

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Efeito da pregabalina em astrócitos: combate à excitotoxicidade glutamatérgica?

Paula Victoria Maglio Cauhy

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Uberlândia MG
Julho – 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Efeito da pregabalina em astrócitos: combate à excitotoxicidade glutamatérgica?

Paula Victoria Maglio Cauhy

Orientadora: Renata Graciele Zanon

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Uberlândia MG
Julho - 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Efeito da pregabalina em astrócitos: combate à excitotoxicidade glutamatérgica?

Paula Victoria Maglio Cauhy

Renata Graciele Zanon
ICBIM-UFU

Homologado pela coordenação do curso de
Ciências Biológicas em __/__/__

Coordenadora: Celine de Melo

Uberlândia MG
Julho – 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Efeito da pregabalina em astrócitos: combate à excitotoxicidade glutamatérgica?

Paula Victoria Maglio Cauhy

Aprovado pela banca examinadora em / / Nota: _____

Renata Graciele Zanon

Uberlândia, de de

Dedico este estudo
à minha mãe, *Elza*, por ser
o maior exemplo de determinação
e superação que alguém poderia ter

AGRADECIMENTOS

A minha família pelo apoio em minha carreira e incentivo a sempre alcançar objetivos mais altos.

Aos meus amigos, pela força, motivação, suporte emocional e incentivo.

A todos meus professores pela inspiração a continuar na carreira acadêmica.

A minha orientadora, Profa. Dra. Renata Graciele Zanon, pela oportunidade, pelos diversos ensinamentos, paciência e dedicação à pesquisa.

As companheiras do Laboratório de Neurociências, pelo companheirismo, auxílio nos experimentos e motivação.

Ao Centro de Pesquisa em Obesidade e Comorbidades da Unicamp, por fornecer parte do material utilizado no desenvolvimento desse estudo.

A CAPES pela bolsa concedida no âmbito do programa Ciência sem Fronteiras, que foi a etapa mais importante e decisiva de minha graduação e formação enquanto futura cientista.

RESUMO

Glutamato é o principal neurotransmissor excitatório secretado por neurônios corticais, e quando em excesso, pode ser tóxico às células do Sistema Nervoso, causando danos e até morte celular. Os astrócitos apresentam o papel fundamental de reabsorver o glutamato da fenda sináptica, protegendo dos efeitos da excitotoxicidade. O presente estudo buscou analisar o efeito de uma droga chamada pregabalina, que se liga aos receptores de cálcio voltagem-dependentes e com isso podem influenciar no metabolismo do glutamato. A pesquisa foi realizada utilizando culturas primárias de astrócitos, culturas da linhagem neuronal CLU189 e cocultura entre os dois tipos celulares, que foram submetidas a tratamentos de diferentes concentrações de glutamato, pregabalina ou os dois concomitantemente. Posteriormente, foi realizado teste de viabilidade celular e imunofluorescência. Os resultados mostraram que a pregabalina não reduz a toxicidade ao glutamato exógeno, e a mesma parece atuar sensibilizando as células ao glutamato ou atuar junto, de alguma forma, com o glutamato causando mais perda celular. Mais estudos devem ser realizados a fim de elucidar os mecanismos de ação do fármaco.

Palavras-chave: Pregabalina; Glutamato; Astrócito; Excitotoxicidade

ABSTRACT

Glutamate is the main neurotransmitter secreted by excitatory cortical neurons, and when in excess, can be toxic to neural cells, causing damage and even cell death. Astrocytes play the essential role of reabsorbing glutamate from the synaptic cleft, preventing excitotoxicity events. The present study sought to analyze the effect of a drug named pregabalin, which binds to voltage-gated calcium channels, and can influence on glutamate's metabolism. The research was conducted utilizing primary astrocyte cultures, neuronal lineage CLU189 cultures and co-cultures of the two cell types, which were submitted to treatments of different concentrations of glutamate, pregabalin or both. After, cell viability assays and immunofluorescence were performed. The results showed that pregabalin does not reduce exogenous glutamate's toxicity, and it seems to act sensitizing the cells to glutamate, or acting together, somehow, with glutamate causing more cell death. Further studies must be executed in order to elucidate pregabalin's mechanism of action.

Key words: Pregabalin; Glutamate; Astrócito; Excitotoxicity

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	1
1.1 Pregabalina	1
1.2 Glutamato e Excitotoxicidade	2
2. OBJETIVOS.....	4
2.1 Objetivo geral.....	4
2.2 Objetivos específicos.....	4
3.MATERIAIS E MÉTODOS	5
3.1 Cultura primária de astrócitos corticais.....	5
3.2 Cultura de neurônios (linhagem CLU189).....	6
3.3 Cocultura astrócitos e neurônios	6
3.4 Tratamentos	6
3.4.1 Teste para toxicidade ao glutamato	6
3.4.2 Teste para toxicidade à pregabalina	7
3.4.3 Interação pregabalina e glutamato sobre as células	7
3.5 Teste de viabilidade celular com Alamar Blue®	7
3.6 Imunofluorescência	8
4.RESULTADOS.....	9
4.1 Pregabalina e glutamato danificam astrócitos corticais, neurônios CLU189 e cocultura apenas em altas concentrações	9
4.2 Pregabalina (1mM) não reverte a perda celular causada pela concentração exógena de glutamato na linhagem neuronal CLU189	10
4.3 Interação da pregabalina e glutamato em cocultura de astrócitos e linhagem neuronal CLU189.....	11
4.4 Expressão de GFAP e sinaptofisina nas coculturas	13
5.DISSCUSSÃO.....	15
6.CONCLUSÕES.....	18
7.REFERÊNCIAS	19

1. INTRODUÇÃO

1.1 Pregabalina

Pregabalina e gabapentina são fármacos estruturalmente análogos ao neurotransmissor GABA, amplamente utilizados no tratamento anticonvulsivo, antiepilético, da dor neuropática e transtorno de ansiedade generalizada (SILLS, 2006). Ambos compartilham o sítio de ligação, apesar de suas diferenças estruturais e da melhor eficácia da pregabalina em estudos clínicos, ligam-se à subunidade auxiliar $\alpha 2-\delta$ dos canais de cálcio voltagem-dependentes do Sistema Nervoso Central (SNC) (TAYLOR et al., 2007). O mecanismo de ação proposto para pregabalina e gabapentina consiste na diminuição do influxo de cálcio nos sinaptosomas, levando a uma redução na liberação de neurotransmissores, e consequentemente, à redução de excitabilidade pós-sináptica (FINK et al., 2000; VAN HOOFT et al., 2002; MICHEVA et al., 2006). Estudos mais recentes mostraram que a gabapentina é um poderoso bloqueador da formação de novas sinapses, e realiza essa função sem alterar o funcionamento dos canais de cálcio. Ao ligar-se na subunidade referida, a última assume um tipo de conformação inativa que perturba a interação com a trombospondina, proteína sinaptogênica secretada por astrócitos (EROGLU, et al., 2009). Percebe-se que ainda não são conhecidos todos os mecanismos celulares de ação das duas drogas, possibilitando uma variedade de estudos acerca disso.

