar o conjunto de metabólitos presentes no meio condicionado e 2) melhor caracterizar a expressão diferencial dos genes frente ao tratamento com ácidos graxos, através do sequenciamento de RNA num momento mais precoce do tratamento (entre 12-24 horas) respeitando a meia-vida do RNAm. Assim, a continuidade da pesquisa nos levará à melhor compreensão tanto de nossos resultados atuais como dos mecanismos neuroprotetores e interação neurônio-glia no hipotálamo frente à 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.

## **6. CONCLUSÕES**

- A padronização das culturas primárias de neurônios hipotalâmicos em nosso laboratório obteve sucesso com a utilização do protocolo realizado na UFRJ, porém, as melhores idades gestacionais para os embriões foram E12-E14.
- O tratamento com o meio condicionado de astrócitos interferiu na plasticidade sináptica *in vitro* através da redução da densidade sináptica total, especialmente afetando as sinapses excitatórias.
- O número de neurônios foi semelhante entre os tratamentos, porém, com a presença de um menor número de núcleos picnóticos com o tratamento de ácidos graxos, indicando, possível ação neuroprotetora dos astrócitos.
- O perfil de expressão de citocinas aponta ação pró-inflamatória e, ao mesmo tempo, anti-inflamatória dos astrócitos tratados com ácidos graxos. Mostrando uma tentativa de controle do equilíbrio de citocinas no microambiente celular.
- O tratamento com estereato e palmitato mostrou aumentar a atividade gênica e induzir a resposta inflamatória, porém de menor intensidade em relação ao LPS. Alguns genes relacionados com neuroproteção também foram mais expressos por astrócitos tratados com ácido graxo.
- O conjunto dos resultados sugere um papel ativo dos astrócitos frente à inflamação induzida pelo excesso de ácidos graxos participando da modulação da resposta inflamatória, aparentemente, com efeitos neuroprotetores.

## **7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. ALBRECHT, P. J.; *et al.* Ciliary neurotrophic factor activates spinal cord astrocytes, stimulating their production and release of fibroblast growth factor-2, to increase motor neuron survival. **Exp. Neurol.**, v. 173, p. 46–62, 2002.
2. ALLAN, S. M.; ROTHWELL, N. J. Inflammation in central nervous system injury. **Biol. Sci.**, v. 358, p. 1669-1677, 2003.
3. ALDSKOGIUS, H., LIU, L., SVENSSON, M. Glial responses to synaptic damage and plasticity. **J. Neurosci. Res.**, vol.58, pp.33-41, 1999.
4. ANDY, Y. S.; *et al.* Cystine/Glutamate Exchange Modulates Glutathione Supply for Neuroprotection from Oxidative Stress and Cell Proliferation, **Journal of Neuroscience**, v. 26, p. 514-523, 2006.
5. ASADA, H.; *et al.* Time course of ciliary neurotrophic factor mRNA expression in coincident with the present of protoplasmic astrocytes in traumatized rat striatum, **J. Neurosci. Res.**, v. 40, p. 22-30, 1995.
6. 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.
7. BAIRD, A.; KLAGSBRUN, M. The fibroblast growth factor family. **Cancer Cells**, v. 6, p. 239-243, 1991.
8. BARKER, A. J.; ULLIAN, E. M. Astrocytes and synaptic plasticity. **Neuroscientist.**, v. 16, p. 40-50, 2010.
9. BÉLANGER, M.; ALLAMAN, I.; MAGISTRETTI, P. Differential effects of pro and anti-inflammatory cytokines alone or in combinations on the metabolic profile of astrocytes. **Journal of Neurochemistry**, v. 116, p. 564–576, 2011.
10. BELSHAM, D. D; *et al.* Generation of a phenotypic array of hypothalamic neuronal cell models to study complex neuroendocrine disorders, **Endocrinology**, v. 145, p. 393–400, 2004.
11. BERKA, K.; *et al.* Membrane position of ibuprofen agrees with suggested access path entrance to cytochrome P450 2C9 active site. **Journal of Physical Chemistry**, vol. 115, p. 248-55, 2011.
12. BERMEL, R.A., RUDICK, R.A. Interferon-beta treatment for multiple sclerosis. **Neurotherapeutics**, vol. 4, pp. 633-46, 2007.
13. BOBYN, P. J.; *et al.* The effects of dietary sulfur amino acid deficiency on rat brain glutathione concentration and neural damage in global hemispheric hypoxia-ischemia. **Nutr. Neurosci.**, v. 5, p. 407–416, 2002.
14. BOHN, M. C. Motoneurons crave glial cell line-derived neurotrophic factor. **Exp. Neurol.**, v. 190, p. 263-75, 2004.
15. BOUDEAU J.; *et al.* MO25  $\alpha/\beta$  interact with STRAD  $\alpha/\beta$  enhancing their ability to bind, activate and localize LKB1 in the cytoplasm. **EMBO J.**, v. 22, p. 5102–5114, 2003.
16. BROWN, M. T.; Cooper, J. A. Regulation, substrates and functions of src, **Biochim. Biophys.**, v. 1287, p. 121–149, 1996.

