



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA - UFSC
CENTRO TECNOLÓGICO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
QUÍMICA

ELIS CRISTINA ZANATTA

MENSURAÇÃO DOS NÍVEIS DE CÁLCIO INTRACELULAR A
PARTIR DE TÉCNICA DE FLUXO INTERROMPIDO.

FLORIANÓPOLIS
2014

Elis Cristina Zanatta

**MENSURAÇÃO DOS NÍVEIS DE CÁLCIO INTRACELULAR A
PARTIR DE TÉCNICA DE FLUXO INTERROMPIDO.**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina, para obtenção do Grau de mestre em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Leonel Teixeira
Pinto

Florianópolis
2014

Ficha de identificação da obra pelo autor, através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC

Zanatta, Elis Cristina

Mensuração dos Níveis de Cálcio Intracelular a partir de Técnica de Fluxo Interrompido / Elis Cristina Zanatta; orientador, Leonel Teixeira Pinto. – Florianópolis, SC, 2014.

119 p.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

Inclui referências

1. Engenharia Química. 2. Sinalização celular. 3. Cálcio. 4. células gliais. I. Pinto, Leonel Teixeira. II. Universidade Federal de Santa Catarina. III. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. IV. Título.

Elis Cristina Zanatta

**MENSURAÇÃO DOS NÍVEIS DE CÁLCIO INTRACELULAR A
PARTIR DE TÉCNICA DE FLUXO INTERROMPIDO**

Esta dissertação foi julgada adequada para obtenção do título de **Mestre em Engenharia Química**, área de concentração de **Desenvolvimento de Processos Químicos e Biotecnológicos**, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 07 de março de 2014.

Prof. Dr. Ricardo Antônio Francisco Machado
Coordenador do curso

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Leonel Teixeira Pinto
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Ricardo Antônio Francisco Machado
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Agenor Furigo Junior
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Rodrigo Bayni Leal
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Rodrigo Ribeiro Resende
Universidade Federal de Minas Gerais

Dedico este trabalho a meus pais,
meus pilares de sustentação e fontes
inesgotáveis de carinho e dedicação.

Dedico também à memória de minha
avó Jovita, que me deixou no decorrer
desta caminhada, mas sei que olha por
mim todos os dias!

AGRADECIMENTOS

Dizem que “se tudo na vida fosse alegria, as pessoas não dariam valor à felicidade. Que às vezes é preciso chorar para sabermos o quanto é bom sorrir; é preciso sentir saudade para saber o quanto gostamos de alguém e que quando temos tudo, nada parece ter valor (...)” (Autor Desconhecido). É guiada por estes dizeres que agradeço a todos que me fizeram chorar, sorrir, sentir saudade, dar valor e perceber o meu valor. E, neste trabalho:

Em primeiro lugar, a DEUS! Pela presença constante em minha vida; pelos amparos nas horas de desespero, e, por não permitir que minhas derrotas fossem maiores que minhas vitórias.

A minha mãe por seu amor incondicional, força, amizade e estímulo. Por me emprestar os ouvidos religiosamente todos os dias durante o decorrer de todo o curso; por me mostrar que sou capaz de ir muito mais além do que imagino e que minha capacidade não termina no limite de minhas forças.

A meu pai pelo amor, carinho, colo, compreensão e preocupação. Por me levantar em todas as minhas quedas; por secar todas as minhas lágrimas; e por ter o dom de ser o MELHOR PAI DO MUNDO...

A meu irmão, com certeza meu maior incentivador. Por ter me apresentado outra face da Engenharia Química. Obrigada também pelas broncas; críticas; ensinamentos; paciência, compreensão; por não facilitar as coisas que eu tinha de resolver, fazendo com que eu as conquistasse por meus próprios merecimentos; pelas aulas de cálculo e principalmente pelas lições de psicologia nos momentos em que eu me sentia mais incapaz, frágil e desencorajada. Você com certeza é um dos MAIORES RESPONSÁVEIS POR ESTA CONQUISTA.

A meus avós maternos que mesmo de longe, nunca deixaram de se preocupar comigo e torcerem pelo meu sucesso!!!

A meus avós paternos que espiritualmente me acompanham e guiam!!!

Ao professor, Dr. Leonel Teixeira Pinto, pela dedicação, orientação, compreensão e, sobretudo, pela coragem em aceitar o desafio de trabalhar com alguém que não tinha base nenhuma de engenharia.

Aos professores Doutores Rodrigo Ribeiro Resende; Rodrigo Bayni Leal, Agenor Furigo Junior e Ricardo Antônio Francisco

Machado pela disponibilidade e honra em terem aceitado analisar este trabalho.

A professora Dra. Andreza de Bem e sua orientanda Lara Clemes, pelas células e no auxílio com a preparação das mesmas.

Ao Daniel Dambrowski por ter “embarcado” comigo no desafio de fazer o equipamento funcionar, por todo auxílio no decorrer das experiências e por todas as gargalhadas.

Ao Edevilson Silva por todo apoio e dedicação.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro.

A todos os companheiros de jornada do Laboratório de Neuroengenharia Computacional (Neurolab) da UFSC, pela agradável convivência e por tornar o dia-dia no laboratório mais divertido.

A todos os meus amigos, por aturarem bravamente minhas crises rotineiras de mau humor, por serem compreensivos, por embarcarem nas minhas insanidades, e batalharem arduamente pra levantar o meu astral nos momentos mais difíceis.

De modo singelo agradeço a todos que se envolveram com este estudo. Muito obrigada por não me deixarem desistir, apesar de todos os contratemplos que surgiram no decorrer desta caminhada.

Ando devagar
Porque já tive pressa
E levo esse sorriso
Porque já chorei demais

Cada um de nós compõe a sua história
Cada ser em si
Carrega o dom de ser capaz
E ser feliz

(Almir Sater e Renato Teixeira, 1990)

RESUMO

Dotadas de um sistema complexo de comunicação, as células nervosas representam o modo com o qual o cérebro pode se comunicar com as mais diversas partes do corpo. O córtex cerebral apresenta sua citoarquitetura composta por neurônio, células gliais (incluindo os astrócitos) e fibras. O modo tradicional de comunicação nervosa é a sinapse, e, assim como os neurônios, a partir destas, as células gliais também podem se comunicar entre si. Tendo nos íons cálcio seu modo de transmitir a informação, o astrócito, ao término da cadeia de eventos bioquímicos, reage liberando gliotransmissores. Partindo-se destes conhecimentos, este trabalho desenvolveu um estudo experimental para melhor elucidar o processo de captação de íons cálcio por astrogliomas após o emprego de um estímulo glutamatérgico. O experimento foi realizado utilizando-se cultura de células de glioma C6; solução contendo cálcio; glutamato monossódico e o indicador de cálcio fluorescente FURA-2/AM. A aquisição dos dados foi realizada em equipamento de misturador de fluxo interrompido, *stopped flow mixer*, capaz de produzir dados de concentração de cálcio no interior das células, utilizando para tal fluorescência. O tratamento estatístico dos dados foi realizado através das ferramentas média e desvio padrão. Para a interpretação global dos mesmos, utilizou-se autores que pudessem estabelecer relações pertinentes sobre a temática, de modo a comprovar a influencia do neurotransmissor glutamato no processo de captação de íons cálcio por astrogliomas, além da análise da viabilidade da metodologia proposta para tal.

Palavras-chave: sinalização celular; cálcio; células gliais.

ABSTRACT

Nerve cells are endowed with a complex communication system. They represent the main way of communication between the brain and others parts of the body. The cerebral cytoarchitecture is composed by neuron, glial cells (including astrocytes) and fibers. The traditional mode of nervous communication is the synapse. Like neurons, glial cells also employ the synapse to communicate ones with each others. Using calcium ions like way of transmitting information, the astrocyte, in the end of the biochemical events chain, reacts by releasing gliotransmitters. Knowing that, this research developed an experimental study to elucidate the process of calcium uptake by astroglomas after a glutamatergic stimulation. The experiment was executed by using a culture of C6 glioma cells; calcium solution; monosodium glutamate and fluorescent calcium indicator Fura-2/AM. Data acquisition was performed in a "stopped-flow mixer", a device able to obtain data from concentration of calcium inside cells by fluorescence measurement. The data statistical treatment was done by employing mean and standard deviation. The overall interpretation of the results made use of authors able to establish relevant links about the subject, in order to prove the influence of the neurotransmitter glutamate in the uptake of calcium ions by astroglomas, besides assessing the feasibility of the proposed study methodology.

Keywords: cell signaling; calcium; glial cells.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Componentes de uma célula.	31
Figura 2. Conteúdo aproximado dos principais eletrólitos no líquido corporal.	33
Figura 3. Constituintes de um neurônio.	34
Figura 4. Neurônio.	36
Figura 5. Células gliais.	38
Figura 6. Sinapses química e elétrica.	43
Figura 7. Representação de uma sinapse química.	45
Figura 8. Representação esquemática de uma sinapse glutamatérgica.	48
Figura 9. Sinapse Tripartite.	49
Figura 10. Rota cerebral do glutamato.	56
Figura 11. Captação de glutamato dependente de Na^+	58
Figura 12. Ciclo glutamato-glutamina.	60
Figura 13. Equipamento SFM-4000/S.	68
Figura 14. Mecanismo de aquisição de dados empregado pelo SFM-4000/S.	76
Figura 15. MOS-200.	77
Figura 16. Curvas obtidas na experiência-teste.	80
Figura 17. Componentes envolvidos para aquisição de $R_{\text{máx}}$	84
Figura 18. Componentes envolvidos para aquisição de R	85
Figura 19. Componentes envolvidos para aquisição de R_{min}	86
Figura 20. Fluorescências máxima, mínima e após estímulo glutamatérgico ao longo do tempo para concentração de cálcio de 3M.	88
Figura 21. Fluorescências máxima, mínima e após estímulo glutamatérgico ao longo do tempo para concentração de cálcio de 4M.	88
Figura 22. Fluorescências máxima, mínima e após estímulo glutamatérgico ao longo do tempo para concentração de cálcio de 5M.	89
Figura 23. Fluorescências máxima, mínima e após estímulo glutamatérgico ao longo do tempo para concentração de cálcio de 6 M.	89
Figura 24. Fluorescências máxima, mínima e após estímulo glutamatérgico ao longo do tempo para concentração de cálcio de 7 M.	90
Figura 25. Ampliação do gráfico de variação da fluorescência ao longo do tempo para uma concentração de cálcio de 7M.	91
Figura 26. Relações matemáticas das fluorescências mensuradas para cálculo da concentração de cálcio.	93

Figura 27. Captação de Ca^{2+} ao longo do tempo para uma concentração de cálcio de 3M.....	95
Figura 28. Captação de Ca^{2+} ao longo do tempo para uma concentração de cálcio de 4M.....	96
Figura 29. Captação de Ca^{2+} ao longo do tempo para uma concentração de cálcio de 5M.....	96
Figura 30. Captação de Ca^{2+} ao longo do tempo para uma concentração de cálcio de 6M.....	97
Figura 31. Captação de Ca^{2+} ao longo do tempo para uma concentração de cálcio de 7M.....	97
Figura 32. Captação de Ca^{2+} ao longo do tempo para todas as concentrações de cálcio.....	99

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPA – ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico
AMPc – adenosina 3'-5' monofosfato cíclico
ATP - adenosina trifosfato
ATPase - adenosina trifosfatase
Ca²⁺ - íon cálcio
DAG - diacilglicerol
DMEM – “Dubelcco’s Modified Eagle Medium” (meio de cultura)
DNA – ácido desoxirribonucleico
EAAC – carreador de aminoácido excitatório
EAAT – transportador aminoácido excitatório
EGTA - ácido tetracético etilenoglicol (nomenclatura IUPAC: ácido bis-(2-aminoetil)etilenoglicol-NNN’N’-tetracético)
FURA-2/AM - nomenclatura IUPAC Acetoxymethyl 2-[5-[bis[(acetoxymethoxy-oxo-methyl)methyl]amino]-4-[2-[2-[bis[(acetoxymethoxy-oxo-methyl)methyl]amino]-5-methylphenoxy]ethoxy]benzofuran-2-yl]oxazole-5-carboxylate
GLAST – transportador de glutamato e aspartato
GLT-1 – transportador de glutamato - 1
GLU – glutamato (IUPAC: sodium (2S)-2-amino-5-hydroxy-5-oxo-pentanoate)
GLuRs – subunidade do receptor ionotrópico de glutamato do tipo não-NMDA
GMPc – monofosfato cíclico de guanosina
GTP – guanosina trifosfato
H⁺ATPase (V-ATPase) – bomba de protóns
iGLuR – receptor glutamatérgico ionotrópico
IP₃ – inositol trifosfato
K⁺ - íon potássio
L-glutamato - glutamato monosódico
LEC - líquido extracelular
LIC - líquido intracelular
mGLuR – receptor glutamatérgico metabotrópico
Milli-q – água deionizada e destilada
Na⁺ - íon sódio
NCS-1 – sensor de cálcio neuronal - 1
NMDA – N-metil D-Aspartato
PBS – tampão fosfato salino
PKC – proteína quinase C

PMCA – bomba de cálcio da membrana plasmática

R - razão 340/380 obtidas a partir de estímulo glutamatérgico

R_{máx} - razão 340/380 sob condições de cálcio saturado

R_{min} - razão 340/380 sob condições de cálcio livre

RyR – canal receptor rianodínico

SERCA – bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático

TRITON X-100 – nomenclatura IUPAC 2-[4-(2,4,4-trimethylpentan-2-yl)phenoxy]ethan-1-ol)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
2. OBJETIVOS	27
2.1 Objetivo Geral:.....	27
2.2 Objetivos Específicos:.....	27
3. REVISÃO DE LITERATURA	29
3.1 CONCEITOS BÁSICOS	29
3.1.1 Células	29
3.1.2 Células do sistema nervoso	33
4. COMUNICAÇÃO CELULAR	41
4.1 SINAPSE	43
4.1.1 Sinapse Química	45
4.1.2 Sinapse Química Glutamatérgica	47
4.1.3 Sinapse Tripartite	49
4.2 COMPONENTES ENVOLVIDOS NA SINAPSE TRIPARTITE	50
4.2.1 Íons cálcio	51
4.2.2 Glutamato	53
5. SINALIZAÇÃO POR ÍONS CÁLCIO	61
5.1 SINALIZAÇÃO DE CÁLCIO EM NEURÔNIOS	61
5.2 SINALIZAÇÃO DE CÁLCIO EM CÉLULAS GLIAIS	62
5.3 ONDAS DE CÁLCIO	63
6. METODOLOGIA	67
6.1.1 Materiais	67
6.1.2 Métodos	71
6.2 METODOLOGIA DE ANÁLISE DOS DADOS	78
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO	79
7.1 RESULTADOS ENCONTRADOS EM TERMOS DE FLUORESCÊNCIA	86
7.2 RESULTADOS ENCONTRADOS EM TERMOS DE CONCENTRAÇÃO DE CÁLCIO	92
8. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	101
9. CONSIDERAÇÕES FINAIS	103
REFERÊNCIAS	105
APÊNDICE	117

1. INTRODUÇÃO

O corpo humano é uma extraordinária obra-prima de força, organização, eficiência e complexidade. Trabalhando incessantemente do nascer à morte, esta máquina é capaz de crescer; se locomover; reconstruir peças danificadas; adequar-se a condições ambientais; combater agressores externos e manter uma unidade de funcionamento integrado que poucas máquinas apresentam.

Tida como unidade morfofuncional do corpo, as células corporais, segundo Sampaio (2013), correspondem a menor porção de matéria viva capaz de atuar de maneira autônoma. Enquanto existem organismos microscópicos formados por apenas uma única célula; há animais e plantas que são formados por muitos milhões delas organizadas em tecidos e órgãos. Responsáveis pela execução de todas as funções vitais de um organismo e pela perpetuação da espécie, as células acabam por constituir todos os sistemas fisiológicos.

Dentre os sistemas fisiológicos existentes no corpo humano, o sistema nervoso é um dos que mais aguça a curiosidade científica, uma vez que seu órgão central, o cérebro, é fascinante, enigmático e relativamente pouco conhecido. Segundo Araque e Navarrete (2010), o cérebro pode ser entendido como sendo um conjunto de células primorosamente organizadas em uma estrutura altamente refinada. Subdividido em cinquenta e duas áreas corticais, o cérebro, tem sua citoarquitetura composta basicamente por neurônios; células gliais e fibras nervosas. Pesa aproximadamente 1,4 Kg; o que, segundo Bohler et al (2010, p.12) representa 2% da massa corporal total de um ser humano. Devido sua intensa atividade, este órgão absorve aproximadamente 20% do oxigênio que entra no organismo quando em repouso, além de consumir 20% da glicose do organismo tendo, por não criar reservas nutricionais e possuir elevada demanda metabólica, 2/3 de sua glicose sendo renovada a cada minuto. Araque e Navarrete (2010) reforçam ainda que a função do cérebro no organismo animal é ser um processador da informação recebida a partir do ambiente por meio de sua atividade própria e, para a elaboração de diferentes respostas biológicas executadas pelos diferentes órgãos efetores.

A maneira encontrada pelo sistema nervoso para se comunicar com as mais diversas partes corpóreas existentes chama-se sinapse. Sinapse pode ser entendida como um espaço existente entre um neurônio e outro, sendo importante para a modulação dos impulsos que aí seguem. Heneine (2003, p. 220) coloca que existem vários tipos de

sinapses, sendo que “em todo tipo de sinapse há uma junção da parte terminal de um axônio de uma célula pré-sináptica, com os dendritos ou a soma de uma célula pós-sináptica” (HENEINE, 2003, p. 220). Ainda segundo o mesmo autor, “a transmissão da informação é feita através de um mediador químico (na grande maioria das sinapses), ou através de contato elétrico” (HENEINE, 2003, p.220). Há ainda as sinapses ditas mistas, onde temos a condução da informação sendo realizada de modo químico e elétrico.

Durante muito tempo acreditou-se que a sinapse era uma “conversa” restrita a dois neurônios; contudo, hoje se sabe que este fenômeno é muito mais complexo; envolvendo uma tríade, no qual também participa a célula glial astrocitária - fenômeno este popularmente conhecido como sinapse tripartite. Segundo Araque e Navarrete (2010), numerosos estudos foram realizados acerca de tal temática durante os últimos anos; e, por meio deles, pode-se acreditar na existência de uma sinalização bidirecional entre astrócitos e neurônios. Wade et al (2001), por sua vez, corroboram com tal afirmação ao salientarem que embora as células astrocíticas não possam provocar a propagação de potenciais de ação, elas também podem se comunicar fazendo isto de forma bidirecional com outros astrócitos e neurônios através da liberação de transmissores e da propagação de ondas de cálcio. Os autores ainda reforçam que a interação dos receptores de membrana presentes nos astrócitos com o neurotransmissor glutamato conduz imediatamente a uma elevação transitória nos níveis intracelulares de cálcio astrocítico, representando, deste modo, um dos meios mais conhecidos de excitação em astrócitos. Como resposta a elevação de cálcio, os astrócitos acabam por responder a tal estímulo liberando diferentes substâncias neuroativas: os gliotransmissores. Os gliotransmissores, por sua vez, são os responsáveis pela modulação da transmissão sináptica, agindo tanto nos receptores pré como nos pós-sinápticos.

Haja vista a complexidade do evento salienta-se a importância da realização de mais estudos nesta área. Sendo assim, este trabalho foi elaborado com objetivo de melhor entender a dinâmica existente no processo de sinapse tripartite que ocorre na transmissão de informação no cérebro humano, mensurando, para isso, a captação de íons cálcio por astrogliomas. A realização deste trabalho procura englobar não somente a visão da engenharia química frente a um processo fisiológico, mas na realidade unir conhecimentos multidisciplinares; visando, deste modo, construir um entendimento uniforme da temática.

O estudo de tal temática ganha força dada a dificuldade de encontrar referências literárias; principalmente no que tange a dados numéricos extraídos de metodologias experimentais. Reforçando a relevância de se realizar tal estudo, Goldberg et al (2010), lembram que ainda hoje vários aspectos da sinalização de cálcio em astrócitos permanecem por serem elucidados.

2. OBJETIVOS

A luz dos conhecimentos previamente explicitados delineou-se os seguintes objetivos para este trabalho de pesquisa:

2.1 Objetivo Geral:

Mensurar a captação de cálcio por astrogliomas a partir de um estímulo glutamatérgico.

2.2 Objetivos Específicos:

- Observar se ao acrescentar glutamato em cultura de astrócitos haverá elevação intracelular dos íons cálcio, verificando, deste modo, o envolvimento dos receptores glutamatérgicos;
- Elaborar um protocolo experimental para a aquisição dos dados em equipamento de fluxo interrompido;
- Analisar a viabilidade do uso da metodologia escolhida para o estudo proposto.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 CONCEITOS BÁSICOS

3.1.1 Células

Tal como o átomo é a unidade fundamental da matéria; a célula é a unidade fundamental da vida. Aliás, é a menor unidade da vida; e como tal, precisa desempenhar várias funções para garantir sua sobrevivência.

Composta basicamente por moléculas de água; moléculas orgânicas e inorgânicas e envoltório de membrana semipermeável, a maioria das células são invisíveis aos olhos humanos. Segundo Cardoso, Matos e Costa (s.d), usualmente são classificadas em relação a sua estrutura celular, podendo, portanto ser procariotas (pequenas e apresentam estrutura simples) ou eucariotas (maiores e com o material genético envolto por uma membrana que forma um órgão esférico importante: o núcleo). “Apesar das muitas diferenças de aspecto e função, todas as células estão envoltas pela membrana plasmática; que encerra uma substância rica em água: o citoplasma” (SOUZA, 2000).