Apesar de terem sido originalmente desenvolvidos para atuar no sistema GABAérgico, Errante e Petroff (2003) mostraram que nenhum dos dois fármacos, em diferentes doses, aumentou a concentração celular de GABA no prosencéfalo de ratos. Ainda no mesmo estudo, mostraram que pregabalina e gabapentina têm efeito significativo na redução da concentração celular de glutamato. Em conformidade, estudos prévios mostraram que a gabapentina modula a atividade de enzimas e transportadores que afetam o metabolismo

de glutamato, diminuindo sua concentração em diferentes modelos (HUTSON et al., 1998; LIETH et al., 2001).

Essa capacidade da pregabalina de reduzir a liberação de neurotransmissores parece ter efeitos mínimos em condições fisiológicas, mas significativamente inibe a liberação excessiva de neurotransmissores e neuropeptídeos ocasionada por eventos patológicos, como hiperalgesia, inflamação (FEHRENBACHER, et al., 2003; PATEL, et al., 2000).

1.2 Glutamato e Excitotoxicidade

Glutamato é o principal neurotransmissor secretado por neurônios excitatórios corticais (CURTIS & JOHNSTON, 1974), sendo essencial para o funcionamento normal do SNC. A transmissão sináptica mediada por glutamato depende, além da liberação do neurotransmissor por neurônios pré-sinápticos, de receptores e transportadores, presentes nos neurônios pós-sinápticos e células da glia (HANSSON et al., 2000). Os receptores de glutamato são divididos em ionotrópicos (AMPA, NMDA e receptores de cainato) e metabotrópicos. O receptor NMDA é permeável a íons de cálcio, característica importante de seu funcionamento (MORI & MISHINA, 1995; GLAUM et al., 1990). Quando os receptores são ativados iniciam resposta de Ca^{2+} nas células da glia, o que ativa a liberação de “gliotransmissores” (VOLTERRA & MELDOLESI, 2005).

Diferentemente de outros neurotransmissores, parece não existir nenhuma enzima extracelular capaz de metabolizar o glutamato. Por isso, sua retirada rápida da fenda sináptica depende principalmente de transportadores presentes nos tipos celulares do SNC, que mantêm as condições fisiológicas (ANDERSON & SWANSON, 2000).

O glutamato pode ser tóxico, quando se estabelece um evento patológico chamado de excitotoxicidade, caracterizado pela estimulação excessiva de receptores de glutamato, levando a danos e morte celular (OLNEY, 1969). A excitotoxicidade glutamatérgica é um

mecanismo característico de doenças neurodegenerativas como doença de Alzheimer, esclerose lateral amiotrófica, esclerose múltipla, doença de Parkinson, doença de Huntington, além de outros quadros como abstinência de álcool, epilepsia, acidente vascular cerebral e perda auditiva (MEHTA, et al., 2012).

Praticamente todas as classes de receptores já foram relacionadas à morte celular promovida por excitotoxicidade, porém os receptores NMDA destacam-se como principais devido à sua elevada permeabilidade ao Ca^{2+} (KROEMER, et al., 2007). Devido à possibilidade de toxicidade do glutamato, sua remoção do espaço extracelular é fundamental, e a captação por astrócitos é quantitativamente a mais importante para manter condições ideais de concentração de glutamato (ROTHSTEIN et al., 1996), e pode ser mediada por dois tipos principais de transportadores: GLAST e GLT-1 (ANDERSON & SWANSON, 2000). Uma vez captado pelo astrócito, o glutamato pode ter vários destinos. O principal deles é o uso direto para a formação de glutamina, através da enzima glutamina sintetase. Esse processo é essencial para o metabolismo do glutamato, pois a glutamina é então liberada pelos astrócitos e captada pelos neurônios, que a transformam em glutamato novamente (MCKENNA, 2007).

Aparentemente, astrócitos são menos vulneráveis ao excesso de glutamato extracelular quando comparados a neurônios (BECERRA-CALIXTO & CARDONA-GÓMEZ, 2017), mas isso não impede que a excitotoxicidade glutamatérgica ocasione a morte dos mesmos (DAVID et al., 1996). Nesses eventos, os astrócitos assumem um estado reativo caracterizado pela hipertrofia da célula, alteração na expressão e atividade dos receptores de glutamato e da enzima glutamina sintetase. Assim, é possível notar a amplitude dos efeitos do excesso de glutamato exógeno, que permeiam desde os neurônios até as células da glia, acometendo diferentes etapas do metabolismo do glutamato.

Tendo em vista a ação dos astrócitos sobre o glutamato, esse trabalho pretendeu analisar o possível efeito da pregabalina na toxicidade de glutamato exógeno, visto que o mecanismo de ação da pregabalina consiste principalmente na diminuição do influxo de cálcio nos tipos celulares do SNC, podendo ter efeito na liberação e captação de glutamato, e, dessa forma, contribuir em elucidar os mecanismos de ação da pregabalina e possíveis novas aplicações farmacológicas para a mesma.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estudar o efeito da pregabalina sobre a toxicidade de glutamato extracelular em culturas de células.

2.2 Objetivos específicos

- Identificar a concentração de glutamato extracelular suportada em culturas de astrócitos corticais, neurônios hipotalâmicos imortalizados (linhagem CLU189) e em sistema de cocultura.
- Verificar se altas concentrações de pregabalina oferecem toxicidade em culturas de astrócitos, neurônios hipotalâmicos imortalizados (linhagem CLU189) e em sistema de cocultura.
- Analisar se a pregabalina influencia a viabilidade de células em situação de excitotoxicidade ao glutamato.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cultura primária de astrócitos corticais

Astrócitos corticais foram extraídos de neonatos de ratos Wistar com até dois dias de vida (CEUA 063/17). Para tanto, três neonatos foram decapitados e tiveram seus encéfalos extraídos e alojados em tampão Flush (tampão fosfato sem cálcio e magnésio, pH 7,4, Cultilab), posteriormente, as meninges foram delicadamente removidas e a substância branca desprezada. Os córtices foram segmentados com microtesoura e colocados em tripsina 0,25% (Sigma-Aldrich) por dez minutos à temperatura de 37°C. Após, foi realizado bloqueio da ação da enzima com soro fetal bovino (SFB, Cultilab) e o sobrenadante foi centrifugado por dez minutos a 1.300 RPM. O precipitado foi homogeneizado com 1 mL de meio de cultura DMEM (meio de Eagle modificado por Dulbecco, Cultilab) adicionado com antibiótico 1% e SFB 10% e lançadas em garrafas de culturas de 25cm² (KASVI) cultivadas em incubadora (Nuare) a 37°C em atmosfera com 5 % de CO₂, com troca de meio realizada a cada 48 horas até atingirem 80% de confluência. Foram realizados três repiques a fim de purificar as culturas e, após o terceiro repique, as células foram descoladas com tripsina e semeadas em placas de 96 poços (10⁴ células por poço) para a realização dos tratamentos.