17. BRUCE, C. R.; *et al.* Intramuscular Heat Shock Protein 72 and HemeOxygenase-1 mRNA are Reduced in Patients With Type 2 Diabetes, **Diabetes**, v. 52, 2003.
18. BRUNO, V.; *et al.* Metabotropic glutamate receptor subtypes as targets for neuroprotective drugs. **J. Cereb. Blood Flow Metab**, v. 21, p. 1013–1033, 2001.
19. BURCELIN, R. M.; *et al.* Gonadotropin-Releasing Hormone Secretion from Hypothalamic Neurons: Stimulation by Insulin and Potentiation by Leptin. **Endocrinology**, v. 144, p. 4484-4491, 2003.
20. BURDO, J.; DARGUSCH, R.; SCHUBERT, D.; Distribution of the cystine/glutamate antiporter system xc- in the brain, kidney, and duodenum. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 54, p. 549–557, 2006.
21. CALL, E. E.; KAAKS, R. Overweight , obesity and cancer: epidemiol ogical evidence and proposed mechanisms. **Nat. Rev. Cancer**, v. 4, p. 579–591, 2004.
22. CARPENTIER, P. A.; *et al.* Glial toll-like receptor signaling in central nervous system infection and autoimmunity. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 22, p. 140-147, 2008.
23. CHAO, C. C.; *et al.* Cytokine-stimulated astrocytes damage human neurons via a nitric oxide mechanism. **Glia**, v. 16, p. 276-84, 1996.
24. CHEN, J., COSTA, L.G., GUIZZETTI, M. Assessment of Cholesterol Homeostasis in Astrocytes and Neurons. **Methods Mol. Biol.**, vol.758, pp.403-14, 2011.
25. CHO, H. J.; *et al.* IFN-gamma-induced BACE1 expression is mediated by activation of JAK2 and ERK1/2 signaling pathways and direct binding of STAT1 to BACE1 promoter in astrocytes. **Glia**, v. 55, p. 253-262, 2007.
26. CHOI, S. J. Cultured hypothalamic neurons are resistant to inflammation and insulin resistance induced by saturated fatty acids. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 298, p. 1122–30, 2010.
27. CHRISTOPHERSON, K. S.; Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis. **Cell**, v. 120, p. 421–433, 2005.
28. CHUNG, J.; *et al.* HSP72 protects against obesity-induced insulin resistance. **PNAS**, v. 105, p. 1739-1744, 2008.
29. CLUMP, D. A.; *et al.* Protein expression levels of the Src activating protein AFAP are developmentally regulated in brain. **J. Neurobiol.**, v. 54, p. 473-485, 2003.
30. CULMSEE, C.; *et al.* AMP-activated protein kinase is highly expressed in neurons in the developing rat brain and promotes neuronal survival following glucose deprivation. **J. Mol. Neurosci.**, v.17, p. 45-58, 2001.
31. DAVIS, J. B.; STROOBANT, P. Platelet-derived growth factors and fibroblast growth factors are mitogens for rat Schwann cells. **J. Cell Biol.**, v. 110, p. 1353-1360, 1990.
32. 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, p. 4192-99, 2005.