Carvalho e Pimentel (2007) destacam ainda que as células podem apresentar estrutura e forma variadas, geralmente associadas a especializações funcionais. A maioria das células, especialmente de organismos vivos multicelulares, exibe forma fixa e típica. Dentre as células com forma fixa, existem aquelas em que a forma é regular: seja esférica (óvulo); prismática (células vegetais); ou irregular típica (neurônios; astrócitos e as células caliciformes). A tabela a seguir apresenta algumas das partes que compõem uma célula; e a figura subsequente como estas partes se encontram dispersas nas células.

Tabela 1. Partes que compõem uma célula (continua).

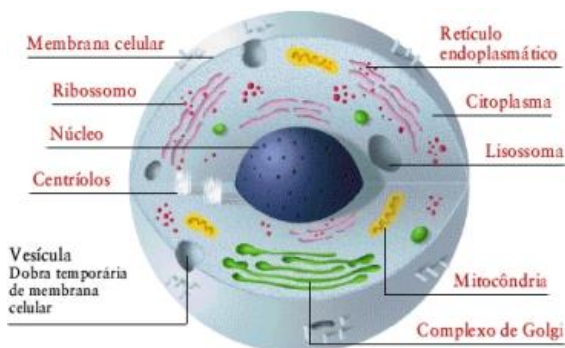
PARTE CELULAR	FUNÇÃO
Núcleo	Órgão mais importante. Esférico, está rodeado por uma membrana dupla. Sua interação com o citoplasma acontece através de orifícios chamados poros nucleares. Em seu interior têm-se as moléculas de DNA e proteínas. É responsável pelo controle da síntese proteica no citoplasma.
Citoplasma	Espaço celular compreendido entre a membrana plasmática e a membrana nuclear nos eucariotos. Região onde contêm um fluido viscoso: o citosol. É considerado um colóide, onde estão imersas as organelas celulares.
Citoesqueleto	Rede de filamentos proteicos do citosol que se encarrega de manter a estrutura e forma da célula. É responsável por muitos movimentos celulares.
Mitocôndrias	Organelas produtoras de energia.
Retículo endoplasmático	Sistema de comunicação interna das células formado por várias membranas. Pode ser rugoso (tem por função sintetizar proteínas) e liso (sintetiza lipídeos; colesterol e hormônios esteroides; além de ser o principal reservatório de cálcio das células).

Tabela 1. Partes que compõem uma célula (conclusão).

Aparelho de Golgi	Tem por função receber as moléculas formadas no retículo endoplasmático; transformar e dirigi-las para diferentes lugares da célula.
Lisossomo	Contém as reservas de enzimas necessárias a digestão celular de várias moléculas indesejáveis.
Ribossomo	É através dele que os aminoácidos se conciliam para produzir as proteínas.
Centríolos	Constituição do fuso cromático durante o mecanismo de divisão celular; forma os cílios e flagelos.

Fonte: Diversas.

Figura 1. Componentes de uma célula.



Fonte: Webciência (2011).

Aproximadamente 60% do peso de um adulto comum são representados por líquido (água e eletrólitos), ficando ele localizado ou no espaço intracelular, armazenando cerca de dois terços do líquido

corporal; ou no espaço extracelular, sendo este dividido nos espaços intravascular, intersticial e transcelular. (Smeltzer e Bare, 2005). Correa (2000) ressalta que diante de tal porcentagem de água existente em seu interior, a célula tem que dispor de sistemas que mantenham em equilíbrio essa quantidade, tendo, como princípio elementar de funcionamento, as relações das concentrações de íons e proteínas entre os meios extra e intracelular.

Os líquidos corporais são ricos em substâncias químicas ativas: os eletrólitos. Estes por sua vez, são formados por cátions e ânions. Os principais cátions nos líquidos corporais são os íons sódio, potássio, cálcio, magnésio e hidrogênio; já; os principais ânions são os íons cloreto, bicarbonato, fosfato, sulfato e proteinato. A tabela a seguir, demonstra que os principais eletrólitos no líquido intracelular (LIC) são potássio e fosfato; por sua vez, os íons sódio, superam muito os outros cátions no líquido extracelular (LEC). A concentração de sódio é maior no LEC que no LIC, e, por causa disso, o sódio tende a entrar na célula por difusão. Segundo Smeltzer e Bare (2005), essa tendência é contrabalanceada pela bomba de sódio e potássio, que se localiza na membrana celular e movimentada ativamente o sódio da célula para dentro do LEC.

Figura 2. Conteúdo aproximado dos principais eletrólitos no líquido corporal.

Eletrólitos	MEQ/L
Líquido extracelular	
Cátions	
Sódio (Na)	142
Potássio (K)	5
Cálcio (Ca ⁺⁺)	5
Magnésio (Mg ⁺⁺)	2
Total de cátions	154
Ânions	
Cloreto (Cl ⁻)	103
Bicarbonato (HCO ₃ ⁻)	26
Fosfato (HPO ₄ ⁻)	2
Sulfato (SO ₄ ⁻)	1
Ácidos orgânicos	5
Proteinato	17
Total de ânions	154
Líquido intracelular	
Cátions	
Potássio (K ⁺)	150
Magnésio (Mg ⁺⁺)	40
Sódio (Na ⁺)	10
Total de cátions	200
Ânions	
Fosfatos e sulfatos	150
Bicarbonato (HCO ₃ ⁻)	10
Proteinato	40
Total de ânions	200

Fonte: Smeltzer; Bare (2005).

3.1.2 Células do sistema nervoso

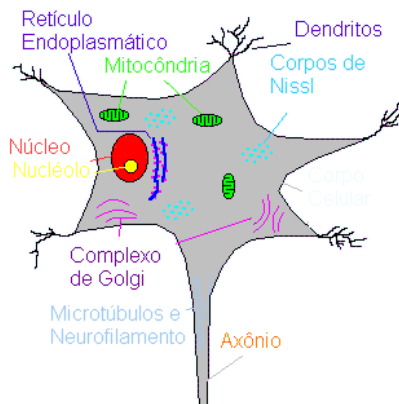
No sistema nervoso diferenciam-se basicamente duas linhagens celulares: os neurônios e as células da glia. Conceitualmente credita-se ao neurônio o título de unidade funcional básica do cérebro. Segundo Vilela (s.d) os neurônios são as células responsáveis pela recepção e transmissão dos estímulos do meio (interno e externo), possibilitando ao organismo a execução de respostas adequadas para a manutenção da homeostasia. O outro tipo de célula nervosa existente no sistema nervoso, as células da neuroglia, ajudam na sustentação, proteção e nutrição dos neurônios; além de estarem intimamente ligadas ao processamento intelectual.

3.1.2.1 Neurônio

Existindo em diferentes formas e tamanhos, os neurônios são as células mais antigas e longas do corpo humano. De acordo com Chudler

(s.d) sua constituição básica é semelhante à de outras células (figura 3); uma vez que também estão envoltos por uma membrana plasmática; possuem um núcleo com genes; citoplasma; mitocôndrias; retículo endoplasmático; além de apresentarem processo de produção de energia e síntese de proteínas.

Figura 3. Constituintes de um neurônio.



Fonte: Portal São Francisco (s.d)

Os neurônios são células de origem ectodérmica; capazes de transmitir sinais elétricos. A “Society for Neuroscience” (2008, p.06) traz que se trata de uma célula especializada designada para transmitir informação para outras células nervosas, músculos ou células glandulares.

Para Antunes (2002, p. 01), a capacidade de condução elétrica dos neurônios se dá pela passagem de correntes iônicas através de poros (canais) presentes em sua membrana. Estes poros possuem diâmetro variável, apresentando um valor médio de 0,8 nm. Heneine (2003, p.203), por sua vez, salienta que estes canais podem possuir tanto carga positiva, quanto carga negativa, ou ainda serem destituídos de carga elétrica. Ainda segundo a mesma fonte, a natureza da carga é o que seleciona os íons: canais positivos repelem cátions (+) e deixam passar ânions (-); já os canais negativos, por sua vez, repelem ânions (-) e deixam passar cátions (+).

Há ainda canais mais sofisticados que possuem, além da barreira da carga, um ou dois “portões” que se abrem sob comando. O canal de

sódio (Na^+), por exemplo, é deste tipo. Neste caso, o “portão” fica fechado durante o potencial de repouso e se abre durante o de ação.

Segundo Heneine (2003, p.203)

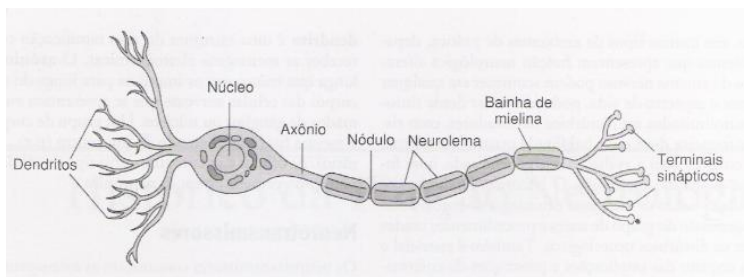
Nos canais com carga, não passam substâncias sem carga, porque esses canais estão sempre ocupados. Há também poros sem carga. Os canais sem carga não devem ser considerados como um orifício permanentemente aberto, e sim como uma flutuação mecânica de moléculas vicinais. Essas moléculas se afastam pela pressão das substâncias que possuem passe livre através da membrana.

Para que seja possível reunir e comunicar informações, o cérebro dispõe de aproximadamente 100 bilhões neurônios; células estas responsáveis em conferir a coloração acinzentada ao córtex. Cada célula neuronal é constituída por um corpo celular (soma); um dendrito e um axônio. Segundo Smeltezer e Bare (2005, p. 1927):

O dendrito é uma estrutura do tipo ramificação com sinapses para receber as mensagens eletroquímicas. O axônio é uma projeção longa que transporta os impulsos para longe do corpo celular (envia os impulsos para outras células nervosas). Ao corpo das células nervosas cabe todas as atividades metabólicas do neurônio, além de receber informações de outros neurônios vizinhos, através de conexões sinápticas.

O tamanho e a forma dos neurônios são variáveis, mas normalmente apresentam a mesma subdivisão.

Figura 4. Neurônio.



Fonte: Smeltzer; Bare (2005).

Até pouco tempo, não se acreditava que as células neuronais pudessem se renovar. Atualmente sabe-se que assim como outras células corporais, os neurônios também se “reproduzem”. A produção de novas células no cérebro compete as células-tronco neurais. Para tal, elas se dividem periodicamente em duas áreas cerebrais principais: os ventrículos e o hipocampo. Ao se proliferarem, as células-tronco neurais originam outras células-tronco neurais e precursores neurais que, ao se desenvolverem, podem tornar-se tanto neurônios como células de apoio (células gliais).

Durante a formação humana, no início da embriogênese cerebral, os neurônios se deslocam livremente sendo guiados para percursos gerais por instruções genéticas. Há os neurônios que ficam vagando; há os que sofrem divisão; há os que morrem e há ainda os que se instalam em seus sítios permanentes. Quando alocados em tais sítios, eles estabelecem relações com neurônios adjacentes e assim constroem uma complexa rede de circuitos. “Uma vez instalados em seu lar final, os neurônios desenvolvem dendritos e axônios para se comunicarem com outros dendritos e axônios. Os tentáculos alastram-se na direção uns dos outros, mas não se tocam, pois estão separados por um pequeno intervalo chamado de fenda sináptica” (ALVARENGA, 2010).

A estrutura do neurônio normalmente reflete sua função. Segundo Castro (2006), as funções dependem basicamente da forma que o neurônio assume, além do tipo de conexão que ele faz. Uma parte da célula recebe sinais que chegam, enquanto outras geram sinais para outros neurônios. Os neurônios são células excitáveis que pode comunicar-se com: outros neurônios; músculos e glândulas; e seu fluxo de informações é sempre unidirecional.

Segundo, a Enciclopédia Conhecer (2000, p. 25), “os neurônios não trabalham de forma isolada; muito pelo contrário, trabalham em equipe, sendo justamente desta cooperação que surge toda a complexidade do sistema nervoso, e, sobretudo de seu órgão principal, o cérebro”. Através das células nervosas cerebrais, conseguimos a ligação das vias motora e sensorial, o monitoramento dos processos do corpo, resposta aos ambientes interno e externo, a manutenção da homeostasia e a direção de toda a atividade psicológica, biológica e física por meio de complexas mensagens químicas e elétricas. (Smeltezer e Bare, 2005, p. 1927).

3.1.2.2 Neuroglia

As células gliais, ou neuroglia, foram descritas pela primeira vez em 1946 por Virchow, no qual acreditava que estas eram meramente componentes de suporte estrutural para as células neuronais e, conseqüentemente para o sistema nervoso. Anos mais tarde, porém, técnicas mais apuradas de biologia celular começaram a conferir novo status às chamadas células da glia.

Christante (2010, p.18) coloca que

Conforme sugere o próprio nome, o foco da neurociência sempre esteve nos neurônios, células responsáveis por originar e propagar impulsos elétricos. Nos últimos anos, porém, novas funções da glia emergiram, de tal forma que já não é mais possível ignorar sua importância para o funcionamento cerebral.

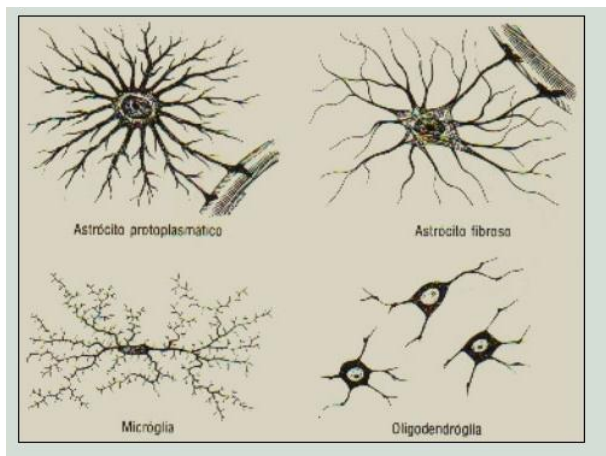
Atualmente, através de técnicas de imagem, descobriu-se que estas células com formato de estrela desempenham função de extrema relevância para o sistema nervoso, influenciando diretamente na formação das sinapses e auxiliando a determinar quais conexões neurais se fortalecerão ou enfraquecerão com o tempo (Fields, 2002).

Hoje em dia o termo glia serve para designar cinco tipos de células muito distintas que formam o sistema nervoso central; sendo que delas, os astrócitos são os mais abundantes e conhecidos. Há algumas características que são cruciais para a diferenciação de células neuronais e gliais. Entre estas se destacam a incapacidade das células da glia de formarem contatos sinápticos e a habilidade de dividirem-se ao longo da

vida (Raine, 1994, apud Antunes, 2002, p. 02). Além do fato de que a membrana das células gliais não são excitáveis, possuem um potencial de repouso mais negativo que os dos neurônios; e maior permeabilidade a íons potássio (K^+). (Barres, 1991 apud Antunes, 2002, p. 03).

A neuroglia é dividida em três grupos principais: micróglia (de origem mesodérmica); a macróglia (de origem ectodérmica), composta por astrócitos e oligodendrócitos; e, as células endoteliais (glia radial), também de origem ectodérmica, responsáveis pelo revestimento dos ventrículos cerebrais e do canal central da medula espinal. (Raine, 1998 apud, Antunes, 2002, p. 03).

Figura 5. Células gliais.



Fonte: Machado (2000).

A micróglia corresponde a uma população de células fagocíticas que são recrutadas após lesões, infecções, convulsões e doenças neurodegenerativas. Originadas de macrófagos, as células microglias permanecem quiescentes até que sejam mobilizadas por uma série de situações adversas (infecções ou traumas) e uma vez ativadas desempenham funções semelhantes a macrófagos. (Chien e Vetter, 2005; Kandel e Squire, 2000 apud Arantes, 2009, p. 26).

3.1.2.2.1 Astrócitos

Células gliais mais abundantes e com maior diversidade funcional no cérebro, os astrócitos possuem uma capacidade altamente dinâmica de alterar seu fenótipo (plasticidade) no decorrer da vida (Shao e McCarthy, 1994 apud Karl, 2000, p.13).

Encontradas no encéfalo e na medula espinhal; apresentam prolongamentos que se estendem de um corpo central, e estão em contato com capilares; neurosomias; axônios; sinapses e outras células gliais. Habitualmente são classificados em dois grupos: fibrosos (localizados na substância branca) e protoplasmáticos (localizados na substância cinzenta). Contudo, Ninnerjahn (2009), ressalta que se têm ainda os astrócitos radiais que compreendem as células de Müller na retina e a glia de Bergmann no cerebelo; os astrócitos velados que compõem o bulbo olfativo e o cerebelo; bem como tipos especiais de astrócitos encontrados exclusivamente em certas espécies, tal como os astrócitos interlaminares presentes no córtex de primatas superiores.

Atualmente, segundo Nardin (2006, p.10), a estimativa é que cada astrócito possa fazer contato com até 140 mil sinapses e, da mesma forma, retornar o sinal para múltiplas sinapses (Allen e Barres, 2005 apud Nardin, 2006, p.10). Trata-se de células excitáveis que contribuem, além de tudo, para plasticidade neuronal, uma vez que podem responder a mudanças do meio extracelular. Para Christante (2010, p. 21) um cérebro sem astrócitos não funcionaria bem, uma vez que “eles participam ativamente da formação, diferenciação e funcionamento das sinapses em todas as fases do desenvolvimento cerebral” (CHRISTANTE, 2010, p. 21).

4. COMUNICAÇÃO CELULAR

Em organismos multicelulares, é essencial que as células se comuniquem, possibilitando, deste modo, ações coordenadas. (Fernandes, 2004). A comunicação celular envolve pelo menos duas células: a que libera a molécula sinalizadora e a que tem receptores específicos para a molécula sinalizadora liberada. Fernandes (2004) ressalta que essa comunicação se dá através de moléculas que uma determinada célula produz e coloca no meio extracelular para serem então percebidas pelas outras células.

Para Furlan (s.d)

Uma célula não pode responder a um sinal químico se ela não contém o receptor apropriado para aquele sinal. Um mesmo sinalizador pode ter subtipos diferentes de receptores em diferentes células-alvo. A resposta da célula-alvo ao sinalizador depende do subtipo de receptor e da natureza funcional da célula.

A partir da meia vida da célula e de quais células possuem receptores para determinado sinal, pode-se chegar a diferentes modalidades de sinalização, conforme pode ser visto na tabela 2.

Tabela 2. Modalidades de sinalização celular (continua)

TIPO DE SINALIZAÇÃO	DESCRIÇÃO
Parácrina	Molécula sinalizadora tem vida curta e os receptores estão em células próximas. Neste caso, a molécula sinalizadora é chamada de mediador local.
Autócrina	Molécula sinalizadora tem vida curta e o receptor está na própria célula que emitiu o sinal.
Dependentes de contato	Molécula sinalizadora não é secretada, ficando exposta na superfície da célula sinalizadora. Compete à célula-alvo estabelecer contato para que o receptor possa se ligar.
Endócrina	Molécula sinalizadora tem vida longa. É lançada na corrente sanguínea e vai atingir células-alvo em locais distantes. Neste caso, a molécula sinalizadora recebe o nome de hormônios.
Neuronal	Caso especial de sinalização entre células. Neste caso, a molécula sinalizadora (neurotransmissor) viaja grandes distâncias, mas não pela corrente sanguínea ou meio extracelular; e sim dentro dos prolongamentos celulares dos neurônios, indo atingir as células-alvo longe do corpo celular do neurônio que emitiu o sinal, mas próximo do axônio onde a molécula sinalizadora foi secretada.

Fonte: Fernandes (2004).

Fernandes (2004) alerta ainda que quando o receptor celular recebe a molécula sinalizadora, ele invariavelmente muda sua conformação; sendo justamente esta mudança conformacional a grande responsável pelo repasse da informação.

4.1 SINAPSE

“A principal via de comunicação entre os neurônios são as sinapses”. (LENZ, 1996, p. 3). Sinapse pode ser entendida como espaço existente entre um neurônio e outro, sendo importante para a modulação dos impulsos que aí seguem. As sinapses atuam de forma seletiva na transmissão do impulso nervoso, além de direcionar cada um desses impulsos para o local de atuação.

Em condições normais duas células nervosas se associam estabelecendo contato entre o dendrito de uma e o axônio de outra. Quando ocorre tal comunicação, as duas células nervosas não se tocam verdadeiramente; sendo a distância que as separa, correspondente à quinquagésima milésima parte de um milímetro.

Heneine (2003, p. 220) coloca que existem vários tipos de sinapses, sendo que “em todo tipo de sinapse há uma junção (FIGURA 6) da parte terminal de um axônio de uma célula pré-sináptica, com os dendritos ou a soma de uma célula pós-sináptica”. (HENEINE, 2003, p. 220). A transmissão da informação é feita através de um mediador químico (na grande maioria das sinapses), ou através de contato elétrico. Heneine (2003, p.220) lembra que existem ainda as sinapses mistas, onde temos a condução química e elétrica.

Figura 6. Sinapses química e elétrica.

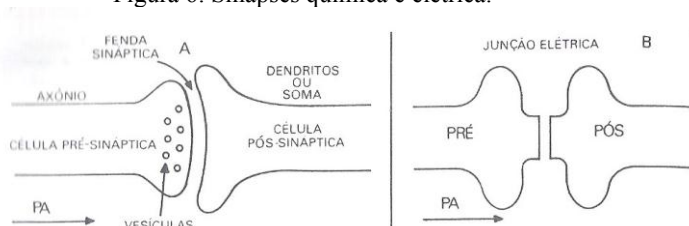


Fig. 13.13 – Sinapses – A – Química; B – Elétrica.

Fonte: Heneine (2003).

Segundo a “Society for Neuroscience” (2008, p.06) em uma sinapse, o sinal neuronal é transmitido por impulsos elétricos ao longo

de seus axônios; sendo que um dos fatores envolvidos na determinação da velocidade do processamento do sinal é a presença ou não de uma camada gordurosa sobre os axônios: a bainha de mielina.