As células foram divididas em três grupos. O primeiro grupo foi o controle negativo (sem glutamato e sem pregabalina: G^{-/-}); o segundo grupo tratado com glutamato (G^{g/-}), e, o terceiro grupo foi tratado com pregabalina (G^{-p}).

3.2 Cultura de neurônios (linhagem CLU189)

A linhagem celular CLU189 (Origem: Banco de células do Rio de Janeiro) foi imortalizada a partir de neurônios hipotalâmicos de camundongos e doadas para a realização deste trabalho pelo Centro de Pesquisa em Obesidade e Comorbidades da Unicamp. Estas células expressam os mesmos receptores, enzimas e demais componentes biológicos

envolvidos no metabolismo do glutamato que neurônios primários, viabilizando sua utilização neste estudo.

As células foram descongeladas e após expansão da linhagem foram divididas em quatro grupos. O primeiro grupo foi o controle negativo (sem glutamato e sem pregabalina: $G^{-/-}$); o segundo grupo tratado com glutamato ($G^{g/-}$); o terceiro grupo foi tratado com pregabalina ($G^{-/p}$); e, o quarto grupo foi tratado concomitantemente com glutamato e pregabalina ($G^{g/p}$).

A fim de avaliar a resposta desse tipo celular ao glutamato exógeno, visto que demais linhagens neuronais apresentam especificidades quanto à concentração de glutamato necessária para o estabelecimento de um evento de excitotoxicidade (SUN, et al., 2010; HOUNOUM et al., 2016; DAR, et al., 2018), diferentes concentrações de glutamato foram testadas.

3.3 Cocultura astrócitos e neurônios

A fim de avaliar a ação da pregabalina em astrócitos em condições que simulem sua interação com neurônios *in vivo* foi utilizada cocultura entre astrócitos corticais e neurônios da linhagem CLU189. As células foram adicionadas ao mesmo tempo em placas de 96 poços na proporção de 1:2 (astrócito:neurônio). Após 24h de cultivo iniciaram-se os tratamentos.

3.4 Tratamentos

3.4.1 Teste para toxicidade ao glutamato

Após as células atingirem 90% de confluência, L-glutamato monossódico monohidratado (Synth) diluído em DMEM foi adicionado em diferentes concentrações. As concentrações utilizadas foram 100 μ M, 200 μ M, 400 μ M, 800 μ M, 1600 μ M, 3200 μ M, 62,5mM, 125mM, 25mM e 500mM para os neurônios; 100 μ M, 200 μ M, 250mM e 500mM para os astrócitos(alguns testes não mostrados); e, para as coculturas, foram usadas apenas as

concentrações de 250mM e 500mM. O tempo de tratamento foi de 24 horas. Essas concentrações foram escolhidas mediante consulta em literatura (JAYARAM et al., 2013) e testes pilotos em nosso Laboratório.

3.4.2 Teste para toxicidade à pregabalina

A administração de pregabalina (LyricaTM) foi em DMEM nas concentrações de 1mM, 47mM e 94mM (HENDRICH et al., 2012) para todas as culturas. O tempo de tratamento foi de 24h.

3.4.3 Interação pregabalina e glutamato sobre as células

O tratamento com pregabalina juntamente com o glutamato sobre os neurônios recebeu apenas a concentração de 1mM de pregabalina variando a concentração de glutamato entre 62,5mM e 500mM. Nas coculturas foram feitas associações entre glutamato (concentrações: 250mM e 500mM) e pregabalina (concentrações: 1mM e 47 mM).

3.5 Teste de viabilidade celular com Alamar Blue®

A resazurina, conhecida comercialmente por Alamar Blue (Invitrogen) é um indicador de oxidação-redução que pode ser reduzido intracelularmente permitindo uma avaliação da atividade celular metabólica. Assim, a análise da alteração por espectrometria do Alamar Blue é um método rápido, sensível e não-tóxico para analisar a viabilidade celular. Após os tratamentos previamente citados, foram adicionados às culturas 100µL de solução de DMEM com 10% de Alamar Blue. As placas foram incubadas no escuro a 37°C por 4 horas para permitir que a resazurina fosse convertida em resorufina. Após o período, foram realizadas as leituras de absorbância a 570 nm e 630 nm para determinar o percentual de redução conforme a fórmula:

$$\frac{(O2 \times A1) - (O1 \times A2)}{(O2 \times P1) - (O1 \times P2)} \times 100$$
 Em que O1 é o coeficiente de redução em 570nm (80586); O2 o coeficiente de redução em 630nm (34798); A1 é a absorbância do grupo experimental em 570nm; A2 é a absorbância do grupo experimental em 630nm; P1 é a absorbância do grupo controle (DMEM) em 570nm; A2 é a absorbância do grupo controle em 630nm.

Posteriormente aos cálculos foram feitas as médias e erro padrão dos grupos e gráficos foram plotados com os resultados e análises estatísticas para comparação entre os tratamentos.

3.6 Imunofluorescência

Após o estabelecimento dos tratamentos, o meio foi retirado, as células foram lavadas com PBS, fixadas com metanol gelado por 20 minutos e novamente lavadas. O excesso de PBS foi removido e em seguida, as células foram bloqueadas com PBS-SFB (10%, 0.02% Triton X-100) também em temperatura ambiente por uma hora.

As células foram marcadas com dois anticorpos primários: anticorpo monoclonal de cabra anti-GFAP (Santa Cruz, 1:100), e policlonal camundongo anti-sinaptofisina (Imuny, 1:100). Foram então incubadas a 4°C por 12 horas. GFAP é uma proteína de filamento intermediário de astrócitos, e por isso utilizada como marcador da atividade celular, enquanto a sinaptofisina é uma proteína da membrana das vesículas com neurotransmissores e está presente em neurônios. Posteriormente, as células foram lavadas e marcadas com o anticorpo secundário anti-coelho (AlexaFluor 594, vermelho) e anti-camundongo (AlexaFluor488, verde) (Jackson Laboratories, 1:300), e novamente incubadas em câmara escura, temperatura ambiente, por uma hora. Posteriormente, as células foram lavadas e acondicionadas em geladeira com glicerol/PBS (1:1). As culturas foram observadas e documentadas em microscópio de fluorescência (TS-100, Nikon) acoplado à câmera digital (Opticam 12MP).