33. DONG, Y.E., BENVENISTE, E.N. Immune Function of Astrocytes. **Glia**, vol. 36, pp. 180-90, 2001.
34. DONG, C. TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 8, p. 337–348, 2008.
35. D'ONOFRIO, M.; *et al.* Neuroprotection mediated by glial group-II metabotropic glutamate receptors requires the activation of the MAP kinase and the phosphatidylinositol-3-kinase pathways. **J. Neurochem.**, v. 78, p. 435–445, 2001.
36. EKESTERN, E. Neurotrophic factors and amyotrophic lateral sclerosis. **Neurodegener Dis.**, v. 3, p. 88-100, 2004.
37. ERIKSEN, J. L.; Druse, M. J. Astrocyte-mediated trophic support of developing serotonin neurons: effects of ethanol, buspirone, and S100B. **Brain Res.**, v. 131, p. 9-15, 2001.
38. ESKES, C.; *et al.* Microglial reaction induced by noncytotoxic methylmercury treatment leads to neuroprotection via interactions with astrocytes and IL-6 release. **Glia**, v. 37, p. 43–52, 2002.
39. EVERITT, B.J.; HOKFELT, T. Neuroendocrine anatomy of the hypothalamus. **Acta Neurochir. Suppl.**, v. 47, p. 1–15, 1990.
40. FARINA, C.; ALOISI, F.; MEINL, E. Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. **Trends in Immunology**, v. 28, p. 138-145, 2007.
41. FLORES M.B., FERNANDES M.F., ROPELLE E.R., FARIA M.C., UENO M., *et al.* (2006). Exercise Improves Insulin and Leptin Sensitivity in Hypothalamus of Wistar Rats. **Diabetes**, vol.55, pp. 2554–61.
42. FRAUTSCHY, S. A.; WALICKE, P.A.; BAIRD, A. Localization of basic fibroblast growth factor and its mRNA after CNS injury, **Brain Res.**, v. 553, p.291-299, 1991.
43. FREEMAN, M. R. Specification and Morphogenesis of Astrocytes. **Science**, v. 330, p.774, 2010.
44. GADIENT, R. A.; OTTEN, U. H. Interlekin-6 (IL-6) – A molecule with both beneficial and destructive potentials. **Progress in Neurobiol.**, v.52, p.379-90, 1997.
45. GARBER, M.; *et al.* Computational methods for transcriptome annotation and quantification using RNA-seq. **Nature methods**, v. 8, n. 6, p. 469–77, 2011.
46. GIASSON, B. I.; *et al.* The relationship between oxidative/nitrative stress and pathological inclusions in Alzheimer's and Parkinson's disease. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 32, p. 1264–1275, 2002.
47. GORINA, R.; *et al.* Astrocyte TLR4 activation induces a proinflammatory environment through the interplay between MyD88-dependent NFkappaB signaling, MAPK, and Jak1/Stat1 pathways. **Glia**, v. 59, p. 242–255, 2011.
48. GOUGH, D. J.; *et al.* IFNgamma signaling-does it mean JAK-STAT? **Cytokine Growth Factor Rev.**, v. 19, p. 383-394, 2008.

49. GUILLOD-MAXIMIN, E., LORSIGNOL, A., ALQUIER, T., PÉNICAUD, L. Acute Intracarotid Glucose Injection Towards the Brain Induces Specific c-fos Activation in Hypothalamic Nuclei: Involvement of Astrocytes in Cerebral Glucose-Sensing in Rats. **J. Neuroendocrinol.**, v.16, p. 464–71, 2004.
50. GUPTA, S.; *et al.* Saturated long-chain fatty acids activate inflammatory signaling in astrocytes. **J. Neurochem.**, v. 120, p. 1060–71, 2012.
51. HAILER, N. P.; *et al.* Astrocytic factors protect neuronal integrity and reduce microglial activation in an in vitro model of N-methyl-d-aspartate-induced excitotoxic injury in organotypic hippocampal slice cultures. **Eur. J. Neurosci.**, v. 14, p. 315-326, 2001.
52. HALEGOUA, S.; ARMSTRONG, R. C.; KREMER, N.E. Dissecting the mode of action of a neuronal growth factor. **Curr. Topics Microbiol. Immunol.**, v. 165, p. 119-170, 1991.
53. HALPERN, Z.S.C.; RODRIGUES, M. D. B.; DA COSTA, R.F. Determinantes fisiológicos do controle do peso e apetite. **Rev Psiquiatr Clin.**, v. 31, p. 150-3, 2004.
54. HAMBY, M.E.; SOFRONIEW, M. V. Reactive astrocytes as therapeutic targets for CNS disorders. **Neurotherapeutics**, v. 7, p.494–506, 2010.
55. HAMMARBERG, H.; *et al.* Differential regulation of trophic factor receptor mRNAs in spinal motoneurons after sciatic nerve transection and ventral root avulsion in the rat. **J Comp Neurol.**, v. 426, p. 587-601, 2000.
56. HARDER, J.; *et al.* The actin cross-linking protein AFAP120 regulates axon elongation in a tyrosine phosphorylation-dependent manner. **Neurosci Lett.**, v. 444, p. 132-6, 2008.
57. HIDALGO, J.; *et al.* Transgenic mice with astrocyte-targeted production of interleukin-6 are resistant to high-fat diet-induced increases in body weight and body fat. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 24, p. 119–26, 2010.
58. HOTAMISLIGIL, G. S.; SHARGILL, N. S.; SPIEGELMAN, B. M. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. **Science**, v. 259, p. 87–91, 1993.
59. HSUCHOU, H., HE, Y., KASTIN, A.J., TU, H., MARKADAKIS, E.N, *et al.* Obesity induces functional astrocytic leptin receptors in hypothalamus. **Brain**, v. 132, p. 889–902, 2009.
60. HUANG, Y. Q.; Li, J. J.; KARPATKIN, S. Thrombin inhibits tumor cell growth in association with up-regulation of p21(waf/cip1) and caspases via a p53-independent, STAT-1-dependent pathway. **J. Biol. Chem.**, v. 3, p. 6462-8. 2000.
61. HUNDAL, R.S.; *et al.* Mechanism by which high-dose aspirin improves glucose metabolism in type 2 diabetes. **J. Clin. Investig.**, v. 109, p. 1321–26, 2002
62. IBGE (2011). 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.
63. IHME (2015) Obesity and overweight increasing worldwide. Disponível em: <http://www.healthdata.org/infographic/obesity-and-overweight-increasing-worldwide> > Acesso: 10 ago. 2015.