Ainda segundo a mesma fonte, o impulso nervoso, conforme já comentado, envolve a abertura e fechamento de canais iônicos, que possuem permeabilidade seletiva. É através deles que os íons devem passar para entrar ou sair da molécula. O fluxo destes íons acaba por criar uma corrente elétrica que produz pequenas variações de tensão através da membrana celular do neurônio.

A capacidade de um neurônio para gerar um impulso elétrico dependerá de uma diferença de carga entre o interior e o exterior da célula. O potencial de ação, por sua vez passará ao longo da membrana do axônio a uma velocidade de até várias centenas de quilômetros por hora. Desta forma, um neurônio pode ser capaz de disparar impulsos várias vezes a cada segundo. (“Society for Neuroscience”, 2008, p.06).

Ao atingir o fim de um axônio, estas variações de tensão podem desencadear a liberação de neurotransmissores, mensageiros químicos do cérebro. Os neurotransmissores são liberados em terminais nervosos, e difundidos em todo o espaço intrasináptico até se ligarem a receptores específicos presentes na superfície da membrana pós-sináptica. Esses receptores agem como interruptores para a próxima célula. Cada receptor tem um mensageiro químico particular. Assim como no modelo enzimático conhecido como “chave-fechadura”, eles funcionam somente quando determinado neurotransmissor encaixa em determinado receptor.

Segundo Bohler et al (2010) no total, o cérebro abriga cerca de dez trilhões de sinapses, que permitem a cada neurônio se conectar a outros dez mil de seus companheiros. Os neurônios que não estão em contato direto uns com os outros, recorrem a intermediários, que são as moléculas químicas chamadas de neurotransmissores; para transmitir o impulso nervoso na direção dos neurônios vizinhos.

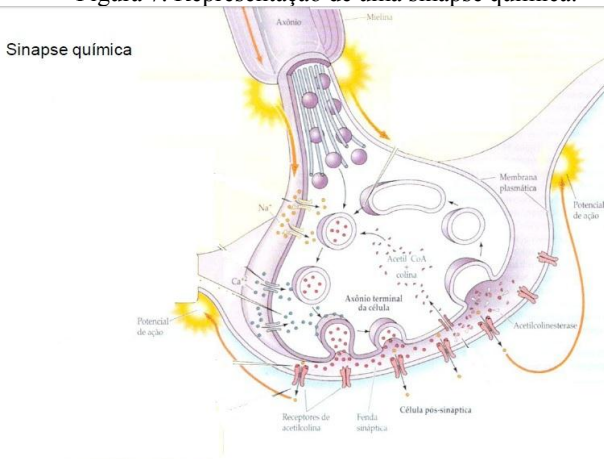
Conforme comentado, dois são os principais tipos de sinapses, podendo ser classificadas em químicas (transmissão de informações entre duas células através de uma substância química - neurotransmissores) e elétricas (transferência de corrente iônica e

metabólitos entre duas células acopladas). Contudo, neste trabalho abordar-se-á somente a sinapse química; uma vez que este é o tipo de sinapse envolvido na sinalização celular por cálcio.

4.1.1 Sinapse Química

Para se abordar tal temática, considerar-se-á aqui o modelo básico de sinapse química, onde se tem um neurônio pré e um pós-sináptico separados fisicamente por um espaço denominado fenda sináptica. Nesta modalidade de transmissão de informação para que a mensagem possa se propagar de um neurônio a outro, se faz necessário à participação de moléculas intermediárias: os neurotransmissores. Após a liberação dos neurotransmissores para a fenda, parte destas moléculas transmissoras vão acoplar/interagir com receptores presentes na membrana do neurônio pós-sináptico; e, outra parte delas vão interagir com os astrócitos; uma vez que estas células estreladas também possuem receptores de membrana.

Figura 7. Representação de uma sinapse química.



Fonte: Purves (2002).

O início deste modelo de transmissão de informação se dá ao haver a chegada de um impulso nervoso em um botão pré-sináptico. Como resposta a este estímulo, canais de sódio presentes na membrana deste neurônio irão abrir ocasionando a despolarização de toda a membrana pré-sináptica; o que acaba por gerar uma mudança

conformacional na membrana neuronal, que, por sua vez, gerará a abertura de canais voltagem-dependentes de cálcio, fazendo com que o cálcio que está presente no líquido extracelular entre na célula. Uma vez dentro da célula, os íons cálcio irão interagir com a membrana de vesículas sinápticas que se localizam no interior da célula. (Lopes et al, 1999).

As vesículas sinápticas são estruturas repletas de neurotransmissores, substância esta necessária para que a mensagem possa ser propagada até o próximo neurônio. Para que as vesículas liberem tais substâncias é necessário haver a ação de três proteínas SNARE: sintaxinas; SNAP-25 e as sinaptobrevinas (Merlo et al, 2011, p.161). Além destas proteínas há ainda a participação de proteínas reguladoras adicionais, cuja função é aumentar a precisão da exocitose. Dentre estas proteínas reguladoras destaca-se a proteína sinapsina; uma vez que ela está envolvida na formação do “pool” de reserva de vesículas requeridas para a transmissão sináptica. Contudo, Oliveira (2007) lembra que para que isto ocorra faz-se necessário que haja a fosforilação desta proteína; sendo este processo dependente da entrada dos íons cálcio na célula. Em outras palavras somente quando há a fosforilação das sinapsinas é que as vesículas poderão se movimentar em direção a membrana neuronal para fusão e liberação dos transmissores.

Guyton e Hall (2006, p.560) salientam que a quantidade de neurotransmissor que será liberado é proporcional à quantidade de cálcio que entra na célula pré-sináptica; sendo que uma vez liberado, o neurotransmissor deverá se difundir menos de 100 nm para atingir a célula alvo (receptores específicos presentes na membrana pós-sináptica); processo este que ocorre em menos de um milissegundo.

Oliveira (1994, p. 27) por sua vez lembra que uma vez na fenda sináptica, o neurotransmissor pode ter vários destinos, sendo a interação com o receptor na membrana pós-sináptica apenas uma dentre as várias possibilidades. Dentre os diferentes fins que a substância transmissora liberada pode ter, ainda segundo a mesma fonte, destaca-se: a) poder difundir-se para fora e ser carregado pela circulação local; b) poder sofrer ataque por enzimas extracelulares, degradando-as; c) poder ser recapturado e bombeado de volta para o terminal pré-sináptico para ser reutilizado; d) ou, poder ligar-se a receptores pré ou pós-sinápticos dando início a sucessão de eventos que culminam com o aparecimento de um potencial pós-sináptico excitatório ou inibitório, com alteração do processo de liberação ou secreção de um hormônio.

Uma vez ligado ao receptor, a célula pós-sináptica reage abrindo determinados canais de membrana; podendo basicamente ser canais de sódio (gerará despolarização na célula pós-sináptica) ou canais de potássio ou cloro (gerará hiperpolarização na célula). Heneine (2003, p.220) e “Sanofi Aventis” (2007) corroboram ao afirmarem que se o neurotransmissor envolvido neste processo for, por exemplo, o glutamato, haverá abertura dos canais de cálcio e conseqüente despolarização da membrana da célula pós-sináptica. A propagação da despolarização na célula pós-sináptica acaba por disparar um potencial de ação na membrana adjacente; fazendo com que, deste modo, haja a propagação da mensagem.

Faz-se necessário aqui ressaltar, conforme previamente comentado, que além de interagir com o neurônio pós-sináptico, o neurotransmissor e o ATP liberados durante uma sinapse irão interagir também com os astrócitos. Os astrócitos, do mesmo modo que os neurônios possuem receptores de membrana, que uma vez ativados permitirão que haja influxo de cálcio do líquido extracelular para o citoplasma destas células. Deste modo, tem-se início o fenômeno de dissipação de ondas de cálcio entre astrócitos e conseqüente participação desta célula na transmissão de informação; constituindo-se, deste modo, o que se denomina de sinapse tripartite (assunto este que será abordado mais adiante).

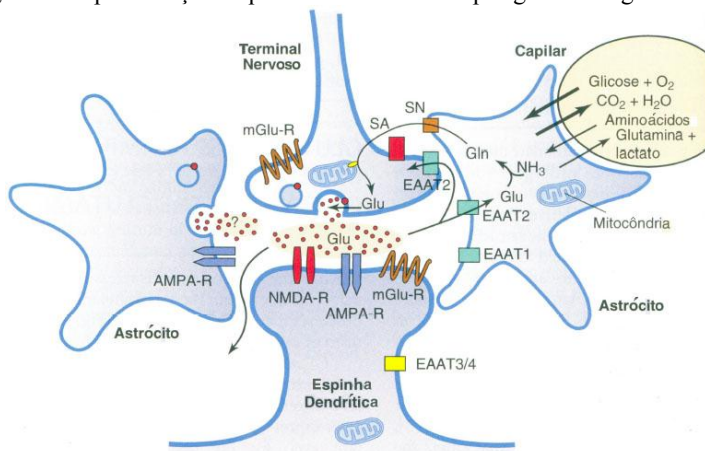
4.1.2 Sinapse Química Glutamatérgica

Desde a década de 50, as ações excitatórias do glutamato são conhecidas. Seu envolvimento direto com o desenvolvimento neural, a plasticidade sináptica, o aprendizado, a memória, o dano neuronal pós-isquemia ou hipoglicemia, a epilepsia e outras doenças neurodegenerativas constantemente vem sendo estudados. Segundo Carobrez (2003, p. 53) apesar da estimativa de que aproximadamente 50 bilhões de neurônios teriam capacidade para produzir o glutamato, somente nos anos 70 ficou comprovado seu papel como transmissor químico.

Com níveis neurais altos (10 mM) e constantes, este aminoácido está envolvido em vários processos bioquímicos. No que se refere a suas ações específicas como neurotransmissor, o glutamato é sintetizado nos terminais pré-sinápticos, a partir da glutamina, devido a ação da enzima glutaminase. Entretanto, também pode provir do α -cetogluturato, via glutamato desidrogenase e α -cetogluturato aminotransferase. (Schousboe et al, 1997 apud Martini, 2006, p. 08). O glutamato

sintetizado é armazenado, acoplado a um H^+ -ATPase (V-ATPase), num “pool” vesicular através da atividade de transportadores vesiculares independentes de Na^+ (Fykse e Fonnum, 1996 apud Martini, 2006, p. 09). Quando um impulso nervoso chega ao terminal pré-sináptico ocorre despolarização dos terminais liberando o glutamato presente nas vesículas para fenda sináptica por exocitose dependente da concentração de cálcio citosólico (Nicholls e ATwell, 1990 apud Martini, 2006, p. 09). Uma vez na fenda o glutamato começa a interagir com seus receptores na membrana pós e também nas membranas gliais (FIGURA 8).

Figura 8. Representação esquemática de uma sinapse glutamatérgica.



A figura 8 ilustra a liberação de glutamato para fenda sináptica após a chegada de um impulso nervoso. Uma vez na fenda tal neurotransmissor começou a interagir com seus receptores (GluRs) localizados nas membranas pós-sinápticas e também nas membranas gliais, como ilustra a figura acima. Pode-se observar os receptores AMPA, NMDA e mGluR; além dos transportadores EAAT1, EAAT2 e EAAT4 capturando o glutamato extracelular. Adaptado de: Basic Neurochemistry (2006).

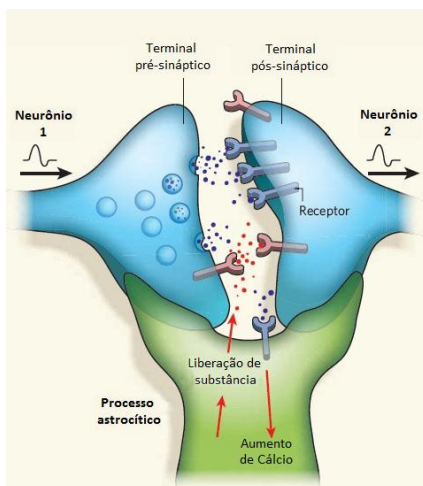
Convém ressaltar que os receptores glutamatérgicos controlam a maioria das ações do glutamato no sistema nervoso central, fato este que também será discutido posteriormente.

4.1.3 Sinapse Tripartite

Sinapse em três partes (tripartite) pode ser entendida como sendo uma sinapse onde se tem três protagonistas envolvidos no evento: os neurônios pré e pós-sinápticos e a célula glial. Até certo tempo, acreditava-se que as sinapses eram reduzidas a uma “conversa” envolvendo somente dois neurônios; contudo, atualmente sabe-se que na realidade o que ocorre é uma conversa em triângulo do qual também participa o astrócito.

Este fenômeno, conforme pode ser visto na figura seguinte, envolve: o axônio do neurônio pré-sináptico liberando transmissores para ativar ou inibir a atividade de um neurônio pós-sináptico. Contudo, o neurotransmissor liberado pelo neurônio emissor da mensagem interage não só com os receptores de membrana no neurônio pós-sináptico, como também com os receptores de membrana presentes nos astrócitos. Segundo Nimmerjahn (2009) “os astrócitos expressam uma grande variedade de receptores que lhes permite perceber as alterações na composição do fluido extracelular. Muitos hormônios diferentes e transmissores, incluindo glutamato e ATP, estimulam a elevação de cálcio” (FIACCO & MCCARTHY, 2006 apud NIMMERJAHN, 2009).

Figura 9. Sinapse Tripartite.



Adaptado de: Allen e Barres (2009).

Normalmente, ao se abordar a sinapse tripartite, acaba-se por trabalhar com transmissão glutamatérgica; uma vez que o glutamato é o neurotransmissor excitatório mais comumente empregado nas sinapses. Neste caso, “(...) quando o glutamato é liberado na fenda sináptica, parte dele interagirá com receptores no neurônio pós-sináptico e parte interagirá com os receptores presentes na membrana dos astrócitos” (WADE et al, 2001). Segundo Vieira, Souza e Kapczinski (2002, p. 198), quando em contato com os receptores dos astrócitos, o glutamato gera uma despolarização na célula; o que acaba por induzir a um aumento nos níveis de cálcio intracelular; uma vez que, assim como nos neurônios, a despolarização astrocitária acaba ativando os canais de cálcio presentes na membrana, permitindo, deste modo, que haja influxo de cálcio para estas células. Este fenômeno é popularmente chamado de “ondas de cálcio”.

Segundo Nardin (2006, p.10) a extensão do sinal de cálcio astrocítico intracelular está diretamente ligada ao nível de atividade sináptica; ou seja; em baixos níveis de atividade sináptica, o sinal de cálcio permanece espacialmente restrito a um processo astrocítico e em altos níveis de atividade sináptica, o sinal de cálcio se propaga para outros processos astrocíticos em contato com diferentes neurônios, astrócitos, microglia ou células endoteliais (Fellin e Carmignoto, 2004 apud Nardin, 2006, p.11). Duas são as hipóteses mais aceitas atualmente para explicar a dissipação de tais ondas; conteúdo este que será abordado mais adiante por este trabalho.

4.2 COMPONENTES ENVOLVIDOS NA SINAPSE TRIPARTITE

Elementos químicos estão presentes em grande parte dos lugares; incluindo, portanto, como não poderia deixar de ser, também os seres vivos e seus processos bioquímicos. Vários são os elementos químicos envolvidos na gênese do processamento de informação, contudo, na sinapse tripartite dois deles ganham especial destaque: o cálcio e o glutamato.

O ácido glutâmico; ou simplesmente glutamato; é um dos aminoácidos que compõem as proteínas dos seres vivos. De fórmula molecular $C_5H_9NO_4$ e massa molar de 147,13 g/mol, o glutamato desempenha importante papel na transmissão rápida, cognição, memória, movimento e sensação. Já o cálcio, por sua vez, foi isolado pela primeira vez no ano de 1808 pelo químico britânico Humphry Davy, sendo este processo conseguido através da eletrólise de uma amalgama de mercúrio e cal. Trata-se de um íon metálico que atua como

segundo mensageiro nas células e controla uma grande variedade de funções celulares.

4.2.1 Íons cálcio

O cálcio é o quinto mineral mais abundante no organismo, atingindo de 1,5 a 2,0% da massa corpórea. Segundo Franco (2006, p.232), este mineral tem inúmeras funções para o organismo humano, estando envolvido desde a ativação de enzimas, como, por exemplo, a adenosina trifosfatase (ATPase); até a manutenção da normalidade metabólica e ativação de diversos processos metabólicos; como a transmissão de sinais nas células nervosas.

Segundo Pimentel (2003, p.02), a concentração extracelular de cálcio é de aproximadamente 5M; já a concentração intracelular oscila entre 0,1 e 10 μ M. “Apesar do estabelecimento deste gradiente eletroquímico transmembranar favorável, o cálcio tem sua entrada na célula restringida, uma vez que este processo é mediado por canais e transportadores específicos existentes na membrana plasmática celular” (PIMENTEL, 2003, p.02).

Vários são os canais de cálcio existentes, sendo que os canais dos tipos N, P, Q e R, são os que se localizam especificamente nos terminais pré-sinápticos e apresentam como função primordial à liberação de neurotransmissores. Fisiologicamente trata-se de canais que são ativados por uma forte despolarização; e apresentam inativação lenta. De acordo com Pimentel (2003, p.05) “os canais de cálcio dos tipos N, P, Q e R acoplam os potenciais de ação a liberação de neurotransmissores, processo este que requer concentrações citoplasmáticas de cálcio entre 10 e 100 μ M” (PIMENTEL, 2003, p.05).

O influxo de cálcio através dos canais tipos N, P, Q e R é um passo chave para que haja a liberação de neurotransmissores dos terminais pré-sinápticos; sendo ele responsável pela ativação da sintaxina 1, a qual medeia a ancoragem das vesículas, sua fusão com a membrana pré-sináptica e a liberação dos neurotransmissores. Pimentel (2003, p.05) ressalta ainda que a atividade dos canais é modulada não só pela sintaxina 1 como também pela inibição pela proteína G.

Para que a concentração de cálcio no sangue e no fluido extracelular seja mantida, ao longo da evolução se produziu um sensor de cálcio como componente do sistema responsável pela homeostasia do cálcio. Segundo Pimentel (2003, p.09) o receptor extracelular sensível ao cálcio é uma proteína G que contém sete hélices hidrofóbicas ancoradas na membrana plasmática. Além disso, possui uma cauda

citossólica e um domínio extracelular que interage com o cálcio extracelular.

O sensor de cálcio existe em várias células, incluindo as células da paratireóide e tireóide, células do rim e mucosa intestinal, osteoblastos e, os neurônios. Segundo Pimentel (2003, p.10) o sensor de cálcio das células musculares, contém calmodulina, sendo que a ligação do íon cálcio à calmodulina induzirá mudanças conformacionais e a ativação da proteína, permitindo que ela estimule ou inative uma variedade de enzimas. Já no que concerne os sensores de cálcio das células nervosas, destaca-se, por exemplo, o sensor-1 neuronal de cálcio (NCS-1). De acordo com Souza (2007) trata-se da proteína evolutivamente mais antiga da superfamília das *EF-hands*, um grupo de proteínas que pode se ligar ao cálcio. NCS-1 apresenta diversas funções, como inibir a dessensibilização do receptor dopaminérgico D2 e ativar PI4K que, por exemplo, medeia a dessensibilização do receptor dopaminérgico D2, pois leva a inibição (mediada pelo AMPc) do receptor D2, após estimulação dopaminérgica. Pimentel (2003, p.10) ressalta ainda que nos neurônios do estriado, os NCS-1 e os receptores D2 localizam-se ambos próximos das reservas intracelulares de cálcio. A interação do receptor D2-NCS-1 parece acoplar as vias sinalizadoras de cálcio e de dopamina, exercendo, portanto, um papel fundamental na regulação da sinalização dopaminérgica em cérebros normais e doentes.

Fernandes (2004) destaca que a concentração intracelular de cálcio é mantida baixa por vários mecanismos, como trocadores iônicos e ATPases cálcio dependentes presentes na membrana plasmática e na membrana do retículo endoplasmático, ou também por transporte ativo da membrana mitocondrial interna ou proteínas que se ligam ao cálcio no citosol; logo, o cálcio que entra na célula nervosa para liberação dos neurotransmissores deverá deixá-la, uma vez que o nível homeostático deve ser mantido. Fernandes (2004) coloca ainda que como qualquer outro mensageiro, a concentração de cálcio tem de baixar rápido para que a célula esteja pronta a perceber o próximo sinal. Assim, o cálcio deve ser rapidamente expulso do citosol através de várias vias de escape distribuídas na célula. O cálcio tanto pode ser expulso para fora da célula, como pode se esconder no retículo endoplasmático e mitocôndria ou mesmo desaparecer ao se associar a uma proteína citossólica.

Fernandes (2004) lembra que para que a diferença de concentração de cálcio existente entre o líquido extracelular e o líquido intracelular se mantenha, vários mecanismos funcionam permanentemente:

- 1) Na membrana plasmática, há uma proteína trocadora de cálcio por sódio que usa a energia do gradiente do sódio gerado pela bomba de sódio/potássio para colocar cálcio para fora. Além desta, há uma outra bomba de cálcio na membrana plasmática que hidrolisa ATP para obter a energia necessária e proteínas ligadoras de cálcio no citoplasma que tornam o íon indisponível pra outras reações.
- 2) Quando o pico de cálcio aparece devido à sinalização, para voltar às concentrações de origem, além das bombas de membranas, entra em funcionamento a bomba de cálcio do retículo endoplasmático (bomba de cálcio ATPase sarcoendoplasmáticas - SERCA) que recolhe o cálcio liberado. Se ocorrer problema neste mecanismo, a mitocôndria entra em ação e passa a bombear cálcio (bomba de cálcio ATPase) para o seu interior, deixando temporariamente de produzir ATP. Segundo Terashima et al (2012) a bomba de cálcio existente na membrana interna da mitocôndria se utiliza do gradiente de prótons para bombear cálcio. Ainda segundo a mesma fonte, a captação de cálcio pela mitocôndria exerce dois papéis funcionais: um relacionado ao metabolismo energético da organela e outro associado à homeostase e sinalização de cálcio celular. Outros mecanismos envolvidos na proteção das células e manutenção da homeostasia são os canais receptores IP3 (liberam cálcio de estoques intracelulares) e canais receptores rianodínicos (RyR) – canal de liberação de cálcio encontrado em organelas intracelulares.