4. RESULTADOS

4.1 Pregabalina e glutamato danificam astrócitos corticais, neurônios CLU189 e cocultura apenas em altas concentrações

O teste de viabilidade por Alamar Blue indicou um efeito dose-dependente para os tratamentos de glutamato e pregabalina em todas as culturas. Houve diminuição na porcentagem de células viáveis para os tratamentos de pregabalina nas concentrações de 47 e 94mM para todas as culturas. Já nos tratamentos de glutamato, isso ocorreu nas concentrações de 250 e 500mM para os astrócitos (glu100 μ M = média 108,2% de sobrevida celular; glu200 μ M = 103,5%; glu250mM = 98,3%; glu500mM= 76,6%; pgb1mM = 102,4%; pgb47mM = 85,8%; pgb94mM = 79,3%); e, somente na de 500mM nas culturas de CLU189 (glu62,5mM = média 103,3% de sobrevida celular; glu125mM = 93,4%; glu250mM = 91,07%; glu500mM= 77,6%; pgb1mM = 112,4%; pgb47mM = 84,1%; pgb94mM = 72,9%). Nas coculturas o mesmo padrão de resposta foi seguido, com toxicidade à concentração de 500mM de glutamato e às duas concentrações mais elevadas de pregabalina (glu250mM = média 102,2% de sobrevida celular; glu500mM= 74,9%; pgb1mM = 101%; pgb47mM = 93,7%; pgb94mM = 78,8%) (Figura 1).

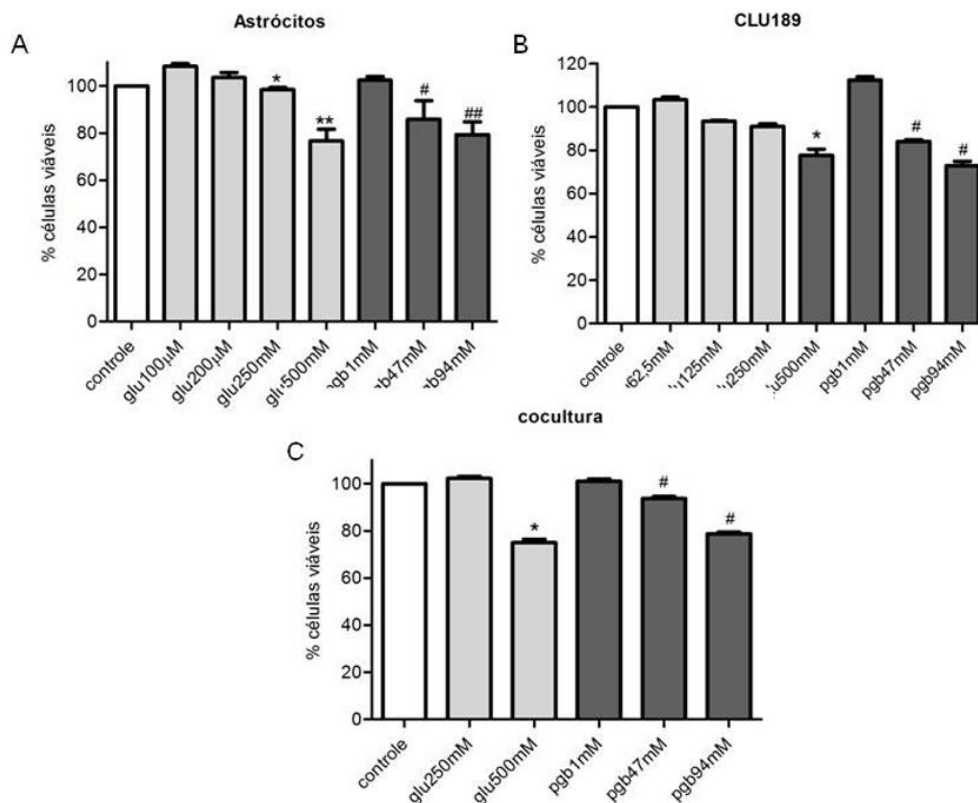


Figura 1: Teste de viabilidade celular em astrócitos (A), neurônios CLU189 (B) e (C) cocultura tratados com glutamato (barras cinza clara) ou pregabalina (barras cinza escura). Teste Anova com pós-teste de Bonferroni, testes realizados separados para os diferentes tratamentos: * ou # $P < 0,05$, ** ou ## $P < 0,01$, em relação ao controle (barra branca).

4.2 Pregabalina (1mM) não reverte a perda celular causada pela concentração exógena de glutamato na linhagem neuronal CLU189

O teste de viabilidade celular por Alamar Blue na linhagem neuronal CLU189 submetida a diferentes concentrações de glutamato e tratada com pregabalina na concentração de 1mM foi avaliada (Figura 2). Essa concentração foi escolhida visto que foi a única concentração testada da droga que não foi tóxica para os neurônios CLU189 (Figura 1B). Percebeu-se relação direta entre a concentração de glutamato e a perda celular, em concordância com os resultados anteriormente apresentados na Figura 1B. Portanto, pregabalina na concentração de 1mM parece não ter efeito nesses neurônios, ou o efeito é

insignificante, visto que o tratamento conjunto com a mesma não reduziu a perda celular esperada quando comparamos com os resultados apresentados na Figura 1B (glu125mM = média 93,4% de sobrevivência celular e glu125mM+pgb= 93,0%; glu250mM = 91,0% e glu250mM+pgb= 87,2%; glu500mM= 77,6% e glu500mM + pgb= 80,3%). Nesse último, apesar de existir uma diferença numérica de 3%, essa não foi significativa (Mann Whitney, $P = 0,33$).