64. IWAKURA, Y.; *et al.* The roles of IL-17A in inflammatory immune responses and host defense against pathogens. **Immunol.**, v. 226, p. 57–79, 2008.
65. JOHNSON, J. D. E.; FLESHNER, M. Releasing signals, secretory pathways, and immune function of endogenous extracellular heat shock protein 72. **J. Leukoc. Biol.**, v.79, p.425-434, 2006.
66. KÄLIN, S.; *et al.* Hypothalamic innate immune reaction in obesity. **Nat. Rev. Endocrinol.** v. 11, p. 339–351, 2015.
67. 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.
68. KAPITULNIK, J.; STROBEL, H. W. Extrahepatic drug metabolizing enzymes. **J Biochem. Mol. Toxicol.**, v. 13, p. 227-230, 1999.
69. KASAI, T.; *et al.* Anti-inflammatory cytokine levels in patients with septic shock. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.*, v. 98, p. 34-42, 1997.
70. KHOSHNOODI, J.; PEDCHENKO, V.; HUDSON, B. G. Mammalian collagen IV. **Microsc. Res. Tech.**, v. 71, p. 357–370, 2008.
71. 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.
72. KIM, J.G.; *et al.* Leptin signaling in astrocytes regulates hypothalamic neuronal circuits and feeding. **Nature Neuroscience**, v. 17, p. 908–10, 2014.
73. 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. 785-93, 2009.
74. KURTZ, A.; *et al.* The expression pattern of a novel gene encoding brain-fatty acid binding protein correlates with neuronal and glial cell development. **Development**, v. 120, p.2637-49, 1994.
75. LEDEBOER, A.; *et al.* Interleukin-10, interleukin-4, and transforming growth factor-beta differentially regulate lipopolysaccharide-induced production of pro-inflammatory cytokines and nitric oxide in co-cultures of rat astroglial and microglial cells. **Glia**, v. 30, p. 134-142, 2000.
76. LEWERENZ, J.; Klein, M.; Methner, A. Cooperative action of glutamate transporters and cystine/glutamate antiporter system X protects from oxidative glutamate toxicity. **J. Neurochem.**, v. 98, p. 916-925, 2006.
77. LIESI, P.; KAUPPILA, T. Induction of Type IV Collagen and Other Basement-MembraneAssociated Proteins after Spinal Cord Injury of the Adult Rat May Participate in Formation of the Glial Scar. **Experimental Neurology**, v. 173, p. 31-45, 2002.
78. LI, J., DING Y. H.; *et al.* Increased Astrocyte Proliferation In Rats After Running Exercise. **Neuroscience Letters**, v. 386, p. 160-64, 2005.
79. LIU, Q. Y.; *et al.* Astrocyte-conditioned saline supports embryonic rat hippocampal neuron differentiation in short-term cultures. **J. Neurosci. Methods**, v. 86, p. 71-77, 1998.