4.2.2 Glutamato

O ácido glutâmico é um aminoácido não essencial extremamente importante para o metabolismo em seres humanos. No que tange a área da neurociência, trata-se do principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central de mamíferos. Desempenhando importante papel na plasticidade e neurotoxicidade; tem no cérebro sua ação mediada por um grupo de receptores presentes não só em neurônios como também em células gliais.

Danbolt (2001 apud Thomazi, 2009, p.03) lembra que em condições fisiológicas, a concentração de glutamato na fenda sináptica é de $\pm 1-2 \mu\text{M}$; $10 \mu\text{M}$ no líquor; 2 mM no citoplasma das células

astrocitários; 10 mM no citoplasma das células neuronais e 100 mM nas vesículas sinápticas.

Segundo Barboza (2007, p.22) o glutamato pode ser liberado num processo sináptico de duas maneiras: via exocitose de vesículas carregadas com o neurotransmissor e que depende de íons cálcio (Sanchez-Pietro et al, 1987 apud Barboza, 2007, p.22) e via cálcio independente que ocorre pela reversão do transportador de membrana de alta afinidade, liberando glutamato do pool citoplasmático (Romanosilva et al, 1994 apud Barboza, 2007, p.22).

Thomazi (2009) por fim ressalta que a concentração de glutamato na sinapse no período pré-liberação é de 2-5 $\mu\text{mol/L}$, podendo chegar a 5-100 $\mu\text{mol/L}$ depois da despolarização.

Para que haja um perfeito equilíbrio sistêmico e manutenção da atividade normal do sistema nervoso, a quantidade de glutamato circulante deve ser sempre mantida. Segundo Heneine (2003, p. 220) caso haja excesso de glutamato disponível na sinapse ocorrerá um fenômeno de despolarização; uma vez que ocasionará o fluxo constante de íons positivos para dentro da célula. Esta despolarização ativa canais de cálcio de voltagem que permite ao Ca^{2+} fora do neurônio entrar na célula. O sistema nervoso controla o nível de glutamato para evitar excitotoxicidade através de três mecanismos: recaptação; quebra e inibição.

Tabela 3. Mecanismos controladores do nível de glutamato

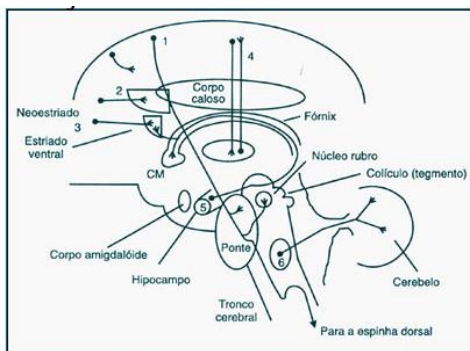
MECANISMO	DESCRIÇÃO
RECAPTAÇÃO	Quando o glutamato é liberado dentro da fenda sináptica, ele é imediatamente absorvido pela célula pós-sináptica. Para evitar excitotoxicidade da célula pós-sináptica, a célula pré-sináptica retorna para dentro do seu axônio todo o excesso de glutamato não utilizado pela célula pós-sináptica. O excesso de glutamato pode também ser capturado pelos astrócitos adjacentes.
QUEBRA	Uma vez que o excesso de glutamato seja reintroduzido dentro da célula pré-sináptica, é importante evitar a excitotoxicidade desta célula. Isto é levado adiante por uma enzima chamada Glutamato desidrogenase (GDH). A GDH é encontrada nas terminações do axônio e decompõe o glutamato instantaneamente em uma forma inativa.
INIBIÇÃO	O mecanismo de inibição é mais genérico. Para controlar a atividade do glutamato, este envolve a utilização de neurotransmissores inibitórios, como GABA e glicina.

Fonte: Sanofi-Aventis (2007).

Conforme comentado, controlar os níveis deste neurotransmissor na fenda sináptica é fundamental para prevenção da excitotoxicidade neuronal, ocasionada por insultos agudos no cérebro (traumas; doenças neurológicas, etc). Nestes casos, os astrócitos, além dos neurônios, desempenham importante papel na remoção do glutamato do meio extracelular, uma vez que apresenta em suas membranas uma família de proteínas transportadoras específicas para esta molécula (Sims e Robinson, 1999 apud Antunes, 2002, p.13).

A rota percorrida pelo glutamato é uma das mais longas do cérebro (Figura 10).

Figura 10. Rota cerebral do glutamato.



Fonte: Pliska (2004).

Pliszka (2004) ressalta que na rota um da figura, pode-se observar que

Os corpos celulares originam-se no córtex e os axônios descem pela cápsula interna (fenda entre o putamen e o caudado). Os axônios continuam a sua descida e, então, ramificam-se para a ponte e para o núcleo rubro no tronco cerebral. Ali, eles excitam os neurônios motores que governam uma ampla variedade de músculos. No tronco cerebral, esses axônios cruzam para o outro lado do corpo (decussação), depois prosseguem para a espinha dorsal. Em cada nível da espinha dorsal, eles excitam neurônios motores que fazem com que os músculos contraíam-se.

Ainda segundo a mesma fonte, a rota dois, por sua vez, é igualmente importante no controle do comportamento motor. Aqui se pode observar que corpos celulares, também originados no córtex, projetam-se para o neocórtex (caudado e putamen). A rota três projeta-se do córtex pré-frontal para o estriado ventral; sendo fundamental para o sistema límbico e os comportamentos relacionados aos estímulos recompensatórios. Por fim, a rota de número quatro mostra uma “alça motora” excitatória entre o córtex e o tálamo.

4.2.2.1 Receptores de glutamato

Os receptores glutamatérgicos estão amplamente distribuídos no sistema nervoso central, onde estão envolvidos em uma variedade de processos durante o desenvolvimento das células nervosas, incluindo proliferação, migração e plasticidade sináptica (McDonald e Johnston, 1990 apud Antunes, 2002, p.13). Segundo “Sanofi Aventis” (2007) “existem três tipos de receptores de glutamato nos dendritos dos neurônios; sendo que todos eles juntam-se ao glutamato e carregam o impulso nervoso”. A expressão dos diferentes tipos de receptores apresenta uma variação regional e de desenvolvimento bastante específico, indicando que estes podem exercer funções variadas quanto ao desenvolvimento e modulação do sistema nervoso central.

Os receptores glutamatérgicos podem ser classificados em ionotrópicos ou metabotrópicos dependendo de diferenças existentes em sua estrutura molecular, mecanismos de transdução ativados e/ou propriedades farmacológicas.

Os receptores glutamatérgicos metabotrópicos (mGluR) constituem um grupo de receptores ligados a proteínas G. O glutamato, ao ligar-se nestes receptores, ativam uma proteína G que pode ativar ou inibir a adenilato ciclase ou estimular a fosfolipase C, regulando a síntese de diferentes mediadores intracelulares (IP₃, AMPc ou GMPc). Além destes, há também os receptores associados a canais catiônicos denominados ionotrópicos (iGluR), classificados em dois grupos: receptores NMDA e os não NMDA (AMPA e cainato). Em uma mesma sinapse, em geral, encontram-se os três tipos de receptores ionotrópicos onde estão envolvidos na ampliação do sinal glutamatérgico (Cotman et al, 1995 apud Antunes, 2002, p.13).

4.2.2.2 Transportadores de glutamato

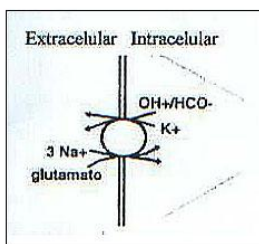
Os astrócitos são as principais células do sistema nervoso central responsáveis pela captação de glutamato após a liberação deste pelos neurônios. Isto porque este é o grupo de células que mantém a homeostase do meio extracelular evitando, assim, eventos de excitotoxicidade (Gegelashvili et al, 1997 apud Antunes, 2002, p.15).

Segundo Antunes (2002, p. 15) captar glutamato extracelular só é possível porque os astrócitos expressam em sua membrana uma série de moléculas transportadoras deste neurotransmissor. Sathler (2012), por sua vez, coloca este transporte é realizado por proteínas que utilizam o gradiente eletroquímico dos íons sódio e potássio para acoplar o

transporte de glutamato para o interior da célula. Atualmente os transportadores de glutamato de alta afinidade são conhecidos como EAAT (*excitatory amino acid transporter*). Nos últimos anos foram descritos cinco distintos cDNAs para o transporte de glutamato: EAAT-1 (GLT-1); EAAT - 2 (GLAST); EAAT - 3 (EAAC-1); EAAT - 4 e EAAT -5. (Schultz e Stell, 1996 apud Antunes, 2002, p.16).

Vale ressaltar que atualmente alguns trabalhos vêm demonstrando que a captação de glutamato em astrócitos é eletrogênica e dependente de Na^+ . Neste processo, conforme pode ser observado na figura a seguir, a entrada de cada molécula de glutamato carrega junto três Na^+ e sai um K^+ e uma molécula de bicarbonato.

Figura 11. Captação de glutamato dependente de Na^+ .



A figura 11 mostra que a entrada de cada molécula de glutamato carrega junto três sódios e sai um potássio e uma molécula de bicarbonato. Adaptado de: Hof e col. (1999).

Culturas puras de astrócitos expressam basicamente GLAST, sendo a expressão de GLT-1 bastante reduzida. Entretanto astrócitos cultivados na presença de neurônios expressam tanto GLAST quanto GLT-1 (Brown, 1998, Swanson e Seid, 1998 apud Antunes, 2002, p.16).

4.2.2.3 Ciclo glutamato-glutamina

A quantidade de neurotransmissor glutamato que é liberada pelo neurônio pré-sináptico durante o processamento de uma informação é proporcional ao volume de cálcio que entrou neste neurônio e interagiu com as vesículas sinápticas que armazenam tal neurotransmissor. Contudo, convém ressaltar que normalmente é liberada uma quantidade superior a necessária para se difundir pela fenda e interagir com os receptores na membrana do neurônio pós-sináptico. Esse excesso de transmissor liberado deve ser retirado da fenda sináptica a fim de se evitar uma possível neurotoxicidade. “Caso um excesso de glutamato

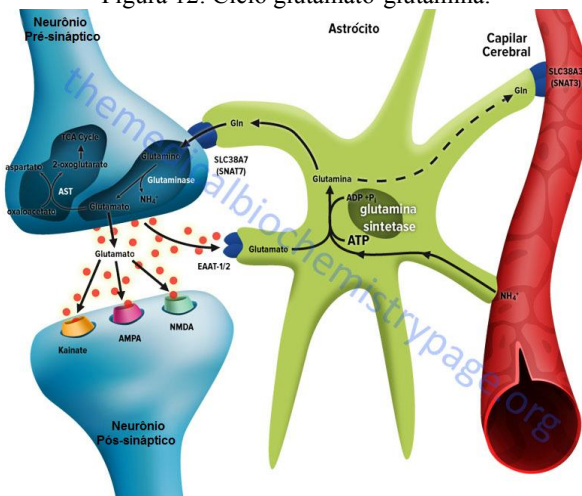
esteja disponível na sinapse, ocorre a despolarização, devido ao fluxo constante de íons positivos para dentro da célula”. (SANOFI AVENTIS, 2007). A despolarização ativa os canais de cálcio de voltagem que, por sua vez, permite que cálcio extracelular acabe entrando na célula.

As células gliais mais abundantes (os astrócitos) é que compete essa função de proteção contra toxicidade pelo neurotransmissor glutamato. Kruger (2003, p. 17) ressalta que a captação eficiente de glutamato pelos astrócitos a partir da fenda sináptica, e a ativação concomitante da via glicolítica, já são de conhecimento bem estabelecidos. “Uma vez dentro do astrócito, o aminoácido glutamato será metabolizado. Nos astrócitos, o grupo α -amino do glutamato pode ser transferido ao oxaloacetato produzindo α -cetogluturato e aspartato, em uma reação catalisada por aspartato amino transferase” (MARKS, MARKS e SMITH, 1996 apud KRUGER, 2003, p.17).

Kruger (2003, p. 17) destaca ainda que não somente esta via de metabolização de glutamato é existente nos astrócitos. “Duas outras vias existem nos astrócitos para metabolizar glutamato” (KRUGER, 2003, p. 17). Em uma delas, o glutamato pode ser convertido diretamente em α -cetogluturato através de uma desaminação oxidativa catalisada por glutamato desidrogenase. “Em outra, a via metabólica quantitativa predominante nos astrócitos, é a amidação de glutamato a glutamina” (KRUGER, 2003, p.17). Esta terceira via de metabolização é popularmente conhecida como ciclo glutamato-glutamina; sendo que ela promove um meio eficiente de metabolizar não só glutamato; como também amônia.

O ciclo glutamato-glutamina (FIGURA 12) entre astrócitos e neurônios tem sido proposto como a maior via de reciclagem do glutamato. Segundo Thomazi (2009, p.02) ao ser captado pelo astrócito, o glutamato é primariamente convertido em glutamina pela ação da glutamina sintetase, a qual é posteriormente transportada ao neurônio; onde será novamente hidrolisada em glutamato pela enzima mitocondrial glutaminase. Uma vez no neurônio, o glutamato é estocado em vesículas, sendo o processo de captação vesicular independente de sódio, e sua incorporação, segundo Tabb et al (1992 apud Thomazi, 2009, p.02), “é possível devido a um potencial interno de membrana positivo que é gerado por uma H^+ -ATPase vacuolar, a qual media o transporte de H^+ para dentro da vesícula” (TABB et al, 1992 apud THOMAZI, 2009, p.02).

Figura 12. Ciclo glutamato-glutamina.



Adaptado de: King (2012).

Convém destacar que nem todo glutamato é regenerado através do ciclo glutamato-glutamina; sendo que parte do glutamato liberado pelos neurônios acaba entrando como α -cetoglutarato no ciclo de Krebs em astrócitos; e outra porcentagem, conforme já comentado, pode acabar por interagir com os receptores de membrana dos astrócitos desencadeando um processo de sinalização por cálcio.

5. SINALIZAÇÃO POR ÍONS CÁLCIO

Para Ulrich (2012) o íon cálcio possui importância universal; uma vez que participa de muitos processos biológicos e funciona como sinalizador celular. Já Aguiar, Arantes e Leite (2012, p.55) enfatizam que além de atuar como segundo mensageiro nas células, esta substância controla uma grande variedade de funções celulares, abrangendo desde respostas de curta duração até respostas de longa duração.

Castro Junior et al (2012, p.300) lembram que a sinalização de cálcio e seu estado de homeostasia são de grande relevância para o funcionamento normal das funções cerebrais, sendo a concentração basal fundamental para as células responderem efetivamente a vários sinais de cálcio disparados por estímulos extracelulares ou despolarização da membrana. Contudo, segundo Andrade e Leite (2012, p. 284) é válido se ter em mente que a sinalização celular de cálcio pode envolver muitos componentes; podendo eles serem misturados e rearranjados para criar uma variedade de sinais espaciais e temporais.

5.1 SINALIZAÇÃO DE CÁLCIO EM NEURÔNIOS

Atualmente é bastante evidente que as funções cerebrais dependem de uma íntima sinalização dos neurônios para as células gliais e da glia para os neurônios. Castro Junior et al (2012, p. 301) porém colocam que a sinalização por cálcio não se dá somente com as células gliais, sendo os neurônios também diretamente influenciados por tal substância. Ainda segundo a mesma fonte, a velocidade de difusão dos íons cálcio pelo citoplasma neuronal se dá de modo muito lento, tendo um coeficiente de difusão de aproximadamente $10\mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ devido à presença abundante de proteínas citoplasmáticas ligadoras de cálcio. Contudo, “apesar de os sinais de cálcio serem tipicamente localizados por essa difusão limitada, eles podem tornar-se globais quando uma liberação substancial de estoques internos estiver envolvido” (CASTRO JUNIOR et al, 2012, p.302).

Quando em repouso, os neurônios mantêm uma linha de base de cálcio intracelular de aproximadamente 10 nM. Essa concentração basal é fundamental para as células responderem efetivamente a vários sinais de cálcio disparados por estímulos extracelulares ou despolarização de membrana, “momento em que a concentração deste íon pode alcançar entre centenas de nanomolares a poucos micromolares” (BERRIDGE, 1998 apud CASTRO JUNIOR et al, 2012, p. 301). Os níveis de concentração de cálcio no neurônio em repouso são mantidos pela

captação para estoques internos mediados principalmente pelas bombas de cálcio-ATPase presentes na membrana do retículo endoplasmático. Contudo, quando há um estímulo, a concentração intracelular de cálcio é alterada pelo influxo de tal íon através da membrana plasmática ou da liberação de cálcio dos estoques internos. “A principal via de entrada de cálcio vindo do meio extracelular são os canais de cálcio sensíveis à voltagem e canais controlados por neurotransmissores” (PAREKH, 2003 apud CASTRO JUNIOR et al, 2012, p.302).

No que tange o envolvimento do cálcio na excitabilidade neuronal, sabe-se que tanto o cálcio vindo do meio extracelular; quanto o liberado por estoques intracelulares podem alterar direta ou indiretamente a excitabilidade dos neurônios. Para Castro Junior et al (2012, p. 305) essas mudanças de excitabilidade ficam nítidas ao se manifestarem tipicamente por meio de variações tanto no formato como no padrão de disparo dos potenciais de ação. Já no que se refere ao envolvimento do cálcio para liberação de neurotransmissores, está bem estabelecido que o influxo de cálcio através de canais de cálcio sensíveis a voltagem é o mecanismo básico para que haja a liberação dos neurotransmissores. Bootman, Berridge e Roderick (2002 apud Castro Junior, 2012, p. 307) salientam que embora a contribuição relativa dos diferentes subtipos de canais de cálcio sensíveis a voltagem na exocitose permaneçam temas ainda a serem debatidos, se aceita que “a liberação é principalmente estimulada por influxo de cálcio por canais do tipo P/Q e tipo N e, em menor extensão, dos canais tipo R e tipo L, pois estes últimos estão localizados mais distantes da sinapse” (BOOTMAN, BERRIDGE e RODERICK, 2002 apud CASTRO JUNIOR, 2012, p. 307)

5.2 SINALIZAÇÃO DE CÁLCIO EM CÉLULAS GLIAIS

Pelo fato de não possuírem potenciais de ação e nem axônios, as células gliais durante muito tempo foram imaginadas como sendo incapazes de propagar impulsos neuronais. A visão tida primariamente sobre glia só começou a mudar quando pesquisadores descobriram que células gliais exibiam um grande número de receptores acoplados a proteína G, ligados a diversas cascatas de sinalização intracelular.

Para LoTurco (2000, p.8196), estudos realizados utilizando imagem de cálcio, mostraram que os astrócitos são capazes de propagar sinais celulares entre si em forma de ondas de cálcio. O autor ainda destaca que estas ondas se dissipam pela rede de astrócitos, e tem mostrado gerar certa influência na atividade de neurônios adjacentes;

modulando a transmissão sináptica. Para Castro Junior (2012, p.313) os astrócitos são os maiores responsáveis pela modulação da atividade sináptica entre dois neurônios. Os neurotransmissores liberados pelos neurônios pré-sinápticos podem ligar-se a receptores específicos na membrana dos astrócitos e evocar elevações de cálcio no citoplasma dos mesmos; que por sua vez, responderão a esta ativação liberando gliotransmissores.

No que tange especificamente a sinalização de cálcio entre astrócitos convém ressaltar que as ondas de cálcio astrocísticas podem se propagar basicamente de dois modos: através de junções tipo GAP ou por meio da via parácrina extracelular; sendo que é a substância envolvida no fenômeno que define qual o meio de propagação do sinal será utilizado. Castro Junior (2012, p. 313) lembra que os astrócitos expressam uma grande quantidade de receptores para diferentes neurotransmissores, o que abre uma grande lista de substâncias candidatas a mensageiras extracelulares. Convém ressaltar, porém, que conforme Guthrie (1999, p.520) destaca, a medida e a direção de propagação das ondas de cálcio serão significativamente influenciadas pelos movimentos do meio extracelular.

5.3 ONDAS DE CÁLCIO

Está bem estabelecido que as mudanças na concentração intracelular de cálcio regulam muitos aspectos fisiológicos da célula. Segundo Sneyd; Keizer e Sanderson (1995) a mudança na concentração de cálcio na célula não ocorre de modo uniforme, são na verdade, iniciados em um local específico e vão se espalhando por células individuais na forma de ondas. O fluxo de cálcio para dentro da célula pode se dar através de canais iônicos ou co-transportadores de cálcio; e, o transporte de cálcio para fora da célula por bombas de membrana.

Sneyd; Keizer e Sanderson (1995) lembram ainda que o retículo endoplasmático; o complexo de Golgi; o envelope nuclear e as mitocôndrias são fontes extras de depósito citosólico de cálcio; sendo que para que seja possível manter uma concentração baixa de cálcio dentro da célula, o transporte do mesmo, através de bombas de cálcio localizadas no retículo endoplasmático, se faz necessária. É através do funcionamento destas bombas que os íons Ca^{2+} são mantidos, normalmente, em concentrações muito baixas no citoplasma celular. Duas são as bombas de cálcio que realizam tal atividade: uma delas bombeia cálcio para fora da célula (Bomba de cálcio da membrana plasmática - PMCA) e a outra para o interior de uma ou mais organelas

vesiculares do interior da célula (Bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático - SERCA).