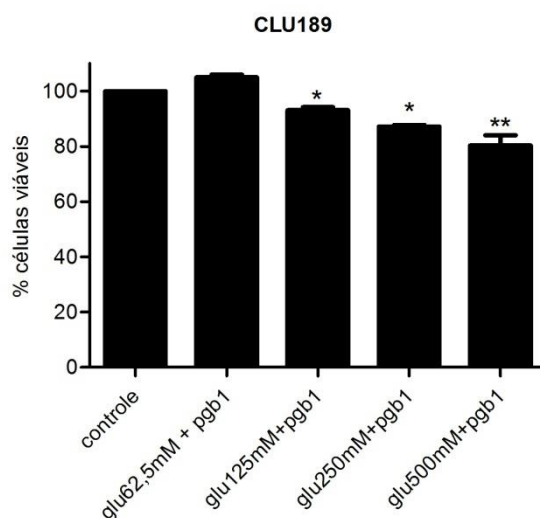


Figura 2: Teste de viabilidade celular em neurônios tratados com glutamato e pregabalina, concomitantemente. Teste Anova com pós teste de Bonferroni, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

4.3 Interação da pregabalina e glutamato em cocultura de astrócitos e linhagem neuronal CLU189

O teste de viabilidade celular por Alamar Blue na cocultura submetida a diferentes concentrações de glutamato e pregabalina concomitantemente foi avaliado (Figura 3A). Duas concentrações de glutamato foram testadas: 250 e 500 mM, visto que nos testes anteriores essas ocasionaram significativa perda celular, e apresentam assim, toxicidade. Duas concentrações de pregabalina também foram testadas: 1 e 47 mM. Apesar de ter sido testada anteriormente, não foi possível utilizar a concentração de 94 mM no tratamento conjunto com

glutamato, visto que essa foi a máxima concentração possível a partir da diluição da pregabalina em DMEM.

Avaliando a Figura 3A, percebe-se que de modo similar aos resultados apresentados anteriormente, a concentração de glutamato de 500mM foi mais tóxica do que a concentração de 250mM, mesmo quando associada a diferentes doses de pregabalina. Ao comparar o tratamento de glutamato 500 mM e pregabalina 47 mM (Figura 3A) com o resultado do glutamato 500mM sem pregabalina (Figura 3B), percebeu-se que a pregabalina 47mM não modifica a resposta ao glutamato. Ainda, continuando a comparar o gráfico da Figura 3B e a Figura 3A, notou-se que a pregabalina na concentração de 1 mM parece sensibilizar as células ao glutamato ou atuar junto, de alguma forma, com o glutamato causando mais perda celular. Pode-se conferir as médias dos grupos: glu250mM = média de sobrevida na cocultura de 102,2%, glu250mM + pgb 1mM = 98,6%, glu250mM + pgb 47mM = 87,0%(pgb1mM não foi tóxica para cocultura= 101,0%, pgb47mM= 93,7%) ; glu500mM = média de sobrevida na cocultura de 74,9%, glu500mM + pgb1mM = 43,7%, glu500mM + pgb47mM = 76,6%.

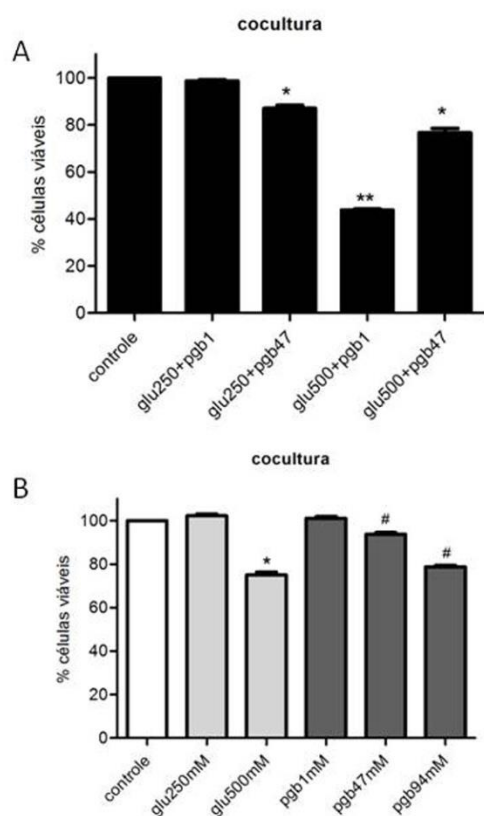


Figura 3: Teste de viabilidade celular em cocultura de neurônios da linhagem CLU189 e astrócitos corticais tratados com glutamato e pregabalina concomitantemente (A); e teste de viabilidade celular em cocultura tratada com glutamato (barras cinza clara) ou pregabalina (barras cinza escura). Teste Anova com pós teste de Bonferroni, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, em relação ao controle.

4.4 Expressão de GFAP e sinaptofisina nas coculturas

A expressão de GFAP (marcador de astrócitos, em verde) e sinaptofisina (marcador de neurônios, em vermelho) foi observada através da técnica de imunofluorescência nos grupos controle - células apenas com meio de cultura DMEM (Figura 4A), glutamato em concentração de 500mM (Figura 4B), pregabalina na concentração 1mM (Figura 4C), pregabalina na concentração de 47mM (Figura 4D), tratamento conjunto entre glutamato 500mM e pregabalina 1mM (Figura 4E), e, tratamento conjunto entre glutamato 500mM e pregabalina 47mM (Figura 4F) nas coculturas.

Percebeu-se uma variação no número total de células observadas condizente com os resultados obtidos nos testes de toxicidade. Dentre os tratamentos aplicados na cocultura, aqueles não tóxicos foram o grupo controle e o tratamento com pregabalina na concentração de 1mM (média de 101% de sobrevida celular), sendo, nesses grupos (Figura 4A e 4C) observados o maior número de células, tanto astrócitos quanto neurônios, quando comparados com os demais tratamentos. De modo similar, o tratamento mais tóxico, tratamento conjunto de glutamato 500mM e pregabalina 1mM (média de 43,7% de sobrevida celular), apresentou o menor número de células (Figura 4E). Os tratamentos com toxicidade moderada, glutamato 500mM (média de 74,9%), pregabalina 47mM (média de 93,7%), e glutamato 500mM e pregabalina 47mM (média de 76,6%), apresentaram quantidade de células intermediária comparado com os grupos já mencionados, também concordando com os resultados anteriores (Figuras 4B, 4D e 4F respectivamente).

Também foi possível comparar a morfologia das células de cada grupo, e ainda, relacionar com os resultados anteriores. Ao analisar a marcação por GFAP, percebeu-se que nos grupos cujo tratamento não foi tóxico (Figuras 4A e 4C), os astrócitos corticais apresentaram sua morfologia típica com vários prolongamentos citoplasmáticos (setas brancas na figura), semelhantes ao formato de uma estrela, enquanto que nos demais grupos,

apresentaram pouco ou nenhum prolongamento (cabeça de setas), e uma marcação mais intensa no corpo celular, podendo representar uma célula murchando, como ocorre no processo de morte. Esses resultados são condizentes com as características em condições de estresse ou patológicas, como por exemplo, excitotoxicidade glutamatérgica.