80. LU, B.; *et al.* NGF gene expression in actively growing brain glia. **J. Neurosci.**, v. 11, p. 318–326, 1991.
81. LU, X.; *et al.* Resveratrol differentially modulates inflammatory responses of microglia and astrocytes. **J. Neuroinflammation.**, p. 7:46, 2010.
82. MAHMOUD L. S., COLIN K. C.; THAD A. R. Modulation of inflammatory cytokines and mitogen-activated protein kinases by acetate in primary astrocytes. **J. Neuroimmune Pharmacol.**, v. 8, p. 287-300, 2013.
83. MALAPLATE-ARMAND, C.; *et al.* Astrocytic cytochromes p450: an enzyme subfamily critical for brain metabolism and neuroprotection. **Rev. Neurol.**, v. 160, p. 651–658, 2004.
84. MARINO, J.S; XU, Y.; HILL, J.W. Central insulin and leptin-mediated autonomic control of glucose homeostasis. **Trends Endocrinol. Metab.**, v. 22, p. 275–85, 2011.
85. MASTROBERARDINO, L.; *et al.* Amino-acid transport by heterodimers of 4F2hc/CD98 and members of a permease family. **Nature**, v. 395, p. 288–291, 1998.
86. MATSUNAGA, E.; *et al.* RGM and its receptor neogenin regulate neuronal survival. **Nat. Cell Biol.**, v. 6, p. 749-55, 2004.
87. MAYER, M. P.; BUKAU, B. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 2005.
88. MELENDEZ, R. I.; VUTHIGANON, J.; KALIVAS, P. W. Regulation of extracellular glutamate in the prefrontal cortex: focus on the cystine glutamate exchanger and group I metabotropic glutamate receptors. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 314, p. 139–147, 2005.
89. MENDELL, L. M.; MUNSON, J. B.; ARVANIAN, V. L. Neurotrophins and synaptic plasticity in the mammalian spinal cord. **J. Physiol**, v. 533, p. 91-7, 2001.
90. MICHELUCCI, A. The Neurogenic Potential of Astrocytes Is Regulated by Inflammatory Signals, **Molecular Neurobiology**, p. 1-16, 2015.
91. 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, p.359-70, 2009.
92. MIOSSEC, P.; KORN, T.; KUCHROO, V. K. Interleukin-17 and type 17 helper T cells. **N. Engl. J. Med.**, v. 361, p. 888–898, 2009.
93. MISHRA, M.; AKATSU, H.; HEESE, K. The novel protein MANI modulates neurogenesis and neurite-cone growth. **J. Cell Mol. Med.**, v. 15, p. 1713-25, 2011.
94. MIURA K.; *et al.* Cystine uptake and glutathione level in endothelial cells exposed to oxidative stress. **J. Physiol.**, v. 262, p. 50-58, 1992.
95. MIZUI, T.; KINOUCHI, H.; CHAN, P. H. Depletion of brain glutathione by buthionine sulfoximine enhances cerebral ischemic injury in rats. **J. Physiol.**, v. 262, 313-317, 1992.
96. MIZUTA, I.; *et al.* Riluzole stimulates nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor and glial cell line-derived neurotrophic factor synthesis in cultured mouse astrocytes. **Neurosci. Lett.**, v. 310, p. 117–120, 2001.