Fisiologicamente há um equilíbrio estável entre a concentração celular de cálcio interna e externa; de modo que as oscilações deste mineral ocorrem sempre que há quebra neste equilíbrio. Sneyd; Keizer e Sanderson (1995) lembram que alguns dos fatores que podem vir a ocasionar esta desestabilização; são, por exemplo: mudança no nível de estimulação hormonal; aumento dos mensageiros intracelulares ou alteração na taxa de influxo através da membrana.

Dani, Chernjavsky e Smith (1992) ressaltam que estudos demonstram que nos astrócitos tanto as ondas intra como as intercelulares apresentam velocidade similar, estando o estímulo diretamente ligado à distância alcançada por tais sinais, ou seja, quanto maior o estímulo, maior a distância alcançada pela onda. Sneyd; Keizer e Sanderson (1995), por sua vez, lembram que pelo fato de o cálcio ser fortemente tamponado no citosol, normalmente a maior parte das ondas de cálcio desencadeadas acabam por não atingirem grandes distâncias.

Para haver a criação das ondas necessariamente tem de haver elevação na concentração de cálcio intracelular, seja vindo do meio extracelular ou de estoques celulares internos. Segundo Guthrie et al (1999) por anos pensou-se que as ondas de cálcio só poderiam se propagar através de hemicanais (junções GAP); contudo, experimentos demonstraram que estas ondas também conseguem se propagar por astrócitos fisicamente separados, sendo a medida e a direção de propagação das mesmas significativamente influenciadas por movimentos do meio extracelular (Guthrie et al, 1999).

Abordando-se especificamente o desencadeamento das oscilações/ondas de cálcio; têm-se basicamente dois modos pelos quais os astrócitos podem se comunicar: interação com neurotransmissores liberados na fenda sináptica; e/ou com ATP. Loiola (2010, p.13) lembra que durante muito tempo o ATP foi tido somente como fonte de energia intracelular; sendo que sua aceitação como molécula sinalizadora extracelular é algo recente. Ainda segundo a mesma fonte “estudos farmacológicos de receptores revelaram que a maior parte das células gliais do sistema nervoso (astrócitos, oligodendrócitos, células de Schwann, células de Müller e microglia) expressam receptores purinérgicos” (LOIOLA, 2010, p.13), sendo que o ATP age justamente sob tais receptores da membrana da célula astrocitária, desencadeando a abertura dos canais de íons. Esta interação permite que cálcio proveniente do líquido extracelular entre na célula. O aumento de cálcio no interior da célula faz com que a mesma responda liberando ATP, que

por sua vez ligar-se-á ao receptor de um astrócito próximo, permitindo haver o influxo de cálcio para o interior desta outra célula e, conseqüentemente, liberação de mais ATP e assim sucessivamente. Newman (2001 apud Loiola 2010, p.19) ressalta que a liberação de ATP ocorre sempre antes da propagação da onda de cálcio para a célula adjacente; o que acaba por indicar que esta propagação ocorre mediada pela liberação de ATP e ativação da célula. Esta modalidade de liberação das ondas de cálcio, por ser dependente da liberação de ATP, tende a atingir longas distâncias.

Já no que concerne a dissipação das ondas de cálcio desencadeadas por neurotransmissores liberados na fenda sináptica, sabe-se, por exemplo, que se o neurotransmissor envolvido no processo for o glutamato, este pode agir sob dois tipos de receptores (metabotrópicos e/ou ionotrópicos) e, portanto, promover o influxo de cálcio tanto do líquido extracelular para o citosol (processo semelhante ao descrito para o ATP), quanto estimular a liberação de cálcio de organelas intracelulares. Para que a liberação de íons cálcio estocado em organelas celulares (retículo endoplasmático, por exemplo) seja viabilizada, as seguintes etapas ocorrem: há a ligação de uma molécula sinalizadora (neurotransmissor, no caso em questão) ao receptor de membrana no astrócito; que, por sua vez, acaba por levar a ativação de um tipo de proteína G. Segundo Moura e Vidal (2011, p.32), uma vez ativada (ligada ao GTP), a proteína G se separa, e sua subunidade α se desloca pela membrana plasmática e ativa a enzima fosfolipase C (PLC). A fosfolipase C catalisa a quebra de um lipídeo de membrana, o fosfatidilinositol bifosfato (PIP_2) em duas moléculas: diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP_3). O DAG permanece na membrana plasmática e atua no recrutamento de uma proteína quinase dependente de cálcio ou PKC. O IP_3 se difunde pelo citoplasma e se associa a receptores presentes na membrana do retículo endoplasmático que são canais de cálcio. A ativação destes receptores leva a liberação do cálcio presente no retículo para o citoplasma; onde ele participará na ativação do PKC e de várias outras proteínas. Oppelt (2002) lembra que é através da liberação de cálcio destes compartimentos celulares internos que a onda se dissipa por entre astrócitos, sendo esta transferência de informação mediada por hemicanais. Por ser dependente de mediação via junções GAP estas ondas atingem somente curtas distâncias.

Segundo Pereira Júnior (2010) após alcançar o último astrócito da cadeia; ou seja; o “astrócito-alvo”, a onda atravessará todo este e, ao atingir sua outra extremidade elicitará a liberação de gliotransmissores; o qual se ligará a receptores extra-sinápticos neuronais.

6. METODOLOGIA

A metodologia do estudo foi baseada em uma pesquisa explicativa, de natureza experimental e cunho quanti-qualitativo. Segundo Gil (2012) a pesquisa explicativa têm como preocupação central identificar os fatores que determinam ou que contribuem para a ocorrência dos fenômenos. “(...) é o tipo de pesquisa que mais aprofunda o conhecimento da realidade, porque explica a razão, o porquê das coisas” (GIL, 2012). A pesquisa experimental, por sua vez, segundo Marzano (2000, p.57) representa o processo de gerar e testar hipóteses, com o intuito de melhor entender algum fenômeno. Gil (2012) ressalta ainda que a maioria das pesquisas explicativas são de natureza experimental.

Optou-se em utilizar este tipo de pesquisa, pois esta possibilitaria a compreensão e exploração dos fenômenos de interesse, aproximando-se, desta forma, de um maior entendimento acerca de “universo” que envolve a dinâmica do neurotransmissor glutamato e dos íons cálcio no fenômeno da sinalização celular, e, conseqüentemente da dissipação da informação.

Segundo Leopardi (1999, p.80) a escolha de instrumentos de trabalho é de fundamental importância, não podendo ser uma escolha alheia ao processo como um todo; ou seja, a necessidade que indica um trabalho, o objeto sobre o que se vai atuar, a habilidade do próprio trabalhador, e, a finalidade explicativa. Deste modo, principalmente por se tratar de uma pesquisa explicativa-experimental; onde o risco de se cometer erros aumenta consideravelmente, a escolha dos materiais e métodos foi necessariamente feita de maneira minuciosa; considerando várias hipóteses e teorias.

Ressalta-se que esta pesquisa foi composta basicamente por duas etapas: um levantamento literário cuidadoso; e, posteriormente a coleta de dados de maneira experimental.

6.1 MATERIAIS E MÉTODOS

6.1.1 Materiais

Para que todos os objetivos deste trabalho fossem conquistados; alguns materiais específicos se fizeram necessários na experimentação.

a) Stopped Flow Mixer – 4000/S (SFM – 4000/S)

O *stopped-flow* (SF) é um instrumento de fluxo interrompido/parado que permite trabalhar-se com reações químicas de cinéticas muito rápidas. Nestes equipamentos, têm-se pequenos volumes de soluções sendo rapidamente conduzidas a partir de seringas para um misturador de elevada eficiência para que se inicie uma reação rápida. A substância resultante desta reação é então deslocada até uma célula de observação (cubeta) onde passará pela análise.

Muitos processos biológicos ocorrem em uma faixa de tempo de milissegundos; o que requer aparatos rápidos o suficiente para medir suas dinâmicas. Por conseguir trabalhar com cinéticas muito rápidas, os equipamentos SF se mostram, portanto, uma alternativa eficiente para o estudo de uma grande variedade de sistemas fisiológicos e patológicos. O “*stopped-flow mixer*” 4000/S (SFM – 4000/S) especificamente, apresenta um subsistema mecânico constituído por quatro seringas independentes; o que permite que de duas a quatro soluções distintas possam ser misturadas e injetadas na cubeta de observação; fornecendo, portanto, uma análise ainda mais minuciosa (BioLogic Science Instruments, 2012).

O SFM – 4000/S (figura 13) é controlado pelo software Bio-Kine 32 versão 4.70. É através da manipulação deste software que se torna possível conhecer o volume de solução contida em cada uma das seringas; executar o movimento manual ou automático das mesmas; criar uma sequência de reações com total controle de tempo e volume; além de salvar e/ou recuperar as sequências utilizadas em cada um dos modos de aquisição de dados utilizados.

Figura 13. Equipamento SFM-4000/S.



Fonte: Dados primários (2014).

Usualmente os equipamentos do tipo *stopped-flow* limitam o volume injetado na cubeta de observação através de um artefato: uma

seringa de paragem, sendo esta a principal responsável pelo fornecimento do “*stopped-flow*” (paragem do fluxo para realização da análise); contudo, segundo “BioLogic Science Instruments” (2012), o fato de o movimento das seringas no aparelho SFM – 4000/S ser completamente controlado pelo software BioKine; acaba eliminando a necessidade de se trabalhar com uma seringa de paragem; sendo a parada programada via computação. Neste caso, o sistema de paragem utilizado pelo equipamento como meio de imobilizar a coluna de líquidos injetados é pautada em um sistema de parada dura (“*hard stop*”). Neste modo, o fluxo é imobilizado por uma combinação de dois mecanismos: a partir da intensificação da parada dos motores, e, por meio de uma eletroválvula de alta velocidade que fecha a saída da cubeta do SFM.

b) Seringas de graduação 10 mL

Método utilizado pelo equipamento SFM – 4000/S para armazenar os componentes a serem injetados para realização dos estudos. A capacidade do equipamento é de quatro seringas; sendo o uso de todas necessário. A seringa 1 continha água Milli-q, sendo ela utilizada somente para fornecer concentrações diferente de cálcio; a seringa 2 continha a solução de cálcio (a partir do cloreto de cálcio); a seringa 3 continha as células; e, a seringa 4 o L-glutamato. Convém ressaltar que a cada experimentação seringas novas e estéreis eram utilizadas, visando evitar possíveis contaminações cruzadas.

c) Células de glioma C6

Gliomas são os tumores primários mais comuns nos tecidos cerebrais. Apresentando origem a partir de células gliais, são comumente utilizadas para estudos de biologia celular. As células de glioma C6, por sua vez, representam uma das linhagens celulares tumorais da glia, sendo que, segundo Brisma (1995 apud Baranska, 2013, p.32), estas células possuem propriedades oligodendrocitárias tão boas quanto de seu astrócito progenitor e comumente são utilizadas quando se necessita realizar estudos bioquímicos relacionados com astrócitos. A escolha em se utilizar tal linhagem celular se deu basicamente pelos seguintes motivos: por se tratar de uma linhagem celular são células imortalizadas (modificação genética) o que confere um crescimento mais rápido e contínuo a elas; proliferação ilimitada ou limitada a um elevado número de passagens; além da existência de

registros de outros estudos utilizando estas mesmas células. Trata-se de células originárias de rato (*RATTUS NOVERGICUS*). A metodologia utilizada para a preparação das células será apresentada mais adiante no tópico “Métodos”.

d) Reagentes e Soluções

As principais substâncias envolvidas na realização deste estudo foram:

d.1) Água deionizada e destilada (Milli-q). Tipo de água purificada onde são ausentes todos os tipos de componentes orgânicos e inorgânicos (Fontes, 2012). Sua escolha para o desenvolvimento deste trabalho se deu justamente pelo fato de ser um composto isento de íons que pudessem vir a influenciar os dados encontrados nas experimentações.

d.2) L-glutamato. Aminoácido excitatório de maior concentração e afinidade aos receptores do sistema nervoso, o ácido glutâmico, ou, simplesmente glutamato é normalmente caracterizado como sendo o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso (Freitas, 2010). A escolha em trabalhar com tal insumo se deu basicamente por dois motivos: mesmo em quantidades mínimas este neurotransmissor é capaz de desencadear respostas celulares, e, pelo fato de que há estudos que apontam o glutamato como um dos principais envolvidos na comunicação interastrocitária com conseqüente modulação da transmissão sináptica.

d.3) Cloreto de cálcio. O cloreto de cálcio pode facilmente servir como meio de obtenção de cálcio e seus derivados através de processos relativamente simples. Trabalhou-se com tal fonte de cálcio devido a alguns motivos: fácil manuseio; dentre os cloretos alcalinos é o mais solúvel em água; baixa toxicidade/riscos mínimos a saúde humana e para o meio ambiente; além de que há muitos estudos similares também utilizando o referido composto como fonte primária de cálcio.

d.4) Indicador de cálcio FURA-2/AM. Para que a dinâmica intracelular do cálcio, e a conseqüente medição do mesmo captado pelas células fossem possíveis, fez-se necessário o uso de um indicador de cálcio fluorescente. Segundo Farias et al (2012, p.27), a escolha do indicador apropriado é de fundamental importância para o sucesso de

um estudo, devendo ela ser pautada nas propriedades primárias do composto. Dentre os vários indicadores de cálcio existentes optou-se trabalhar com o FURA-2/AM pelos seguintes fatos: facilidade na utilização, uma vez que o grupamento acetoximetil éster (AM) da sonda fluorescente FURA-2 é muito mais eficiente que de outros indicadores; maior facilidade de incorporação do mesmo às células, uma vez que sua forma “AM” é permeável a células, não necessitando a utilização de métodos invasivos; eficiência comprovada em outros estudos envolvendo a quantificação de cálcio por fluorescência.

d.5) TRITON X-100. Trata-se de um detergente não iônico, cuja densidade relativa é $1,0700 \text{ g/cm}^3$ e pureza próxima a 100%. A série “X” dos detergentes Triton são produzidas a partir de octilfenol polimerizado com óxido de etileno (Sigma-Aldrich, s.d.). O número 100 refere-se indiretamente ao número de unidades de óxido de etileno presentes na estrutura (tem em média 9,5 unidades por molécula). O composto foi utilizado no intuito de, segundo Lambert et al (1999), adquirir a fluorescência máxima nas experimentações a partir de lise celular. A nota técnica da empresa Sigma-Aldrich (s.d) coloca que se o intuito em se utilizar essa substância é obter a lise celular, cerca de 0,1% da solução diluída em água será o suficiente para tal, sendo, portanto, esta a concentração escolhida para ser utilizada na coleta dos dados.

d.5) EGTA. O ácido tetracético etilenoglicol (EGTA) é o ácido aminopolicarboxílico com maior seletividade pelo íon cálcio (Filho, 1998). Este composto foi utilizado no intuito de haver a quelatação dos íons cálcio, conseguindo, deste modo, mensurar a fluorescência mínima nas experimentações realizadas.

6.1.2 Métodos

a) Preparação das células de glioma C6

O preparo das células de glioma C6 se deu da seguinte maneira:

Até o início da manipulação, as células ficaram acondicionadas em placas contendo meio de cultura, em estufa à 37°C e 5% de dióxido de carbono. Após serem retiradas da estufa, prosseguiu-se a preparação das células retirando-se e descartando-se o meio de cultura (DMEM suplementado com 2mM glutamina; 100 U/mL de penicilina; 100 mg/mL estreptomicina e 10% soro fetal bovino) a que elas estavam acondicionadas. Após esta etapa, acrescentou-se 1,8 mL de tampão

fosfato salino (PBS) - para lavar as células - e 200 μ L de tripsina - para que houvesse o desprendimento das células do fundo da placa. Procedeu-se a incubação das células durante três minutos, visando facilitar o processo de desprendimento celular. Ao término desta etapa, adicionou-se 2 mL de meio de cultura e se procedeu a homogeneização da suspensão celular, sendo as células levadas a centrifuga a 1,2 rpm durante quatro minutos. Ao ser retirada da centrifuga, o sobrenadante foi descartado e o pellet celular ressuspenso em 1 mL de meio de cultura. Se da continuidade ao tratamento das células realizando a contagem das mesmas em Câmara de Neubauer (10 μ L de célula + 190 μ L de azul de tripan). Após esta etapa, realocaram-se as células em placa de petri contendo 8 mL de meio de cultura, e procedeu-se ao repique celular – 200 μ L de células em 7 mL de meio por placa de cultura. Vale ressaltar que o detalhamento do preparo das células está descrito no protocolo experimental (Apêndice A).

Após o processo de repique celular, começa-se a preparar as células para responder a interação com o íon Ca^{2+} (descrito no item b a seguir), carregando-se as mesmas com indicador de cálcio.

b) Adição do indicador de íons cálcio

Para que a mensuração da quantidade de cálcio absorvida pelas células fosse possível, o uso de substância indicadora de cálcio se fez necessária. Como já comentado, o indicador de cálcio escolhido para realização deste trabalho foi o FURA-2/AM. O processo realizado para sua incorporação às células foi pautado em trabalhos de outros autores, como os de Lambert et al (1999), por exemplo, e, principalmente na metodologia sugerida de preparo de “Sigma-Aldrich” (s.d), tendo a mesma sofrido algumas adequações. A adição do indicador de cálcio às células seguiu os seguintes passos:

Após o tratamento/plaqueamento das células:

1. Preparou-se uma suspensão das células (em PBS);
2. Preparou-se 1mM de solução-estoque com FURA-2/AM em DMSO;
3. Diluiu-se uma alíquota do indicador (solução-estoque) de 100 a 500 vezes em PBS;
4. Adicionou-se a solução aquosa do indicador para um volume igual de células em suspensão;
5. Incubou-se durante 30 minutos a 37°C;

6. Lavou-se as células duas vezes com PBS;
7. Ressuspendeu-se as células novamente em PBS e acondicionaram-se as mesmas em seringas de 10 mL.

Importante: A composição do tampão fosfato-salino (PBS) não continha cálcio.

c) Preparação da solução contendo íons cálcio

A solução contendo cálcio foi preparada a partir de um composto químico formado por íons cloro (Cl^-) e cálcio (Ca^{2+}): o cloreto de cálcio. O estabelecimento da concentração a ser utilizada foi pautado no conhecimento das concentrações fisiológicas de cálcio existente no meio extracelular, adotando-se, portanto, como padrão a concentração de 5M.

Por se tratar de uma substância sólida, houve a necessidade de diluição para que seu manuseio no equipamento fosse possível. Para tal, utilizou-se água Milli-q. Após a diluição a solução a ser utilizada no momento era acondicionada em seringas de 10 mL e o restante era acondicionado em vidraria para uso posterior. Convém ressaltar que sempre era preparado uma solução estoque de cálcio de concentração 7M, sendo que no próprio equipamento se procedia a rediluições para se chegar na concentração a ser utilizada no dia da experiência.

d) Preparação do glutamato

Por se tratar de uma substância sólida também foi necessário proceder a diluição em água Milli-q para se chegar a concentração almejada. A concentração de glutamato escolhida para se trabalhar foi a de 2 μM , uma vez que em condições fisiológicas, a concentração deste neurotransmissor na fenda sináptica fica em torno deste valor (Danbolt, 2001 apud Thomazi, 2009).

e) Curva de calibração

Para que a avaliação da mobilização de cálcio fosse possível, antes do início da aquisição dos dados experimentais propriamente ditos, foi necessária a construção de uma curva de calibração. A curva de calibração é a função que descreve a resposta de um detector sobre uma faixa de concentração, sendo comumente usada para prever a concentração de uma amostra desconhecida (“Linde Group”, 2008). Neste tipo de experiência, segundo André (2004), a curva de calibração,

a partir de um tampão contendo Fura-2-AM-éster e a concentração determinante de cálcio, é usada para converter o dado obtido da proporção de F340/F380 para a concentração de cálcio intracelular (nM).

A priori, para que a construção da curva de calibração fosse possível seria necessário basicamente o indicador de cálcio e a solução de cálcio em diferentes concentrações. Contudo, o indicador de cálcio FURA-2 em sua forma conjugada ao acetoximetil éster (AM) é insensível aos íons cálcio, sendo, portanto, necessário que o mesmo seja clivado transformando-se em FURA-2 para que tal interação se tornasse possível. A clivagem do grupamento AM só ocorre após a introdução do indicador nas células. O uso de 0,1% de TRITON X-100 visou obter o valor da fluorescência máxima através da lise das células e, consequente, saturação do indicador com cálcio. Já o EGTA foi utilizado na mesma alíquota com o objetivo de quelar o cálcio e adquirir o valor de fluorescência mínima. A obtenção da curva de calibração seguiu exatamente o mesmo procedimento para aquisição dos dados, sendo o mesmo descrito no item f.

f) Processo de mensuração da captação de íons cálcio por células de glioma C6

O experimento foi realizado em um equipamento “*Stopped-Flow Mixer 4000/S*” (SFM – 4000/S). Após o preparo das células e carregamento das mesmas com indicador de cálcio ajustou-se o equipamento de maneira que a seguinte configuração fosse obtida: modo avançado; aquisição de dados por fluorescência. A cubeta utilizada foi a FC - 15/7,5 e os comprimentos de onda de excitação utilizados foram 340 nm e 380 nm. Trata-se de uma substância racionométrica de dupla excitação; ou seja, excitada a um comprimento de onda de 340 nm quando complexado ao cálcio e a 380 nm quando livre. Portanto, a mensuração da fluorescência emitida pela amostra nos dois comprimentos de onda torna-se essencial. A razão entre a fluorescência emitida pela amostra em tais comprimentos de onda (F340/F380) fornecerá a concentração de cálcio intracelular (Sousa, 2011).