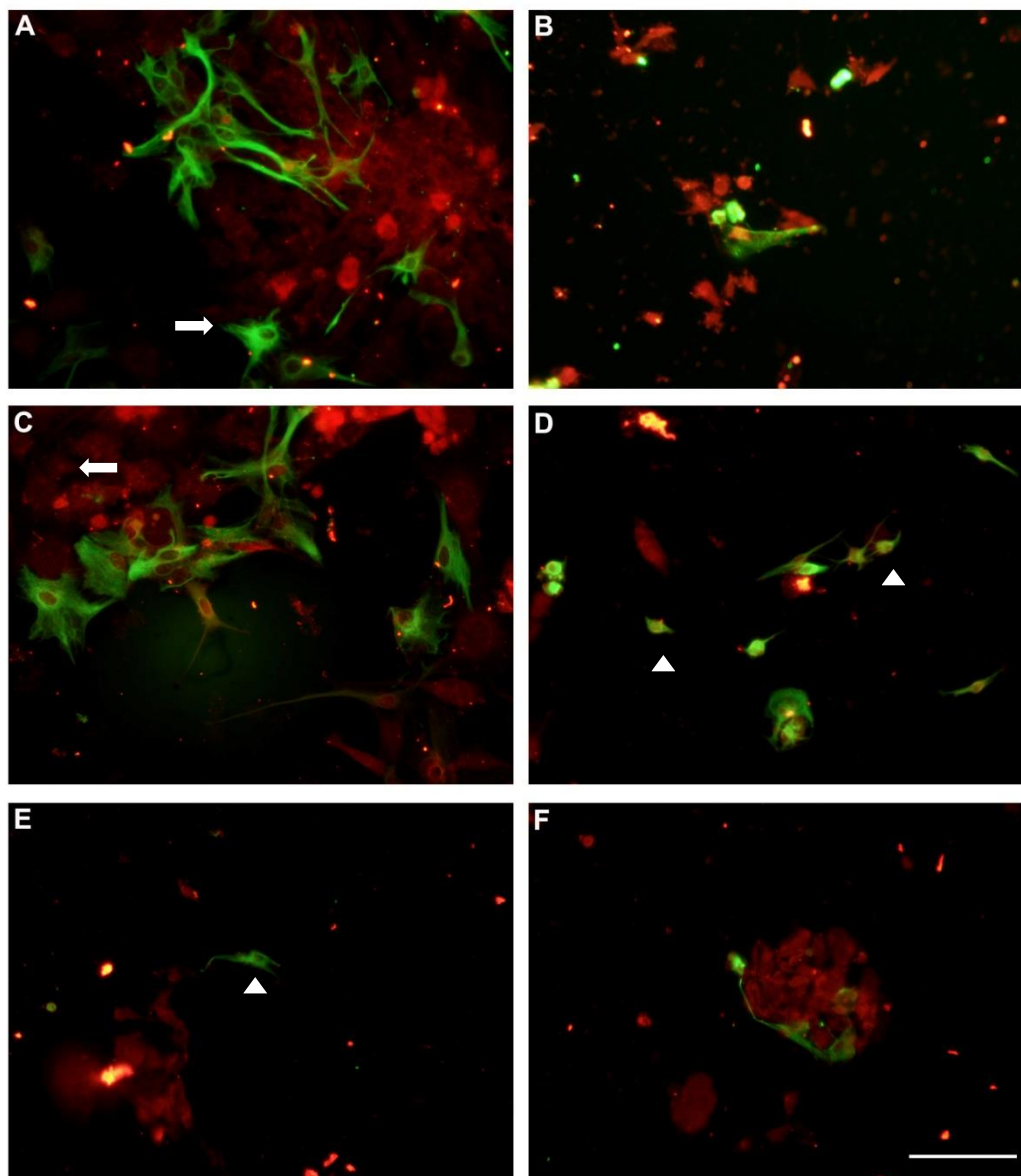


Figura 4: Expressão de GFAP e sinaptofisina nos diferentes tratamentos em cocultura. Astrócitos são mostrados em verde e neurônios CLU189 em vermelho. Grupo controle- DMEM (A), glutamato 500mM (B), pregabalina 1mM (C), pregabalina 47mM (D), tratamento conjunto entre glutamato 500mM e pregabalina 1mM (E), e tratamento conjunto entre glutamato 500mM e pregabalina 47mM (F). Escala = 100 μ M.

5. DISCUSSÃO

O presente trabalho mostrou que a pregabalina, em diferentes concentrações, não tem efeito protetor na toxicidade promovida pela adição de glutamato em cultura celular de astrócito e linhagem neuronal CLU189, não reduzindo a perda celular nessas condições. A concentração de glutamato extracelular suportada foi levemente diferente na cultura de astrócitos quando comparada à cultura da linhagem neuronal CLU189 e ao sistema de cocultura. Ocorreu perda celular significativa, caracterizando evento de toxicidade, na concentração de 250mM e 500mM para os astrócitos, mas apenas em 500mM para as outras duas culturas.

Adicionalmente, foi verificado que a pregabalina em altas concentrações oferece toxicidade às culturas, as concentrações de 47mM e 94mM ocasionaram significativa perda celular nos três tipos de cultura. A pregabalina em concentração não tóxica (1mM) não foi capaz de reverter a toxicidade ocasionada pelo glutamato adicionado em cocultura. O tratamento com o fármaco na concentração de 47 mM de glutamato não reduziu a perda celular ocasionada pelo glutamato na concentração de 500 mM, uma vez que a média de viabilidade celular sem a droga foi estatisticamente similar. Já na concentração de 1 mM, em conjunto com glutamato 500 mM, a pregabalina agravou a perda celular. Os resultados encontrados não são suficientes para confirmar se a pregabalina nas condições descritas age diretamente nos astrócitos, ou ainda, se seu mecanismo de ação ocorra via interação com os canais de cálcio dependentes de voltagem. Sugere-se a partir dos resultados obtidos, que a pregabalina parece atuar sensibilizando as células ao glutamato, ou, atuar em conjunto, de alguma forma, com o glutamato, amplificando seu efeito tóxico.

Na literatura existem raros registros do efeito da pregabalina em astrócitos, mas um deles, traz possíveis explicações para os resultados encontrados no presente estudo. Yoshizumi et al.(2012) mostraram que a gabapentina, fármaco análogo à pregabalina, induziu

a liberação de glutamato por astrócitos. Através da indução do aumento do cotransporte de glutamato e Na^+ pelos transportadores de glutamato presentes nos astrócitos, ocorreu a indução subsequente do influxo de cálcio nessas células, o que facilitou a liberação de glutamato Ca^{2+} - dependente pelos astrócitos. Considerando que os resultados do estudo aqui presente indicaram aumento da toxicidade quando a pregabalina é associada a altas concentrações de glutamato, esse efeito poderia ser explicado pela indução da liberação de glutamato ocasionada pela pregabalina, agravando o evento de excitotoxicidade.