97. MISRA, A.; et al Effect of Supervised Progressive Resistance-Exercise Training Protocol on Insulin Sensitivity, Glycemia, Lipids, and Body Composition in Asian Indians with Type 2 Diabetes. **Diabetes Care**, vol. 31, pp. 1282–87, 2008.
98. MORAES, J.C.; *et al.* High Fat Diet Induces Apoptosis of the Hypothalamic Neurons. **Plos one**, v. 4, p. 1-11, 2009.
99. MORENTIN, P.B.M., LÓPEZ, M. (2010). Mens Sana In Corpore Sano: Exercise and Hypothalamic ER Stress. **PLoS Biology**, vol. 8, n. 8, p. e1000464.
100. MORSELLI, E.; *et al.* Hypothalamic PGC-1 $\alpha$  protects against high-fat diet exposure by regulating ER $\alpha$ . **Cell**, v. 9, p. 633–45, 2014.
101. 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. **J. Biochem. Biophys.**, v.35, p.296-302, 1998.
102. MUNOZ, C.; *et al.* Dysregulation of in vitro cytokine production by monocytes during sepsis. **J. Clin. Invest.**, v. 88, p.1747-1754, 1991.
103. MUNZBERG, H.; MYERS, M.G. Molecular and Anatomical Determinants of Central Leptin Resistance. **Nat Neurosci**, v.8, p.566-70, 2005.
104. MURPHY, T. H.; SCHNAAR, R. L.; COYLE, J. T. Immature cortical neurons are uniquely sensitive to glutamate toxicity by inhibition of cystine uptake. **FASEB J.**, v. 4, p. 1624-1633, 1990.
105. NADERALI, E.K.; RATCLIFFE, S.H.; DALE, M.C. Obesity and Alzheimer's disease: a link between body weight and cognitive function in old age. **J. Alzheimer Dis.**, v. 24, p. 445–449, 2009.
106. NAKAGAWA, T., YABE, T., SCHWARTZ, J. P. Gene expression profiles of reactive astrocytes cultured from dopamine-depleted striatum. **Neurobiol Dis.**, v. 20, p. 275-82, 2005.
107. NIESSEN, F. Dendritic cell PAR1-S1P3 signalling couples coagulation and inflammation. **Nature**, v. 3, p. 654-8, 2008.
108. NISHIKORI, M. Classical and Alternative NF- $\kappa$ B Activation Pathways and Their Roles in lymphoid Malignancies. **J. Clin. Exp. Hematopathol.**, v. 45, p.15-24, 2005.
109. OMS (2015). Novo relatório da OMS traz informações sobre estatísticas de saúde em todo o mundo. Disponível em: <http://nacoesunidas.org/novo-relatorio-da-oms-traz-informacoes-sobreestatisticas-de-saude-em-todo-o-mundo/> Acesso: 10 ago. 2015.
110. OGDEN, C.L.; *et al.* The Epidemiology of Obesity. **Gastroenterology**, v. 132, p.2087-102, 2007.
111. OBERHEIM, N.A.; *et al.* Astrocytic complexity distinguishes the human brain. **Trends Neuroscience**. v. 29, p. 547–53, 2006.
112. ORTEGA, N.; WERB, Z. New functional roles for non-collagenous domains of basement membrane collagens. **J Cell Sci.**, v. 115, p. 201-14, 2002.
113. PAN, W.; *et al.* Astrocyte leptin receptor (ObR) and leptin transport in adultonset obese mice. **Endocrinology**, v. 149, p. 2798–806, 2008.

114. PATTERSON, C. M.; *et al.* Three Weeks of Postweaning Exercise in DIO Rats Produces Prolonged Increases in Central Leptin Sensitivity and Signaling. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 296, p. 537-48, 2009.
115. PAVELKO, K. D.; Interleukin-6 protects anterior horn neurons from lethal virus-induced injury. **J. Neurosci.**, v. 23, p. 481-492, 2003.
116. PEKONY, M.; *et al.* The Role of Astrocytes and Complement System in Neural Plasticity. **Int Rev Neurobiol**, v. 82, p. 95-111, 2007.
117. Pesquisa nacional de saúde: 2013: ciclos de vida: Brasil e grandes regiões / IBGE, Coordenação de Trabalho e Rendimento. Rio de Janeiro : IBGE, 2015.
118. PIEHL, F.; LIDMAN, O. Neuroinflammation in the Rat--CNS Cells and Their Role in the Regulation of Immune Reactions. **Immunol Rev**, v. 184, p. 212-25, 2001.
119. PROBERT, L.; *et al.* Spontaneous inflammatory demyelinating disease in transgenic mice showing central nervous system-specific expression of tumor necrosis factor alpha. **Proc. Natl. Acad. Sci**, v. 92, p. 11294-11298, 1995.
120. RANSOHOFF, R.M.; BROWN, M.A. Innate immunity in the central nervous system. **J. Clin. Investig.**, v.122, p. 1164-71, 2012.
121. RICHARDSON, P. M. Neurotrophic factors in regeneration. **Curr. Op. Neurob.**, v. 1, p. 401-406, 1991.
122. RIBOTTA, M. G., MENET, V., PRIVAT, A. (2004). Glial Scar and Axonal Regeneration in the CNS: Lessons from GFAP and Vimentin Transgenic Mice. **Acta Neurochir Suppl**, vol. 89, pp. 87-92.
123. RODRIGUES-KRAUSE; KRAUSE, M. Divergence of intracellular and extracellular HSP72 in type 2 diabetes: does fat matter? **Cell Stress Chaperones**, v.17, 2012.
124. ROPELLE, E.R.; *et al.* IL-6 and IL-10 anti-inflammatory activity links exercise to hypothalamic insulin and leptin sensitivity through IKK $\beta$  and ER stress inhibition. **PLOS Biol.**, v. 8, 2010.
125. ROTHWELL, N. J. Annual review prize lecture cytokines - killers in the brain? **J. Physiol. Pharmacol.**, v. 514, p. 3-17, 1999.
126. ROTHWELL, N. J.; HOPKINS, S. J. Cytokines and the nervous system II: actions and mechanisms of action. **TINS**, v. 18, p. 130-136, 1995.
127. SATO, H.; *et al.* Distribution of cystine/glutamate exchange transporter, system xc-, in the mouse brain. **J Neurosci.**, v. 22, p. 8028-8033, 2002.
128. SCHAPIRA, A. H. Mitochondrial involvement in Parkinson's disease, Huntington's disease, hereditary spastic paraplegia and Friedreich's ataxia. **Biochim. Biophys.**, v. 1410, p. 159-170, 1999.
129. SCHUBERT, D.; PIASECKI, D. Oxidative glutamate toxicity can be a component of the excitotoxicity cascade. **J. Neurosci.**, v. 21, p. 7455-7462, 2001.
130. SCHWARTZ, M.W., WOODS, S.C., PORTE, D., JR., SEELEY, R.J., BASKIN, D.G. (2000). Central Nervous System Control of Food Intake. **Nature**, vol.404, pp.661 71.