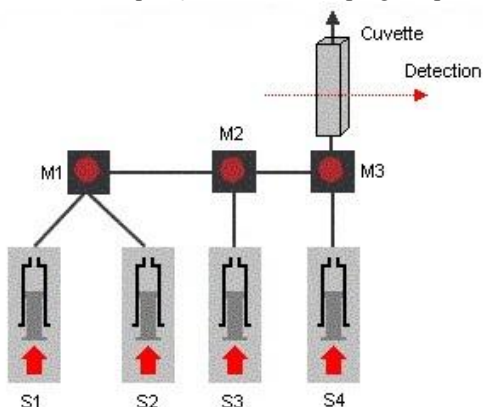
A fluorescência foi detectada, coletada e analisada no SFM-4000/S usando um filtro de corte de 515 nm, conseguido através do uso de um filtro de corte instalado no tubo fotomultiplicador. A análise foi realizada em um tempo de três segundos. As mensurações foram realizadas em temperatura ambiente ($22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$), sendo a mesma controlada por condicionador de ar. Tal medida mostrou-se necessária

para que se obtivesse um comportamento cinético semelhante em todas as experimentações a serem realizadas. A temperatura acaba não sendo fator essencial para a observação da reação, uma vez que, de acordo com Paula e Cesar (2012), as reações químicas ocorrem no interior das células e, portanto, são intermediadas por um maquinário celular que as torna muito eficiente, mesmo operando em temperatura ambiente.

O SFM – 4000/S é constituído por quatro entradas de seringas. As seringas apresentam motores individuais que podem ser acionados de modo manual ou automático. É através delas que se torna possível obter de duas a quatro soluções distintas misturadas e injetadas na cabeça de observação para análise. O tempo de resposta do equipamento varia entre $10\mu\text{s}$ a 10 s.

Algumas etapas perfazem o trajeto das substâncias envolvidas no experimento até que seja possível a análise do composto que chega à cubeta de observação. Primeiramente, uma alíquota predeterminada da solução de cálcio contida na seringa dois era injetada no circuito do equipamento seguindo até o primeiro misturador (o equipamento emprega três misturadores do tipo “Berger Ball”). Convém destacar que a concentração de cálcio na seringa dois era sempre de 7M, e a partir do primeiro misturador calculava-se a quantidade de água Milli-q necessária, considerando também o líquido presente nas demais substâncias envolvidas, para diluir a solução contendo cálcio até chegar a cubeta na concentração pretendida para aquela aquisição de dados. Neste primeiro compartimento, ora a solução não sofria reação alguma, ora era diluída com o conteúdo proveniente da seringa um, sendo, portanto, este misturador efetivamente utilizado somente quando era requerido processo de diluição. Deste compartimento a solução contendo cálcio seguia até o segundo misturador, onde então entrava em contato com uma porção de células injetadas a partir da seringa três, sofrendo, neste local, o primeiro processo efetivo de mistura. Deste ponto a mistura seguia até alcançar o último misturador. Uma vez no referido compartimento, a solução resultante das seringas dois e três recebe o conteúdo da quarta seringa, no qual passa por um novo processo de mistura. Para um maior esclarecimento, a figura abaixo ilustra o trajeto realizado pelos reagentes.

Figura 14. Mecanismo de aquisição de dados empregado pelo SFM-4000/S.



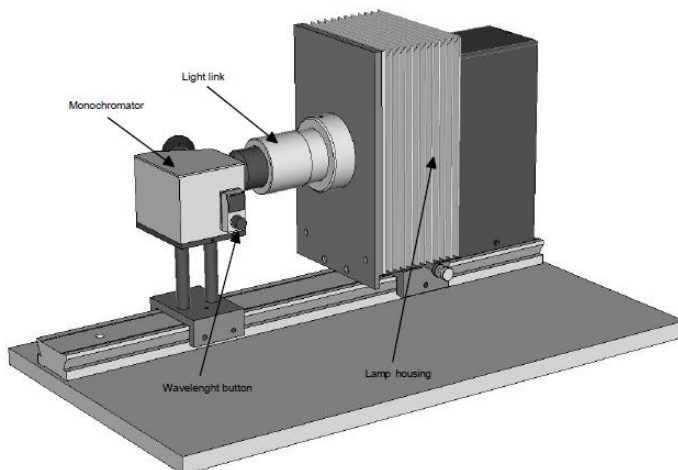
Fonte: Biologic Science Instruments (2012)

Uma vez que todas as substâncias envolvidas se encontraram, a solução final segue do terceiro misturador até a cubeta de observação para que as análises pretendidas pudessem ser realizadas.

Conforme já colocado, no experimento foi utilizada a cubeta de fluorescência 15-7,5 (FC15-7,5). Trata-se de um recipiente feito em quartzo, com bordas enegrecidas, composta por dois caminhos ópticos (um de 1,5 mm e outro de 0,75 mm). Por recomendação do fabricante escolheu-se iluminar a amostra no caminho de 0,75 mm e realizar a detecção no de 1,5 mm. A escolha em utilizar tal cubeta se deu, primeiramente pelo fato de se estar trabalhando com o modo de fluorescência; e em segundo, pois por possuir bordas enegrecidas, tal material acaba por reduzir a dispersão de luz. Uma vez dentro da cubeta dá-se início a aquisição dos dados; sendo que para tal, a mistura é iluminada por uma fonte de luz (lâmpada de Xenônio - acrescida de mercúrio - de 150 W), na qual permite a mensuração de propriedades ópticas da substância.

A excitação no equipamento utilizado é feita através do sistema óptico MOS/200. O MOS/200 é composto pela fonte de luz e por um monocromador (conforme figura a seguir).

Figura 15. MOS-200



Fonte: Biologic Science Instruments (2012).

No monocromador, o tamanho da fenda de saída é fixado em um milímetro. O comprimento de onda para excitação da amostra é ajustado de maneira manual. O sistema empregado para aquisição dos dados pelo MOS/200 é bastante simples: a luz emitida pela fonte luminosa passa por um adaptador (*light link*) e atinge o monocromador de excitação. Em seguida, a luz monocromática é conduzida até a cubeta através de um cabo de fibra óptica. Na célula de observação, além da mistura e da fibra óptica, também está conectado o detector do tubo fotomultiplicador. O controle do tubo fotomultiplicador, e a filtragem do sinal é realizada pelo dispositivo PMS-250 (*“Photomultiplier control unit”* - 250). A filtragem do sinal se deu através do uso de um filtro de corte instalado no próprio tubo fotomultiplicador. Estes filtros são utilizados para filtrar o comprimento de onda de excitação e detectar a luz emitida pela amostra. Neste trabalho, utilizamos um comprimento de onda de excitação de 340 e 380 nm, conforme já explicitado. No tubo fotomultiplicador inseriu-se um filtro de corte de 515 nm, sendo possível, deste modo, que toda a luz emitida pela amostra com mais de 515 nm fosse recolhida em função do tempo.

6.2 METODOLOGIA DE ANÁLISE DOS DADOS

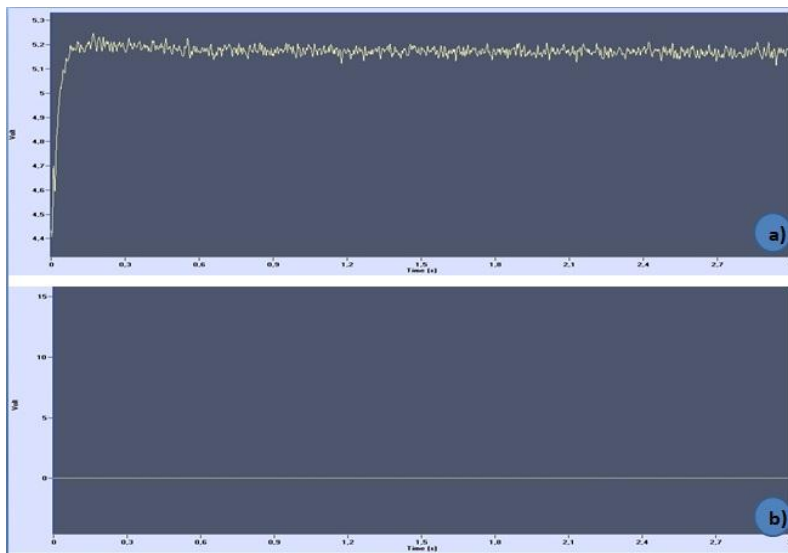
A análise quantitativa dos resultados obtidos nas experimentações foi realizada através do uso do software “Statistica”, versão 7.0, através do qual foi analisada a média e o desvio padrão dos dados obtidos. Por meio dele, foi possível a construção dos gráficos com os resultados obtidos em termos de concentração de cálcio. Em algumas categorias estudadas, para melhor tirar conclusões, fez-se uso da ferramenta estatística média. Por fim para interpretação global dos dados, utilizaram-se autores que pudessem estabelecer relações pertinentes sobre a temática.

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O objetivo deste trabalho consiste em analisar/quantificar a quantidade de cálcio captado por astrogliomas após um estímulo glutamatérgico. A decisão em utilizar tal neurotransmissor, como já fora comentado, se deu pelo fato de que vários estudos publicados mostraram que a glia possui receptores para muitos neurotransmissores usados na comunicação sináptica, assim como a maioria dos canais de íons presentes nos neurônios (Fields, 2004); neste contexto, o glutamato exerce seus efeitos justamente através de sua interação com receptores ionotrópicos e/ou metabotrópicos presentes na superfície da membrana destas células (Nardin, 2006, p.16); além disso, toda vez que glutamato é liberado na fenda sináptica, os astrócitos respondem com aumento súbito na concentração de íons cálcio em seu citoplasma (Christante, 2010, p.22).

Pautada nestes conhecimentos, parece óbvio que conhecer a célula glial utilizada e seus receptores de membrana é essencial para entender o processo em questão. Para que fosse possível avaliar a viabilidade do uso de astrogliomas no presente estudo, se fez necessário a realização de uma experiência piloto para observar se haveria resposta celular após a aplicação de um estímulo glutamatérgico. Em tal teste encontrou-se, por exemplo, curvas similares a apresentada abaixo.

Figura 16. Curvas obtidas na experiência-teste.



a) Curva obtida na experiência – teste após estímulo glutamatérgico nos astrogliomas. Esta curva foi obtida estimulando a amostra a um comprimento de onda de 340 nm, temperatura de 22°C, concentração de cálcio de 5M. b) Curva obtida na experiência – teste sem estímulo glutamatérgico nos astrogliomas. Curva obtida sob as mesmas condições da anterior (comprimento de onda de 340 nm, temperatura de 22°C, concentração de cálcio de 5M). Fonte: Dados primários (2014).

A curva demonstra haver interação do glutamato com a membrana dos astrogliomas, uma vez que, quando em contato, houve a entrada de cálcio do meio extracelular para o intracelular. É sabido que a entrada de cálcio se dá somente após o estímulo glutamatérgico; não havendo tal estímulo, também não há fluorescência sendo emitida pelas células.

Voltando para a experiência realizada, conforme já explicitado, lançou-se mão de um equipamento raramente utilizado para estes estudos. A metodologia empregada para aquisições dos dados experimentais desta natureza, segundo o que é encontrado nas mais diversas literaturas, normalmente é pautada em eletrofisiologia, microscopia confocal e fluorimetria (Vines, McBean, Fernandez, 2012, p.01). No presente trabalho, optou-se em utilizar o equipamento de fluxo interrompido SFM/4000S; no modo de captura de dados por

fluorescência (espectroscopia de fluorescência) que, por sua vez, vai ao encontro do que é habitualmente utilizado neste tipo de experimentações.

Segundo Heneine (2003, p.181), técnicas pautadas em fluorimetria são muito utilizadas para a determinação de vitaminas, neurotransmissores e outras substâncias fluorescentes, pois neste processo de excitação os compostos orgânicos não são destruídos. A escolha em se utilizar o modo fluorescência foi motivada pelo fato de o indicador de cálcio, após a devida estimulação, emitir fluorescência quando em contato com tal íon, além de, segundo de Paula e Cesar (2012, p.10), a fluorescência ser um processo óptico bastante intenso o que torna a coleta de dados uma ferramenta das mais utilizadas em biologia celular.

As seguintes concentrações foram utilizadas nas experimentações:

Tabela4. Concentrações utilizadas nas coletas de dados (continua)

SUBSTÂNCIA	CONCENTRAÇÃO UTILIZADA	JUSTIFICATIVA	OBSERVAÇÃO
Glutamato	2 μ M	Em condições fisiológicas, a concentração de glutamato na fenda é de 1-2 μ M (Danbolt, 2001 apud Thomazi, 2009).	---
Cálcio	3M, 4M, 5M, 6M e 7M	Segundo Pimentel (2003, p.02), a concentração de cálcio extracelular é de aproximadamente 5M. Já Fernandes, por sua vez, ressalta que no meio extracelular tal concentração varia entre 3-10M. Como o intuito deste trabalho era se aproximar ao máximo de uma situação fisiológica optou-se por utilizar concentrações de cálcio similares a encontradas no meio extracelular	Os cálculos de diluição foram baseados na “lei da diluição de Ostwald”. Ressalta-se que a escolha em se trabalhar com tais concentrações não vai ao encontro do que normalmente é utilizado nestas experimentações onde os níveis de cálcio utilizados são muito inferiores a estes, algo em torno de micromolares.

Tabela4. Concentrações utilizadas nas coletas de dados (conclusão)

Células	$\pm 1.500.000$ células/seringa de 10 ml	A proporção das mesmas por experimentação era sempre a mesma, garantindo, deste modo, a mesma condição para todas as aquisições de dados.	Convém lembrar que o pH do meio estava sempre em torno de 7,0, visando prevenir morte/toxicidade para as células ou alteração nos resultados que seriam encontrados; uma vez que o pH do meio pode afetar o perfil da fluorescência. Já a temperatura utilizada foi a ambiente (em torno de 22°C controlada por condicionador de ar). Embora Kuplich (2007) considere não tratar-se de um fator muito crítico e permitir a observação da fluorescência, optou-se por indiretamente manter a temperatura a mesma para evitar oscilações bruscas entre um experimento e outro.
TRITON	0,1%	Estas concentrações foram baseadas no trabalho de Lambert et al (1999), além do que é recomendado pela nota técnica empresa fornecedora dos produtos.	As concentrações utilizadas foram baseadas para solução de 10 ml.
EGTA	4,5 mM		

Fonte: Diversas.

No que tange especificamente a metodologia empregada, Lambert (1999, p.03) lembra que é difícil descrever com precisão um modo padronizado de se mensurar a concentração de cálcio citosólico, uma vez que há uma grande variedade de indicadores fluorescentes de

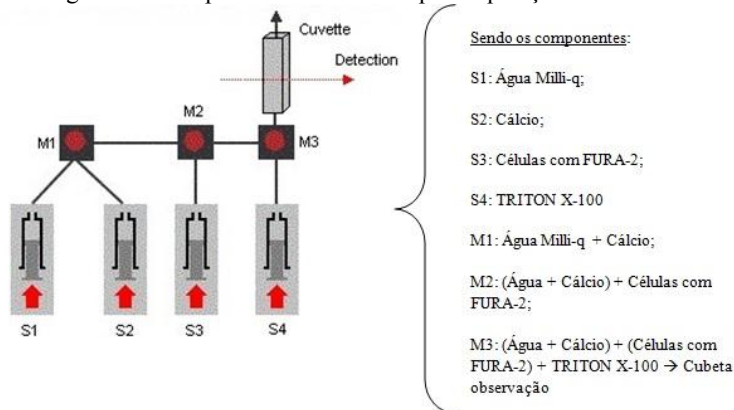
cálcio. Segundo o mesmo autor, a isto se soma a imensa diversidade de células a serem estudadas e a vasta gama de equipamentos para detecção que podem ser utilizados.

Conforme pode ser observado na Figura 16, a qual representa a realização do teste piloto, os dados adquiridos pelo equipamento são fornecidos em termos de voltagem (*volt*). O indicador de cálcio FURA-2 é uma substância de dupla excitação, apresentando comprimentos de onda de excitação diferentes quando ligado ao cálcio e quando sem ele. “Quando está ligado ao cálcio absorve para o comprimento de onda de aproximadamente 340 nm, na forma não ligada para aproximadamente 380 nm” (SOUSA, 2011, p.32). Deste modo, segundo Sousa (2011, p.32), podem-se avaliar os níveis de cálcio intracelular comparando a razão F340/380. “Um aumento no valor da razão entre esses comprimentos de onda permite-nos deduzir um aumento dos níveis de cálcio intracelular livre” (SOUSA, 2011, p.33). Simpson (1999, p. 21) por sua vez lembra que no caso de corantes ratiométricos, como o FURA-2, é sempre necessário conhecer os valores de fluorescência máxima e mínima emitidas para cada experimentação a fim de melhor compreender o comportamento e os resultados encontrados. O protocolo experimental elaborado para esta dissertação encontra-se em apêndice (Apêndice A).

A experimentação, conforme sugerem as literaturas que embasam este trabalho, foi dividida em três etapas: monitorização da fluorescência máxima ($R_{m\acute{a}x}$); fluorescência emitida após um estímulo glutamatérgico (R); monitoração da fluorescência mínima ($R_{m\acute{i}n}$).

A obtenção da curva de fluorescência máxima é fundamental. Por meio dela, pode-se analisar qual será o máximo de fluorescência que se pode obter nas diferentes concentrações de cálcio utilizadas. Para tal, foi necessário saturar totalmente o indicador FURA-2 com cálcio. Segundo Lambert (1999), isso se consegue utilizando o detergente enzimático TRITON X-100. Como já visto, o equipamento utilizado possui quatro entradas para seringas (dispositivo este utilizado para armazenar as amostras a serem utilizadas, e, injetá-las para aquisição de dados). Para que a mensuração do $R_{m\acute{a}x}$ fosse possível, dividiram-se os reagentes do seguinte modo:

Figura 17. Componentes envolvidos para aquisição de Rmáx.

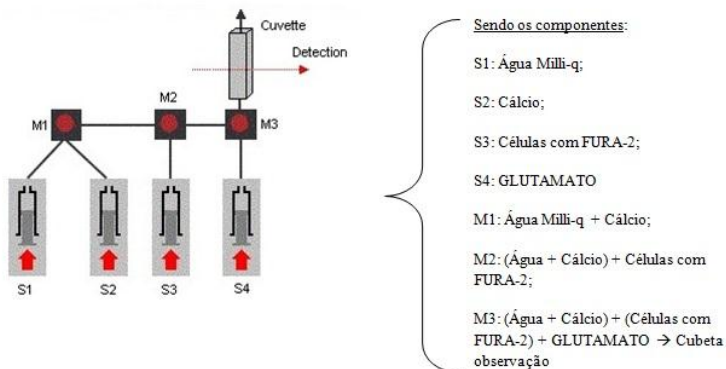


Fonte: Dados primários (2014).

O TRITON X-100 foi utilizado no intuito de “matar” as células e liberar o indicador de cálcio em sua forma desesterificada, possibilitando, assim, que o mesmo pudesse ser “completamente” saturado por cálcio, emitindo deste modo a maior fluorescência possível de ser encontrada na experimentação. Esta etapa, assim como as demais, foram feitas para cada concentração de cálcio utilizada. Tem-se, neste caso, através da lise celular, a reação do FURA-2 com todo cálcio disponível naquele momento (indiferente da concentração utilizada) ou com a maior parte dele.

Para a obtenção da fluorescência a partir de um estímulo glutamatérgico, a metodologia empregada foi similar, modificando-se somente o componente da quarta seringa:

Figura 18. Componentes envolvidos para aquisição de R.

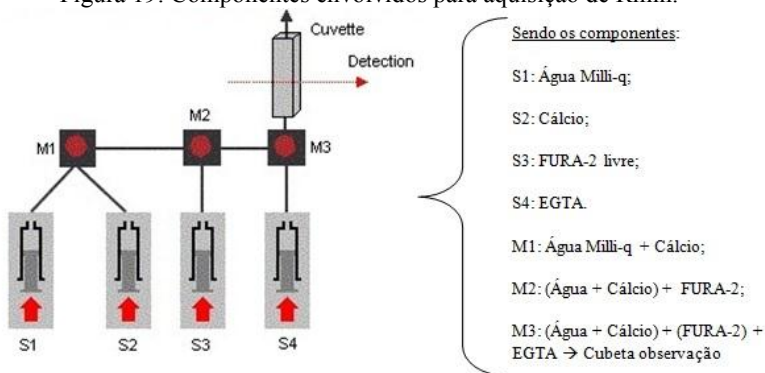


Fonte: Dados primários (2014).

Neste caso, utiliza-se o glutamato, com o intuito de se conhecer quanto cálcio entraria no astroglioma espontaneamente, com as células vivas, após um estímulo “despolarizante” (despolarização de sua membrana). Neste caso, tinha-se o indicador de cálcio reagindo com Ca^{2+} que entra na célula através de canais abertos em sua membrana celular. Não necessariamente todo o cálcio utilizado para as mensurações ingressa no interior da célula. Para que tal reação fosse possível, foi necessário que o estímulo glutamatérgico utilizado fosse suficiente para permitir a entrada pacífica do cálcio para o interior celular.

Por fim, a terceira etapa de coleta de dados consistiu em se mensurar o mínimo de fluorescência possível de ser adquirida. Antes da experimentação em si, foi necessário liberar o indicador de cálcio presente no interior das células, deixando-o livre para interagir com cálcio. Para tal, foi utilizado um béquer de 100 ml. Nele colocou-se uma dada quantidade de células carregadas com indicador FURA-2, e, acrescentou-se o TRITON X-100 para que houvesse lise celular, e, consequentemente, liberação do indicador de cálcio. Convém destacar que a proporção célula : TRITON X-100 utilizada era sempre a mesma; ou seja 1:1 em volume (1mL de células para 1mL de TRITON X-100). A solução assim obtida assumiu lugar na seringa três; e a quarta entrada foi novamente substituída pelo EGTA, conforme ilustra a figura abaixo.

Figura 19. Componentes envolvidos para aquisição de Rmin.