Também foi possível visualizar no presente estudo a mudança morfológica nos astrócitos em cocultura cujos tratamentos eram tóxicos (glutamato em concentração de 500mM, pregabalina na concentração de 47mM, tratamento conjunto entre glutamato 500mM e pregabalina 1mM, e, tratamento conjunto entre glutamato 500mM e pregabalina 47mM). Nesses grupos, os astrócitos apresentaram pouco ou nenhum prolongamento, e uma marcação mais intensa no corpo celular, podendo representar uma célula murchando, como ocorre no processo de morte. Por outro lado, Reznikov et al. (2007) apontaram que essa atrofia dos astrócitos poderia estar relacionada a uma consequente diminuição na expressão dos transportadores de glutamato presentes nessas células, reduzindo a capacidade de retirada de glutamato do meio extracelular. Pode-se, então, também supor que a pregabalina quando atua junto ao glutamato corrobora para a diminuição da expressão de transportadores de glutamato nos astrócitos, agravando a toxicidade do glutamato e a perda celular.

Claramente existem questões a serem exploradas acerca da ação da pregabalina, em especial sua relação com o neurotransmissor glutamato. A capacidade dessa droga em ligar-se à subunidade auxiliar $\alpha 2-\delta$ dos canais de cálcio voltagem-dependentes do SNC não explica por si os efeitos clínicos da aplicação da droga, sugerindo mecanismos celulares de ação adicionais (LYNCH, et al., 2006). A fim de expandir os resultados aqui discutidos, e estudar em maior profundidade o efeito da pregabalina, um próximo passo seria realizar a

quantificação de glutamato no meio externo antes e depois do tratamento com pregabalina, tanto para culturas de astrócitos corticais quanto coculturas. Também seria condizente avaliar possíveis etapas do metabolismo do glutamato em que a pregabalina pode atuar, bloqueadores dos transportadores GLAST e GLT-1, dos canais de cálcio voltagem-dependentes e até mesmo dos diferentes receptores de glutamato poderiam ser utilizados para avaliar de modo mais preciso o mecanismo de ação da pregabalina em astrócitos submetidos à excitotoxicidade glutamatérgica.

Além disso, outras questões podem ser abordadas em estudos futuros para melhor compreensão dos dados apresentados. Considerando a importância da utilização de coculturas para melhor simulação da interação entre astrócitos e neurônios *in vivo*, pode-se utilizar neurônios primários ao invés de linhagens neuronais, uma vez que a última é mais resistente e apresenta sutis diferenças morfológicas e fisiológicas, que podem interferir nas respostas da célula frente a um estressor, ou, outras estratégias de cultivo celular, como culturas organotípicas (fatias de cérebro, medula espinhal, etc), ou, o tratamento *in vivo*. Través dessas diferentes técnicas, outras ferramentas de análises podem ser pensadas, como a técnica de voltametria ou microdiálise, sendo essa última mais comum e caracterizada pelo monitoramento de mudanças químicas no ambiente neuronal de murinos enquanto estão acordados e em movimento (MURAKAMI et al., 2015).

6. CONCLUSÕES

- Glutamato passa a ser tóxico para culturas de astrócitos corticais a partir de 250mM, enquanto que para neurônios hipotalâmicos imortalizados (CLU189) e sistema de cocultura isso ocorre a 500mM.
- Pregabalina passa a ser tóxica nas concentrações de 47 e 94 mM em culturas de astrócitos corticais, neurônios hipotalâmicos imortalizados (CLU189) e sistema de cocultura.
- Pregabalina em dose não tóxica (1mM) não reduz a perda celular ocasionada pela toxicidade ao glutamato.
- Em tratamento conjunto com glutamato 500mM, pregabalina (47 mM) diminuiu a perda celular quando comparada à ação da droga em menor concentração (1mM).
- Pregabalina na concentração de 1 mM parece atuar sensibilizando as células ao glutamato ou atuar junto, de alguma forma, com o glutamato, causando mais perda celular.

7. REFERÊNCIAS

- ANDERSON, C.M.; SWANSON, R.A. Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. **Glia**, v. 32, p. 1-14, 2000.
- BECERRA-CALIXTO, A.; CARDONA-GÓMEZ, G. P. The Role of Astrocytes in Neuroprotection after Brain Stroke: Potential in Cell Therapy. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 10, 2017.
- CUNNINGHAM, M. O.; WOODHALL, G. L.; THOMPSON, S. E.; DOOLEY, D. J.; JONES, R. S. G. Dual effects of gabapentin and pregabalin on glutamate release at rat entorhinal synapses in vitro. **European Journal of Neuroscience**, v. 20, n. 6, p. 1566–1576, 2004.
- CURTIS D.R.; JOHNSTON, G.A. Amino acid transmitters in the mammalian central nervous system. **ErgebPhysiol**, v. 69, p. 97–188, 1974.
- DAR, N. J.; SATTI, N. K.; DUTT, P.; HAMID, A.; AHMAD, M. Attenuation of Glutamate-Induced Excitotoxicity by Withanolide-A in Neuron-Like Cells: Role for PI3K/Akt/MAPK Signaling Pathway. **Molecular Neurobiology**, v. 55, n. 4, p. 2725–2739, 2018.
- DAVID, J. C.; YAMADA, K. A.; BAGWE, M. R.; GOLDBERG, M. P. AMPA receptor activation is rapidly toxic to cortical astrocytes when desensitization is blocked. **Journal of Neuroscience**, v. 16, n. 1, p. 200–209, 1996.
- EROGLU, Ç.; ALLEN, N. J.; SUSMAN, M. W.; et al. Gabapentin Receptor $\alpha 2\delta$ -1 Is a Neuronal Thrombospondin Receptor Responsible for Excitatory CNS Synaptogenesis. **Cell**, v. 139, n. 2, p. 380–392, 2009.
- ERRANTE, L.D.; PETROFF, O.A.C. Acute effects of gabapentin and pregabalin on rat forebrain cellular GABA, glutamate, and glutamine concentrations. **Seizure**, v. 12, p. 300-306, 2003.

FEHRENBACHER, J. C.; TAYLOR, C. P.; VASKO, M. R. Pregabalin and gabapentin reduce release of substance P and CGRP from rat spinal tissues only after inflammation or activation of protein kinase C. **Pain**, v. 105, n. 1, p. 133–141, 2003.