131. SHACKELFORD, D. B.; SHAW, R. J. The LKB1-AMPK pathway: metabolism and growth control in tumour suppression. **Nat. Rev. Cancer**, v. 9, p. 563-575, 2009.
132. SHAW, R. J.; *et al.* The tumor suppressor LKB1 kinase directly activates AMP-activated kinase and regulates apoptosis in response to energy stress, **Cell Biology**, v. 101, p. 3329–3335, 2004.
133. SHIN, S. S.; *et al.* Neuroprotective effects of collagen matrix in rats after traumatic brain injury. **Restorative Neurology and Neuroscience**, v. 33, p. 95-104, 2015.
134. SIEGEL, R. M.; *et al.* Death Receptor Signaling and Autoimmunity. **Immunol Res**, v. 27, p.499–512, 2003.
135. SOFRONIEW, M. V. Reactive astrocytes in neural repair and protection. **Neuroscientist**, v. 11, p. 400-7, 2005.
136. SOFRONIEW, M. V. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. **Trends Neurosci**, v. 32, p. 638 – 647, 2009.
137. SOFRONIEW, M.V.; VINTERS, H.V.; Astrocytes: biology and pathology. **Neuropathology**. v.119, p. 7–35, 2010.
138. SORENSEN, T. I.; VIRTUE, S.; VIDAL-PUIG, A. Obesity as a Clinical and Public Health Problem: Is There a Need For a New Definition Based on Lipotoxicity Effects? **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1801, p. 400-04, 2010.
139. STEVENS, B.; *et al.* The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination. *Cell*, v. 131, p. 1164–1178, 2007.
140. STREIT, W. J.; KREUTZBERG, G. W. Response of Endogenous Glial Cells to Motor Neuron Degeneration Induced by Toxicricin. **J. Comp. Neurol.**, v.268, p.248-263, 1988.
141. SUN, G.; *et al.* *RIP2*-mediated *LKB1* deletion causes axon degeneration in the spinal cord and hind-limb paralysis. **Dis Modelo**, v.4, p. 193-202, 2011.
142. SUN, W.; *et al.* The effect of collagen-binding NGF-beta on the promotion of sciatic nerve regeneration in a rat sciatic nerve crush injury model. **Biomaterials**, v. 30, p. 4649-56, 2009.
143. SUZUMURA, A.; *et al.* Roles of glia-derived cytokines on neuronal degeneration and regeneration. **Ann. NY Acad. Sci.**, v. 1088, p. 219-29, 2006.
144. THALER, J.P.; *et al.* Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. **Journal of Clinical Investigation**, v. 122, p. 153–62, 2012.
145. TERENGHI, G. Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. **J. Anat.**, v. 194, p. 1-14, 1999.
146. TRAPNELL, C.; *et al.* Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. **Nature Biotechnology**, v. 28, p. 511–515, 2010.
147. TRETTER, L.; *et al.* Initiation of Neuronal Damage by Complex I Deficiency and Oxidative Stress in Parkinson's Disease Tretter. **Neurochemical Research**, v. 29, p. 569–577, 2004.