Fonte: Dados primários (2014).

Quando o FURA-2 entra em contato com cálcio, há a emissão da fluorescência máxima; porém, ao acrescentar-se o EGTA à reação, tem-se a quelatação do cálcio, e, conseqüentemente, a diminuição da fluorescência gerada. Oliveira et al (2010, p.151) lembra que quelatação é um processo físico-químico que leva a absorção de íons multivalentes positivos por substâncias químicas específicas. Optou-se em utilizar o ácido tetracético etilenoglicol (EGTA) pelo fato de ser o ácido aminopolicarboxílico; com maior seletividade pelo íon cálcio; ou seja; trata-se de um agente quelante seletivo para cálcio.

Sabendo que o equipamento fornece valores de fluorescência e, tendo em vista que tais valores devem ser expressos em termos de concentração, optou-se por dividir este capítulo em resultados encontrados em termos de fluorescência e resultados encontrados em termos de concentração de cálcio. Acredita-se que deste modo a análise dos dados acabará tornando-se mais coesa.

7.1 RESULTADOS ENCONTRADOS EM TERMOS DE FLUORESCÊNCIA

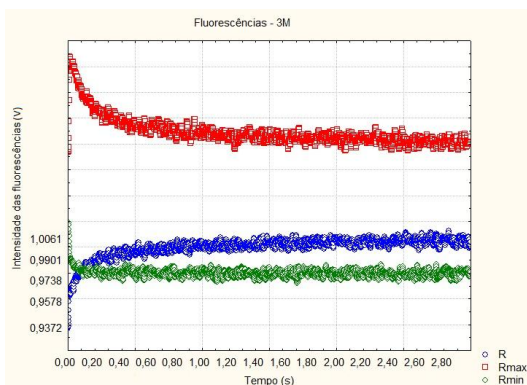
O equipamento mensurou a fluorescência emitida pelo indicador ao se complexar ao cálcio e em seu estado livre. Como a fluorescência mensurada era a emitida pelo indicador de cálcio, faz-se interessante o entendimento do mecanismo de complexação até a emissão da luz.

Os indicadores de cálcio funcionam basicamente através de alteração nas propriedades de fluorescência quando ligados direta ou indiretamente ao íon cálcio (Farias et al, 2012, p. 27). Lambert (1999, p.04), por sua vez, lembra que as propriedades fundamentais dos indicadores são semelhantes, na medida em que a ligação de cálcio produz mudança no comprimento de onda de excitação de ambos os espectros de emissão de fluorescência.

No que diz respeito à interação com cálcio, somente a forma FURA-2 é sensível a tal íon, sendo, portanto, necessário que o grupamento acetoximetil (AM) do indicador seja clivado no interior celular para que o complexo indicador/cálcio possa ser formado. Quanto ao mecanismo envolvido nesta transformação, Lambert (1999, p.32) lembra que uma vez dentro da célula, o grupamento acetoximetil é clivado por esterases intracelulares deixando o FURA-2 livre. Neste processo, há a exposição de cinco cargas negativas, que, por sua vez, dificultam a saída do indicador para o meio extracelular favorecendo sua acumulação intracelular. Segundo Tsien (2009, p.818), embora os subprodutos da hidrólise do grupamento AM sejam ácido acético e formaldeído, estes são gerados de modo tão vagaroso e em concentrações tão baixas, que não causam toxicidade evidente para as células (exceto em tecidos especialmente sensíveis, os quais requerem a administração de antídotos formaldeídos). Em sua forma desesterificada, o indicador de cálcio FURA-2 é capaz de ligar-se ao Ca^{2+} . Romano-Silva (1993) e Ribeiro-Santo et al (1993 apud Souza, 2011, p. 102) destacam que na presença do FURA-2 o aumento de cálcio no citoplasma devido à despolarização da membrana é o que causa um aumento na fluorescência.

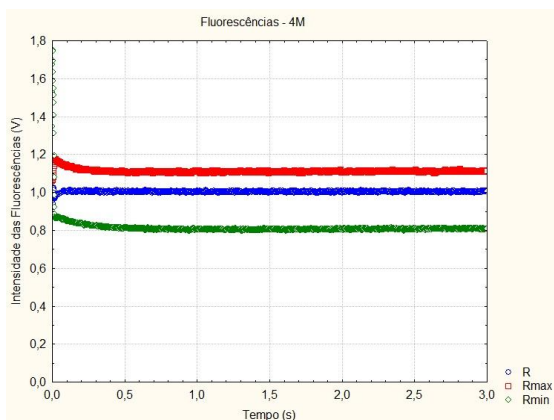
O comportamento dos gráficos encontrados nas experimentações pode ser observado pelas figuras abaixo:

Figura 20. Fluorescências máxima, mínima e após estímulo glutamatérgico ao longo do tempo para concentração de cálcio de 3M.



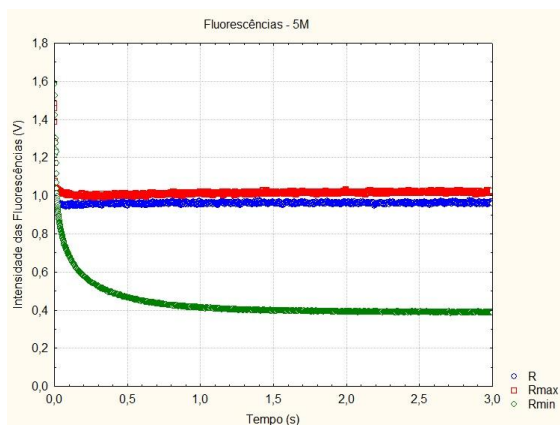
Curvas obtidas através das relações de fluorescência 340/380, temperatura 22°C.
Fonte: Dados Primários (2014).

Figura 21. Fluorescências máxima, mínima e após estímulo glutamatérgico ao longo do tempo para concentração de cálcio de 4M.



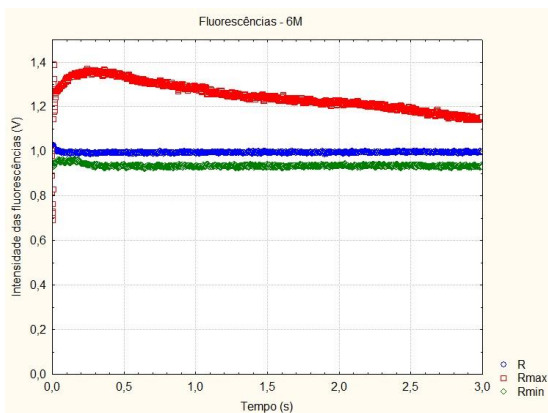
Curvas obtidas através das relações de fluorescência 340/380, temperatura 22°C.
Fonte: Dados Primários (2014).

Figura 22. Fluorescências máxima, mínima e após estímulo glutamatérgico ao longo do tempo para concentração de cálcio de 5M.



Curvas obtidas através das relações de fluorescência 340/380, temperatura 22°C.
Fonte: Dados Primários (2014).

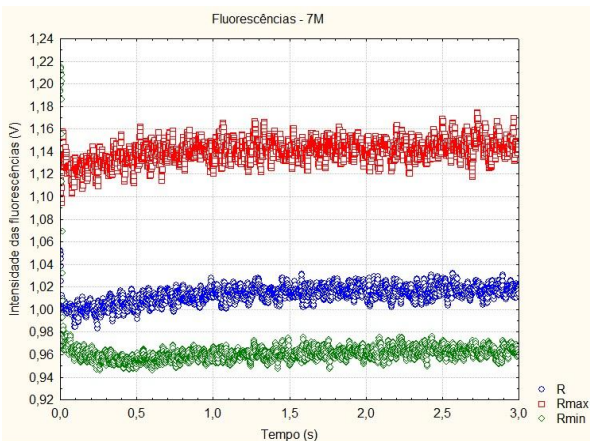
Figura 23. Fluorescências máxima, mínima e após estímulo glutamatérgico ao longo do tempo para concentração de cálcio de 6 M.



Curvas obtidas através das relações de fluorescência 340/380, temperatura 22°C. Observa-se na curva de fluorescência máxima um decréscimo significativo. Declínios na intensidade de fluorescência, segundo Luiz (2009), podem ocorrer devido a muitos processos; fenômeno este chamado de supressão. No caso em questão, pode estar ocorrendo supressão devido à concentração elevada de íons

cálcio; reações de estado excitado; rearranjos moleculares; transferência de energia ou formação de complexos no estado fundamental. Fonte: Dados Primários (2014).

Figura 24. Fluorescências máxima, mínima e após estímulo glutamatérgico ao longo do tempo para concentração de cálcio de 7 M.



Curvas obtidas através das relações de fluorescência 340/380, temperatura 22°C. Fonte: Dados Primários (2014).

Os gráficos acima apresentados elucidam os valores das fluorescências máxima, mínima e após um estímulo glutamatérgico para as concentrações de cálcio variando de 3 a 7 M. Embora tenham comportamento visual aparentemente diverso, os valores encontrados em termos de intensidade de fluorescência são bastante aproximados.

Tabela 5. Valores extremos de fluorescência por concentração de cálcio

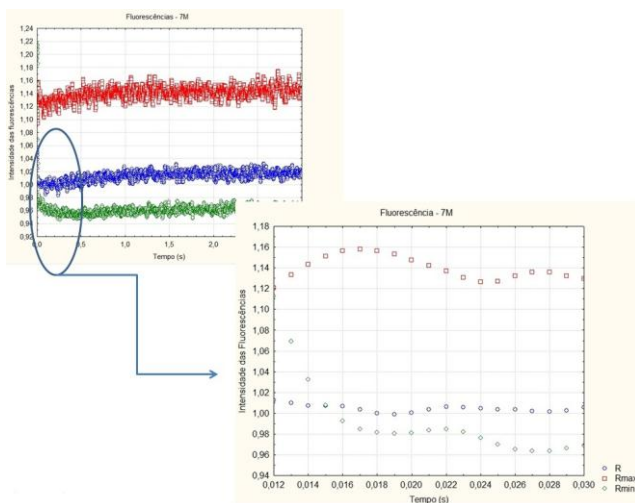
Concentração de cálcio	Varição R	Varição Rmáx	Varição Rmin
3M	0,9371 - 1,0127	1,0738 - 1,1479	0,9719 - 1,0188
4M	0,9171 - 1,0249	1,0615 - 1,1757	0,7957 - 1,7475
5M	0,9312 - 0,9770	0,9691 - 1,4831	0,3843 - 1,5906
6M	0,9801 - 1,0285	0,6883 - 1,3884	0,9200 - 0,9621
7M	0,9832 - 1,0523	1,0941 - 1,1743	0,9457 - 1,2148

Fonte: Dados primários (2014).

Na tabela acima pode-se observar os valores máximos; mínimos e após estimulação glutamatérgica das fluorescências encontradas em cada uma das concentrações de cálcio utilizadas. Através delas pode-se observar que os valores de R_{\max} obtidos oscilaram de 0,6883 a 1,4831, com média de 1,0857 e desvio padrão de 0,5620. Os valores de R oscilaram de 0,9171 a 1,0523, com média de 0,9847 e desvio padrão de 0,095. Já os extremos de R_{\min} , por sua vez, foram 0,3843 até 1,7475, cuja média é 1,0659 e desvio padrão de 0,9639. Convém destacar que o erro de medida (erro padrão) para a fluorescência máxima (R_{\max}) é 2,7980; para a fluorescência após estímulo glutamatérgico (R) é 2,3316 e para fluorescência mínima (R_{\min}) é 3,1999.

Ao ampliar-se o gráfico de 7 M, é possível melhor observar o comportamento das curvas de fluorescência obtidas.

Figura 25. Ampliação do gráfico de variação da fluorescência ao longo do tempo para uma concentração de cálcio de 7M.



Fonte: Dados primários (2014).

O comportamento inicial deste gráfico é comum a todos os demais, independentemente da concentração em que se trabalha. Através da observação deste, nota-se que, no início do processo, a fluorescência mínima tem um valor maior do que a fluorescência por glutamato. A explicação para tal reside na aquisição de dados desencadeados por estímulo glutamatérgico, onde tem-se um período refratário justificado

pela “demora” na interação do glutamato com o receptor de membrana, diferente do que ocorre no caso da mensuração da fluorescência mínima e/ou máxima onde não há barreiras (membranas celulares) para a interação cálcio-indicador.

Segundo Vines, McBean e Fernandez (2012, p. 01), mudanças no nível de cálcio intracelular ocorrem rapidamente após a estimulação. Já Tareilus e Breer (1995), por sua vez, colocam que o nível de cálcio intracelular aumenta rapidamente após um estímulo despolarizante, ainda no ponto zero segundo. Tais afirmações corroboram com os resultados encontrados, onde temos um processo de extrema agilidade que se perpetua apenas por poucos milésimos de segundo.

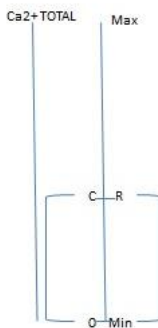
7.2 RESULTADOS ENCONTRADOS EM TERMOS DE CONCENTRAÇÃO DE CÁLCIO

Os dados obtidos experimentalmente até então demonstrariam somente haver cálcio envolvido na reação, uma vez que há fluorescência sendo emitida pela amostra. Contudo, é válido lembrar que o indicador de cálcio FURA-2 é mais propenso a emitir fluorescência após interação com cálcio se iluminado a um determinado comprimento de onda. Entretanto, fluorescência não é sinônimo de concentração de cálcio, e, por isso, se fez necessário um estudo mais aprofundado dos fenômenos envolvidos na reação, de modo a permitir a conversão das unidades/valores.

Há na literatura uma equação proposta por Grynkiewicz e colaboradores no ano de 1985 a qual propõe a conversão da fluorescência adquirida para concentração de cálcio intracelular. No entanto, antes de simplesmente aplicá-la, faz-se prudente um entendimento maior dos fenômenos envolvidos até chegar-se a uma equação que descreva tal conversão.

Partindo-se do pressuposto de que eram mensuradas as fluorescências máxima, mínima e com glutamato, facilmente pôde-se pensar na seguinte correlação:

Figura 26. Relações matemáticas das fluorescências medidas para cálculo da concentração de cálcio



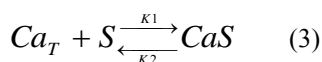
Fonte: Dados primários (2014).

$$\frac{Ca_T - C}{C - 0} = \frac{Max - R}{R - Min} \quad (1)$$

$$C = \frac{Ca_T (R - Min)}{(Max - R)} \quad (2)$$

Onde: Ca_T = Cálcio Total; C = Concentração de cálcio intracelular; R = razão 340/380 obtidas a partir de estímulo glutamatérgico; Max = razão 340/380 sob condições de cálcio saturado; Min = razão 340/380 sob condições de cálcio livre.

Analisando agora a cinética da reação estudada, que é uma cinética de primeira ordem, tem-se:



Onde Ca_T = Cálcio Total; S = representa indicador de cálcio; CaS = representa o complexo formado pelo indicador de cálcio FURA-2/AM e o cálcio após a reação/complexação.

$$\frac{dCaS}{dt} = k_1[Ca_T][S] - k_2[CaS] \quad (4) \quad \left. \vphantom{\frac{dCaS}{dt}} \right\} \begin{array}{l} \text{“Lei de} \\ \text{ação das} \\ \text{massas”} \end{array}$$

Considerando-se trabalhar com uma cinética de equilíbrio rápido, logo:

$$0 = k_1[Ca_T][S] - k_2[CaS] \quad (5)$$

$$k_2[CaS] = k_1[Ca_T][S] \quad (6)$$

$$\frac{k_2}{k_1} = \frac{[Ca_T][S]}{[CaS]} \quad (7)$$

Como $\frac{k_2}{k_1}$ tende ao equilíbrio, podemos considerá-lo simplesmente “K”, logo:

$$k = \frac{[Ca_T][S]}{[CaS]} \Rightarrow \frac{[CaS]}{S} k = [Ca_T] \quad (8)$$

Sabendo que a cinética de saturação do cálcio é representada pela equação acima descrita; ou seja:

$$[Ca_T] = \frac{[CaS]}{S} k \quad (9)$$

e, lembrando que $C = \frac{Ca_T(R - Min)}{(Max - R)}$; tem-se, portanto,

$$C = \frac{[CaS]}{[S]} k \frac{(R - Min)}{(Max - R)} \quad (10)$$

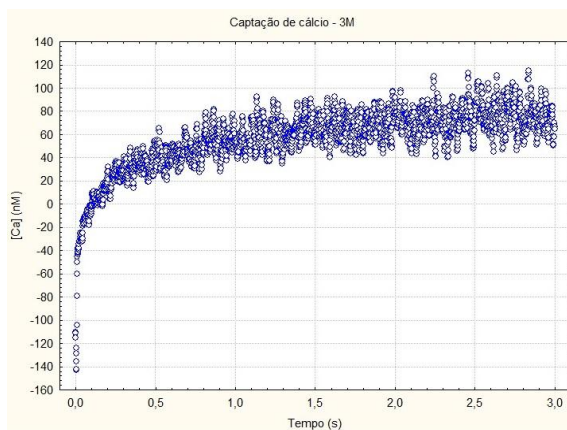
Onde C = concentração de cálcio intracelular; Kd = constante de dissociação do FURA-2/AM, de valor 224 nM; R = razão 340/380 obtidas a partir de estímulo glutamatérgico; Rmax = razão 340/380 sob

condições de cálcio saturado; R_{min} = razão 340/380 sob condições de cálcio livre; S_{fb} = razão das fluorescências de base (380nm) sob condições de cálcio livre e saturado.

Convém ressaltar que se trata exatamente da mesma equação proposta por Grynkiewicz e colaboradores, com a diferença de que o mesmo nomeia o fator $\frac{[CaS]}{[S]}$ por “ S_{fb} ” ou “fator de escala”, que indiretamente se refere ao quociente de indicador livre e saturado por cálcio, determinado a um comprimento de onda de 380 nm.

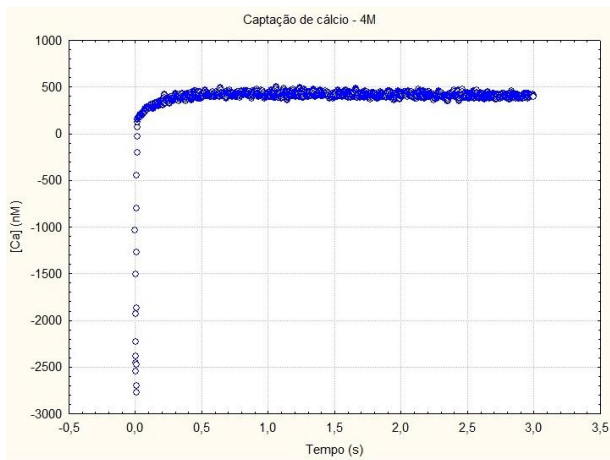
Aplicando-se a equação aos valores encontrados nas experimentações, obtêm-se os seguintes gráficos de concentração de cálcio ao longo do tempo:

Figura 27. Captação de Ca^{2+} ao longo do tempo para uma concentração de cálcio de 3M.



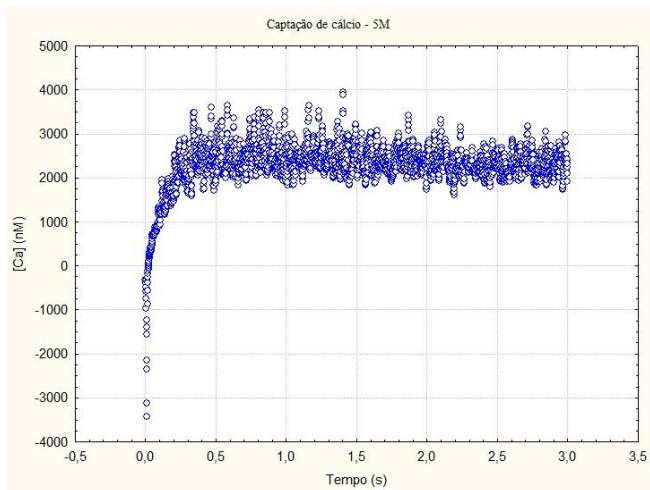
Fonte. Dados primários (2014).

Figura 28. Captação de Ca^{2+} ao longo do tempo para uma concentração de cálcio de 4M.



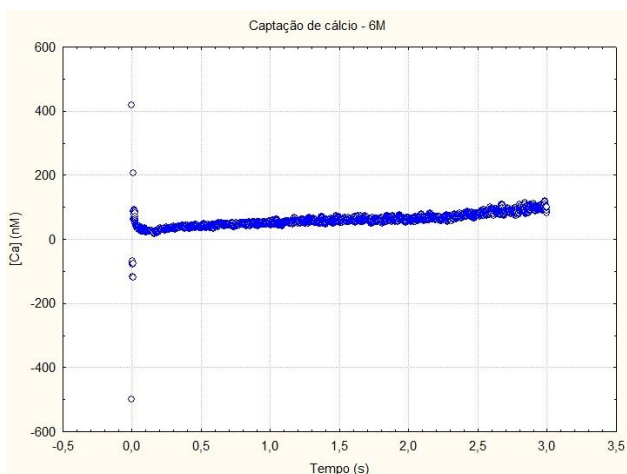
Fonte. Dados primários (2014).

Figura 29. Captação de Ca^{2+} ao longo do tempo para uma concentração de cálcio de 5M.



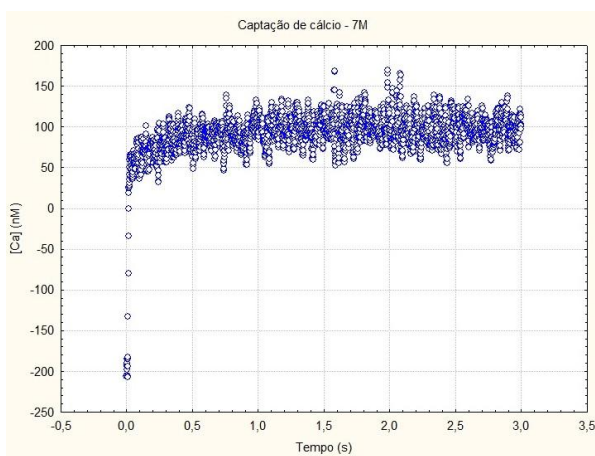
Fonte. Dados primários (2014).