FINK, K.; MEDER, W.; DOOLEY, D.J.; GOTHERT, M. Inhibition of neuronal Ca^{2+} influx by gabapentin and subsequent reduction of neurotransmitter release from rat neocortical slices. **British Journal of Pharmacology**, v. 130, p. 900–906, 2000.

GLAUM, S.R.; HOLZWARTH, J.A.; MILLER, R.J. Glutamate receptors activate Ca^{2+} mobilization and Ca^{2+} influx into astrocytes. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.87, p. 3454–3458, 1990.

HANSSON, E.; MUYDERMAN, H.; LEONOVA, J.; ALLANSSON, L.; SINCLAIR, J.; BLOMSTRAND, F.; THORLIN, T.; NILSSON, M.; RONNBACK, L. Astroglia and glutamate in physiology and pathology: aspects on glutamate transport, glutamate-induced cell swelling and gap-junction communication. **Neurochemistry International**, v. 37, p. 317–329, 2000.

HENDRICH, J.; BAUER, C.S.; DOLPHIN, A.C. Chronic pregabalin inhibits synaptic transmission between rat dorsal root ganglion and dorsal horn neurons in culture. **Channels**, v. 6, p. 124–132, 2012.

HOUNOUM, B. M.; VOUREC'H, P.; FELIX, R.; et al. NSC-34 Motor Neuron-Like Cells Are Unsuitable as Experimental Model for Glutamate-Mediated Excitotoxicity. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 10, 2016.

HUTSON, S. M., BERKICH, D., DROWN, P., XU, B., ASCHNER, M. and LANOUE, K. F. Role of branched-chain aminotransferase isoenzymes and gabapentin in neurotransmitter metabolism. **Journal of Neurochemistry**, v. 71, p. 863–874, 1998.

JAYARAM, B.; KHAN, R.S.; KASTIN, A.J.; HSUCHOU, H.; WU, X.; PAN, W. Protective role of astrocytic leptin signaling against excitotoxicity. **J Mol Neurosci**, v. 49, p. 523-430, 2013.

KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; BRENNER, C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. **Physiol. Rev**, v. 87, p. 99–163, 2007.

KUMAR, N.; LAFERRIERE, A.; YU, J. S. C.; LEAVITT, A.; CODERRE, T. J. Evidence that pregabalin reduces neuropathic pain by inhibiting the spinal release of glutamate. **Journal of Neurochemistry**, v. 113, n. 2, p. 552–561, 2010.

LIETH, E., LANOUE, K. F., BERKICH, D. A.; XU, B.; RATZ, M.; TAYLOR, C.; HUTSON, S.M. Nitrogen shuttling between neurons and glial cells during glutamate synthesis. **Journal of Neurochemistry**, v. 76, p. 1712–1723, 2001.

LYNCH, J. J.; HONORE, P.; ANDERSON, D. J.; et al. (l)-Phenylglycine, but not necessarily other $\alpha 2\delta$ subunit voltage-gated calcium channel ligands, attenuates neuropathic pain in rats: **Pain**, v. 125, n. 1, p. 136–142, 2006.

MEHTA, A.; PRABHAKAR, M.; KUMAR, P.; DESHMUKH, R.; SHARMA, P.L. Excitotoxicity: bridge to various triggers in neurodegenerative disorders. **European Journal of Pharmacology**, v. 698, p. 6-18, 2013.

MICHEVA, K.D.; TAYLOR, C.P.; SMITH, S.J. Pregabalin reduces the release of synaptic vesicles from cultured hippocampal neurons. **Molecular Pharmacology**, v. 7, p. 467-476, 2006.

MORI, H.; MISHINA, M. Structure and function of the NMDA receptor channel. **Neuropharmacology**, v.34, p. 1219–1237, 1995.

MURAKAMI, G.; NAKAMURA, M.; TAKITA, M.; et al. Brain Rewarding Stimulation Reduces Extracellular Glutamate Through Glial Modulation in Medial Prefrontal Cortex of Rats. **Neuropsychopharmacology**, v. 40, n. 12, p. 2686–2695, 2015.

OLNEY, J.W. Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. **Science**, v. 164, p. 719-721, 1969.

OSTEN, P.; STERN-BACH, Y. Learning from stargazing: the mouse, the phenotype and the unexpected. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 16, p. 275-280, 2006.

PATEL, M. K.; GONZALEZ, M. I.; BRAMWELL, S.; PINNOCK, R. D.; LEE, K. Gabapentin inhibits excitatory synaptic transmission in the hyperalgesic spinal cord. **British Journal of Pharmacology**, v. 130, n. 8, p. 1731–1734, 2000.

REZNIKOV, L. R.; GRILLO, C. A.; PIROLI, G. G.; et al. Acute stress-mediated increases in extracellular glutamate levels in the rat amygdala: differential effects of antidepressant treatment: Stress-mediated glutamate efflux in the amygdala. **European Journal of Neuroscience**, v. 25, n. 10, p. 3109–3114, 2007.

ROTHSTEIN, J.D.; DYKES-HOBERG, M.; PARDO, C.A.; BRISTOL, L.A.; JIN, L.; KUNCL, R.W.; KANAI, Y.; HEDIER, M A.; WANG, Y.; SCHIELKE, J.P.; WELTY, D.F. Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. **Neuron**, v. 16, p. 675–686, 1996.

SILLS, G.J. The mechanisms of action of gabapentin and pregabalin. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 6, p. 108-113, 2006.

SUN, Z.-W.; ZHANG, L.; ZHU, S.-J.; CHEN, W.-C.; MEI, B. Excitotoxicity effects of glutamate on human neuroblastoma SH-SY5Y cells via oxidative damage. **Neuroscience Bulletin**, v. 26, n. 1, p. 8–16, 2010.

TAYLOR, C.P.; ANGELOTTI, T.; FAUMAN, E. Pharmacology and mechanism of action of pregabalin: The calcium channel $\alpha_2\text{-}\delta$ subunit as a target for antiepileptic drug discovery. **Epilepsy Research**, v.73, p. 137-150, 2007.

VAN HOOFT, J.A.; DOUGHERTY, J.J.; ENDEMAN, D.; NICHOLS, R.A.; WADMAN, W.J. Gabapentin inhibits presynaptic Ca² influx and synaptic transmission in rat hippocampus and neocortex. **Eur J Pharmacol**, v.449, p. 221–228, 2002.

VOLTERRA, A.; MELDOLESI, J. Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 6, p. 626-640, 2005.

YOSHIKUMI, M.; EISENACH, J. C.; HAYASHIDA, K. Riluzole and gabapentinoids activate glutamate transporters to facilitate glutamate-induced glutamate release from cultured astrocytes. **European Journal of Pharmacology**, v. 677, n. 1–3, p. 87–92, 2012.