148. TUOMILEHTO, J.; *et al.* Prevention of Type 2 Diabetes Mellitus by Changes in Lifestyle Among Subjects With Impaired Glucose Tolerance. **N. Engl. J. Med.**, v. 344, p. 1343–1350, 2001.
149. UGALDE, C.; *et al.* Human mitochondrial complex I assembles through the combination of evolutionary conserved modules: a framework to interpret complex I deficiencies. **Hum. Mol. Genet.**, v. 13, p. 2461-2472, 2004.
150. ULLIAN, E. M.; *et al.* Control of Synapse Number by Glia. **Science**, v. 291, p. 657-61, 2001.
151. VALDEARCOS, M.; XU, A. W.; KOLIWAD, S. K. Hypothalamic Inflammation in the Control of Metabolic Function. **Annu. Rev. Physiol**, v. 77, p. 131–60, 2015.
152. VAN WAGONER, N. J., E. N. BENVENISTE. Interleukin-6 expression and regulation in astrocytes. **J. Neuroimmunol.**, v. 100, p. 124–139, 1999.
153. VELLOSO, A. L. The Brain is the Conductor: Diet Induction Inflammation Overlapping Physiological Control of Body Mass and Metabolism. **Endocrinol. Metab.**, vol. 53, n. 2, pp. 151-58, 2009.
154. VGONTZAS, A. N.; *et al.* Sleep apnea and daytime sleepiness and fatigue: relation to visceral obesity, insulin resistance, and hypercytokinemia. **J. Clin. Endocrinol Metab.**, v. 85, p. 1151-1158, 2000.
155. VISSER, M.; *et al.* Elevated C-reactive protein levels in overweight and obese adults. **JAMA**, v. 282, p. 2131-5, 1999.
156. VITKOVIC, L.; MAEDA, S.; STERNBERG, E. Anti-inflammatory cytokines: expression and action in the brain. **Neuroimmunomodulation**. v. 9, p. 295-312, 2001.
157. WAJANT, H.; PFIZENMAIER K.; SCHEURICH, P. Tumor necrosis factor signaling. **Cell Death Differ.**, v. 10, p. 45–65, 2003.
158. WAKE, H.; *et al.* Microglia: actively surveying and shaping neuronal circuit structure and function. **Trends Neurosci.**, v. 36, p. 209–17, 2013.
159. WANG, X. F.; CYNADER, M. S.; *et al.* Effects of astrocytes on neuronal attachment and survival shown in a serum-free co-culture system. **Brain Res.**, v. 4, p. 209-216, 1999.
160. WOODS, S.C.; SEELEY, R.J.; PORTE JR, D. & SCHWARTZ, M.W.- Signals that regulate food intake and energy homeostasis. **Science**, v. 280, p. 1378-83, 1998.
161. WYSS-CORAY, T.; *et al.* TGF- 1 promotes microglial amyloid- clearance and reduces plaque burden in transgenic mice. **Nat Med**, v. 7, p. 612-618, 2001.
162. YAMAMOTO, M.; *et al.* Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha regulate amyloid-beta plaque deposition and beta-secretase expression in Swedish mutant APP transgenic mice. **Am J Pathol.**, v. 170, p. 680-92, 2007.
163. YONEZAWA, T.; *et al.* Type IV collagen induces expression of thrombospondin-1 that is mediated by integrin  $\alpha 1\beta 1$  in astrocytes, **Glia**, v. 58, p. 755-767, 2010.
164. YOUNG, J.K., BAKER, J.H., MULLER, T. (1996). Immunoreactivity for brain-fatty acid binding protein in gomoripositive astrocytes. **Glia**, vol.16, n.3, pp.218-26.

165. YOUNG, J. K. Anatomical relationship between specialized astrocytes and leptin-sensitive neurones. **J Anat.**, v. 201, p. 85–90, 2002.
166. ZACHARY, I. Neuroprotective role of vascular endothelial growth factor: signalling mechanisms, biological function, and therapeutic potential. **Neurosignals**, v. 14, p. 207-21, 2005.
167. ZANON, R.; OLIVERIA, A. L. R. MHC I upregulation influences the astroglial reaction and synaptic plasticity in the spinal cord after sciatic nerve transection. **Experimental Neurology**, v. 200, p. 521-531, 2006.
168. ZHANG, X.; *et al.* Hypothalamic IKK $\beta$ /NF- $\kappa$ B and ER stress link overnutrition to energy imbalance and obesity. **Cell**, v. 135, p. 61–73, 2008.
169. ZEQUIRAJ, E. Complex Reveals an Allosteric Mechanism of Kinase Activation. **Science**, v. 326, p. 1707-1711, 2009.

**8. ANEXO**





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](http://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