Figura 30. Captação de Ca^{2+} ao longo do tempo para uma concentração de cálcio de 6M.



Fonte. Dados primários (2014).

Figura 31. Captação de Ca^{2+} ao longo do tempo para uma concentração de cálcio de 7M.



Fonte. Dados primários (2014).

A uma primeira vista, pode-se observar que em todas as aquisições houve cálcio sendo captado pelas células. Um olhar mais aprofundado nos faz perceber que no início de todas as concentrações, mais precisamente no tempo zero, há um valor negativo de concentração, o que matematicamente seria considerado incorreto e/ou impossível. Matematicamente, é possível explicar a presença de tais valores. Como estes derivam de uma operação aritmética que envolve subtrações e divisão, nota-se que, no início da reação, a fluorescência mínima é maior do que a fluorescência com glutamato, conforme já explicitado – o que ocasiona o surgimento de valores negativos. O fato de o indicador ser ratiométrico reforça a justificativa aos resultados negativos encontrados, uma vez que, se trabalhou com um fluorocromo, ou seja, moléculas químicas que absorvem luz em determinado comprimento de onda (luz ultravioleta) e emitem em outro (luz visível); isto é; ficam fluorescentes (Scheucher e Santos, 2012).

A metodologia empregada nesta experimentação é baseada em espectrofluorimetria. O seu emprego se dá no intuito de analisar justamente a fluorescência de uma amostra. Mendes (s.d.) lembra que o conhecimento da absorção de luz pela matéria é a forma mais usual de determinar a concentração de compostos presentes em solução, sendo a intensidade da cor de uma solução proporcional à concentração das moléculas absorventes de luz.

A absorção da luz pela matéria envolve a incorporação da energia contida no fóton pela estrutura das moléculas absorventes (neste caso o FURA-2). Quando isso acontece, as moléculas absorventes passam do estado fundamental (estado energético mais baixo) para o estado excitado (estado energético mais alto). Heneine (2003, p. 184), por sua vez, ressalta que a absorção da luz deixa o sistema energizado, podendo ocorrer desde uma simples excitação, até a ionização da matéria. “Se o elétron apenas oscila, sem deixar seu orbital, o sistema apenas se aquece. Nos movimentos moleculares também se observa aquecimento do sistema” (HENEINE, 2003, p. 184). A energia de elétrons repostos na posição inicial é emitida como fluorescência ou fosforescência.

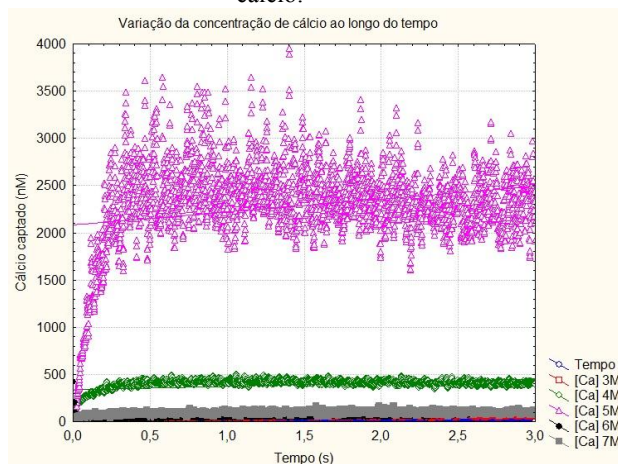
Pautando-se nos conhecimentos acima explicitados, ficam mais claros os resultados encontrados. No começo do experimento, há absorção de energia, a qual segue-se até o rompimento da inércia energética das moléculas do indicador – fato que justifica os valores negativos no início, pois a quantidade de energia absorvida a princípio tem de ser maior que a energia emitida (fluorescente); de modo a gerar as relações de fluorescência (R ; $R_{\text{máx}}$; R_{min}) diferentemente de um comportamento tido como normal. A partir do momento que esta inércia

é rompida, o indicador começa a intensificar a quantidade de energia emitida (fluorescência), de modo que a relação entre energia emitida *versus* energia absorvida começa a crescer assumindo valores positivos. Como no início do processo a energia emitida era maior do que a refletida justifica-se as relações negativas de R, Rmáx e Rmin para início de processo, as quais são observadas em quaisquer das concentrações de cálcio.

Em termos biológicos pode-se entender tal fenômeno do seguinte modo: temos no início do processo as células em meio desprovido de íons Ca^{2+} . As mesmas somente entraram em contato com o referido íon no decorrer da experiência, mas precisamente no segundo misturador do equipamento. Tal interação pode vir a estourar algumas das células que estão em suspensão, o que acabaria originando um aumento estrondoso na fluorescência e, indiretamente explica a diferença mínima encontrada entre as concentrações de cálcio utilizadas.

Por fim, para uma análise geral dos resultados obtidos, sem os valores negativos iniciais, um gráfico contendo todas as concentrações de cálcio juntas se faz interessante.

Figura 32. Captação de Ca^{2+} ao longo do tempo para todas as concentrações de cálcio.



Fonte: Dados primários (2014).

O gráfico acima demonstra que na concentração de cálcio de 5M houve uma captação de cálcio muito mais significativa do que nas demais. Concentração esta, segundo Pimentel (2003, p.02), tida como

fisiológica para o meio extracelular. Abaixo desta concentração, as células aparentemente foram inibidas pela falta de substrato; já acima disto, as células foram inibidas pelo excesso do mesmo. Fontes (2005) reforça que o excesso de substrato realmente pode proporcionar uma saturação do captador do substrato (no caso em questão, as células), reduzindo assim sua atividade.

Seguida a concentração de 5M, a concentração de cálcio que foi mais bem captada pelas células foi a de 4M, como pode ser observado no gráfico acima apresentado. Na concentração de 3M houve menos captação do que na de 4M, o que vai ao encontro do explicitado acima; já na concentração de 7M captou-se menos cálcio do que na de 6M, o que comprova haver inibição por excesso de substrato.

É válido destacar que a elevação da concentração de cálcio intracelular por influxo do íon vindo do compartimento extracelular possivelmente através da ativação de, segundo Batista (2008), receptores ionotrópicos não é o único mecanismo de elevação de cálcio no interior destas células. Ainda segundo a mesma fonte, se os receptores envolvidos no processo forem os metabotrópicos, possivelmente haverá a liberação de cálcio de estoques celulares internos, como, por exemplo, o retículo endoplasmático. Para este trabalho, como já comentado no início deste capítulo, não foi possível determinar os receptores de membrana que estavam envolvidos, portanto, considerou-se que um possível efluxo de cálcio de estoques celulares seria tão pequeno ao ponto de não causar modificações significativas nos resultados, sendo, deste modo, desprezado.

8. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Dada as limitações encontradas durante o desenvolvimento deste trabalho, algumas análises, considerações e sugestões para pesquisas futuras se fazem essenciais:

- Estudo/conhecimento de quais receptores de glutamato presentes na membrana das células utilizadas estão envolvidos, visando uma melhor compreensão do processo como um todo;

- Estudo específico da liberação de cálcio dos estoques celulares neste processo;

- Estudo mais aprofundado sobre as concentrações de cálcio utilizadas. Conforme comentado, normalmente utilizam-se concentrações muito menores das que foram empregadas nesta pesquisa. Sabe-se, por meio deste trabalho, que houve captação de cálcio, mas não conseguimos precisar se houve sofrimento ou apoptose celular devido a uma concentração muito elevada do mesmo ou não;

- Utilização de cultura de astrócitos saudáveis. Comparações com tais células poderiam demonstrar se o comportamento em relação à astrogliomas é o mesmo ou não;

- Modificar o agente estimulante. Há estudos que consideram o glutamato apenas coadjuvante neste processo de comunicação, conferindo papel principal ao ATP. Sugere-se, portanto, a utilização desta outra substância para avaliar se haveria modificações significativas nos resultados encontrados quando em uso de outro agente;

- Modificar o agente de diluição do cálcio. Inicialmente o uso da água Milli-q parecia atender toda a necessidade, uma vez que o fato desta ser uma substância destituída de cátions e ânions garantiria não haver eletrólitos indesejados afetando os resultados encontrados. Contudo, além de este diluente não ser fisiológico, as células poderiam, caso houvesse entrada de água em demasia, até mesmo romperem-se. Pautando-se nisto, aconselha-se que em estudos futuros utilize-se solução salina ao invés de água para diluição;

Por fim, convém ressaltar que é viável a utilização da metodologia sugerida (SFM/4000S). Contudo, a mesma apresenta-se limitada, uma vez que não permite uma avaliação das células antes de todo o processo ter ocorrido; ou seja; não conseguimos observar/monitorar o estímulo basal/comportamental das células e, conseqüentemente sua autofluorescência, antes do estímulo glutamatérgico ser empregado, impossibilitando, deste modo o cálculo de R/R0 necessário para conhecer a significância dos efeitos nos níveis basais de fluorescência.

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A sinalização celular tem por intuito controlar e coordenar as mais diversas atividades e funções celulares, usando para isso moléculas sinalizadoras. Dentre a vasta gama de sinalizadores existentes no corpo humano, o cálcio merece especial atenção dado o seu envolvimento na maior parte dos processos celulares.

A realização do presente estudo permitiu constatar o envolvimento do neurotransmissor glutamato no processo de dissipação da informação em astrócitos. Tal substância atua em receptores específicos presentes na membrana de tais células gerando uma despolarização da mesma, abertura de canais iônicos, captação de cálcio e consequente transmissão da informação. Pôde-se observar através das experimentações que se trata de um processo extremamente rápido, tendo início ainda nos primeiros milésimos de segundo após a estimulação. Independente da concentração de cálcio utilizada, sempre houve tal íon sendo captado pelas células; sendo a concentração de 5M, sem dúvida, a mais significativa. O protocolo experimental elaborado mostrou-se eficiente para o pretendido, contudo, algumas adequações, como sugeridas neste trabalho, são pertinentes. No que tange a viabilidade do uso do equipamento SFM-4000/S, pode-se concluir que este se mostrou eficaz para este tipo de aquisição de dados, dado sua precisão e agilidade nas mensurações. Entretanto, é pertinente ressaltar que o seu uso em conjunto com o de outras metodologias pode engrandecer ainda mais os resultados encontrados.

Por fim, a expectativa em relação aos possíveis resultados é de que os mesmos permitam uma reflexão, a agregação de novos conhecimentos e, indiretamente, sirvam de estímulo para que outros estudos na área sejam realizados.

REFERÊNCIAS

ALVARENGA, G. **Homem, animal de duas cabeças**. 1º edição, Editora Sografe, 2007.

ANDRADE, V.A; LEITE, M.F. Sinalização de cálcio em células epiteliais. In: RESENDE, R.R; GUATIMOSIM,S; LEITE, M.F. (Org). **Sinalização de cálcio – Bioquímica e Fisiologia Celulares**. 1 ed. São Paulo: Sarvier, 2012. Cap. 12, p. 285-299.

ANDRÉ, E. **Evidências sobre o envolvimento dos receptores vanilóides nas ações biológicas produzidas pelos sesquiterpenos poligodial e drimanial**. 2004. 85 f. Tese (Trabalho apresentado para obtenção do grau de doutor em farmacologia). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

ANTUNES, D. G. **Efeito do glutamato sobre a secreção da proteína S100B em cultura de astócitos hipocâmpais**. 2002. 58 f. Dissertação (Trabalho apresentado para obtenção do grau de mestre em Bioquímica). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

ARAQUE, A; NAVARRETE, M. *Glial cells in neuronal network function*. **Rev. Philosophical Transactions of the Royal Society B**. vol. 365, p. 2375-2381, 2010.

AGUIAR, C.J; ARANTES, L.A.M; LEITE, M.F. Receptores de Inositol 1,4,5-Trifosfato. In: RESENDE, R.R; GUATIMOSIM,S; LEITE, M.F. (Org). **Sinalização de cálcio – Bioquímica e Fisiologia Celulares**. 1 ed. São Paulo: Sarvier, 2012. Cap. 4, p. 55-73.

ARANTES, C.P. **Avaliação da expressão de PrPc na interação neurônio-glia, em astrócitos e os mecanismos de secreção de STII**. 2009. 192 f. Dissertação (Trabalho apresentado para obtenção do título de doutor em Ciências (Bioquímica)). Universidade de São Paulo, São Paulo.

BARANSKA, J. **Glioma Signaling**, vol. 956, Editora Springer, 2013.

BARBOSA, W.M. **Efeito da ingestão de café sobre a liberação de glutamato sinaptossomal, estimulada por toxina escorpionica, em ratos.** 2007. 60 f. Dissertação (Trabalho apresentado para obtenção do grau de mestre em Ciência de Alimentos). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

BATISTA, D.R. **Estudo dos receptores pirunérgicos em células gliais do gânglio da raiz dorsal.** 2008. 70 f. Dissertação (Trabalho apresentado para obtenção do grau de mestre em fisiologia). Universidade de São Paulo, São Paulo.

BIOLOGIC SCIENCE INSTRUMENTS. **MOS-200 and MOS-200/M User's manual** – Version 1.6, 2012.

BOHLER, S. et al. **Um cérebro para a vida inteira**, 1º edição, Editora Reader'sDigestBras, 2010.

BURNSTOCK, G. *Purine and pyrimidine receptors.* **Cellular and Molecular Life Sciences**, vol. 64, nº 12, p. 1471-1483, 2007.

CARDOSO, A.V; COSTA, C; MATOS, L. **Livro da célula.** Disponível em: <http://www.livrodacelula.org/index.php?acao=projeto> Acesso em: 28/01/2013

CAROBREZ, A.P. *Transmissão pelo glutamato como alvo molecular na ansiedade.* **Rev. Brasileira de Psiquiatria**, vol 25 (Supl II), 52-58, 2003.

CARVALHO F.H; PIMENTEL S. M. R. **A célula**, 2ª edição, Editora Manole, 2007.

CASTRO-JUNIOR, C. et al. Sinalização de cálcio em células neurais. In: RESENDE, R.R; GUATIMOSIM, S; LEITE, M.F. (Org). **Sinalização de cálcio – Bioquímica e Fisiologia Celulares.** 1 ed. São Paulo: Sarvier, 2012. Cap. 13, p. 301-323.

CASTRO, V. **Psicobiologia do medo e da ansiedade.** Disponível em: <http://fotolog.terra.com.br/neuroscience:31> Acesso em: 10/01/2013

CHRISTANTE, L. *Os novos Astros do cérebro.* **Rev. UnespCiência**, Ano 1, nº 5, p. 18-23, fev. 2010.

CHUDLER, E.H. **Types of neurons**. Disponível em: <http://faculty.washington.edu/chudler/cells.html> Acesso em: 10/01/2013

DANI, j.w; CHERNJAVSKY, A; SMITH, S. *Neuronal Activity Triggers Calcium Waves in Hippocampal Astrocyte Network*. **Rev. Neuron**, vol 8, p. 429-440, 1992.

ENCICLOPÉDIA CONHECER. **Enciclopédia Ilustrada Conhecer**. Editora Nova Cultural, 2000

FARIAS, J.A.Q.A. et al. Indicadores de cálcio. In: RESENDE, R.R; GUATIMOSIM,S; LEITE, M.F. (Org). **Sinalização de cálcio – Bioquímica e Fisiologia Celulares**. 1 ed. São Paulo: Sarvier, 2012. Cap. 02, p. 26-41.

FERNANDES, L.C. **Receptores e sinalização celular**. Disponível em: <http://www.ebah.com.br/content/ABAAABUlcAC/receptores-sinalizacao-celular-i-parte-2-2> Acesso em: 10/01/2013

FIELD, D; STEVENS – GRAHAM, B. *New Insights into Neuron-Glia Communication*. **J. Neuroscience**, vol. 298, p. 556-562, 2002.

FIELDS, D. *A outra metade do cérebro*. **Scientific American Brasil**, nº24, 2004, p. 46-53.

FILHO, A.M.C. **Avaliação da ação dos quelantes EDTAC, CDTA e EGTA sobre a microdureza da dentina radicular**. 1998. 98 f. Tese (Trabalho apresentado para obtenção do grau de doutor em odontologia). Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

FONTES, L. **Água ultrapura Milli-q: parâmetros de qualidade e principais aplicações**. Disponível em: <http://bancadapronta.wordpress.com/2012/11/08/agua-ultrapura-milli-q-parametros-de-qualidade-e-principais-aplicacoes/> Acesso em: 27/01/2014

FONTES, R. **Enzimas e cinética enzimica**. 2005

FRANCO, G. **Tabela de composição química dos alimentos**. 9ª edição, Editora Atheneu, 2006.

FREITAS, A.P. **Cafeína modula o transporte de aminoácidos excitatórios em retinas de ratos**. 2010. 101 f. Dissertação (Trabalho apresentado para obtenção do grau de mestre em Neurociências). Universidade Federal Fluminense, Niterói.

FURLAN, M. **Comunicação celular**. Disponível em: www.dfs.uem.br
Acesso em: 17/01/2013.

GIL, A.C. **Como classificar as pesquisas**. Disponível em: www.ngd.ufsc.br/files/2012/04/ric_CLASSIFICAPESQUISAGIL.doc
Acesso em: 27/01/2013

GOLDBERG,M; PITTA, M; VOLMAN, V; BERRY, H; BEN-JACOB,E. *Nonlinear Gap Junctions Enable Long-Distance Propagation of Pulsating Calcium Waves in Astrocyte Networks* **Rev. PLOS Computational Biology**, vol 6, 2010.

GRYNKIEWICZ, G; POENIE, M; TSIEN, R.Y. *A new generation of Ca^{2+} Indicators with Greatly Improved Fluorescence Properties*. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 260, nº6, p. 3440-3450, 1985.

GUTHRIE, P.B et al. *ATP released from astrocytes mediates glial calcium waves*. **The Journal of Neuroscience**, vol. 19, nº 2; p.520–528, 1999.

GUYTON, A.C; HALL, J.E. **Tratado de fisiologia médica**, 11º edição. Editora Elsevier, 2006.

HENEINE, I.F. **Biofísica Básica**. 2ª edição, Editora Atheneu, 2003.

KARL, J.D. **Estudo da fosforilação e estrutura de filamentos intermediários em astrócitos permeabilizados com digitonina**. 2000. 102 f. Dissertação (Trabalho apresentado para obtenção do grau de mestre em Bioquímica). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

KATZ, B; MILEDI, R. *The effect of calcium on acetylcholine release from motor nerve*. **Proceedings of The Royal Society Biological Science**, vol. 161, nº 985, p. 496-503, 1965.

KRUGER, A.H. **Utilização de nutrientes energéticos por córtex cerebral de ratos: efeitos de diferentes concentrações de potássio.** 2003. 81 f. Dissertação (Trabalho apresentado para obtenção do grau de mestre em Ciências Biológicas - Bioquímica). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

KUPLICH, M.D. **Síntese de novos heterocíclis benzazólicos fluorescentes e a sua incorporação em matrizes de celuloses.** 2007. 103 f. Dissertação (Trabalho apresentado para obtenção do título de mestre em Química). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

LAMBERT, D.G. **Signaling protocols.** Editora Humana Press, 1999.

LENZ, G. **Efeito da lesão com ácido cáinico sobre a fosforilação e o imunoconteúdo da proteína glial fibrilar ácida em hipocampo de ratos.** 1996. 74 f. Dissertação (Trabalho apresentado para obtenção do título de mestre em Bioquímica). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

LEOPARDI, M. T. **Processo de trabalho em saúde: organização e subjetividade.** In: LEOPARDI, M. T. Instrumentos de trabalho na saúde: razão e subjetividade. Florianópolis: Programa de Pós-Graduação em Enfermagem/UFSC; Org. Ed. Papa-Livros, 1999, 176p.

LINDE GROUP. **Curva de calibração.** Disponível em: http://hiq.linde-gas.com.br/international/web/ig/br/like35lgspgbr.nsf/docbyalias/glossary_curva Acesso em: 27/01/2014

LOIOLA, E.C. **Liberação de ATP de células gliais de retina de pinto em cultura.** 2010. 81 f. Dissertação (Trabalho apresentado para obtenção do grau de mestre em Neurociências). Universidade Federal Fluminense, Niterói.

LOPES, A.C.P; ROSA, L.C; BELEBONIS. R.R; PEREIRA, R.N.R; VASCONCELOS, C.A.C; MOREIRA, J.E. Aspectos moleculares da transmissão sináptica. **Rev. da Faculdade de Medicina do Ribeirão Preto e do Hospital das clínicas da FMRP**, vol.32, p. 167-188, 1999.

LOTURCO, J.J. *Neural circuitd in the 21st century – synaptic networks of neurons and glia*. **Rev. PNAS**, vol. 97, nº 15, p. 8196-8197, 2000.

LUIZ, F.C.L. **Estudos de fluorescência estacionária e resolvida no tempo de anestésicos locais e de antibióticos da classe das fluorquinolonas**. 2009. 154 f. Tese (Trabalho apresentado para obtenção do grau de doutor em física). Pontifícia Universidade católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

MARZANO, R. J. **Designing a new taxonomy of educational objectives**. Thousand Oaks, Califórnia: Corwin Press, 2000.

MARTINI, L.H. **Efeito dos sesquiterpenos poligodal e drimonial sobre parâmetros glutamatérgicos em sistema nervoso central de ratos e camundongos**. 2006. 86 f. Tese (Trabalho apresentado para obtenção do grau de doutor em Bioquímica). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

MENDES, M.F.A. **Espectrofotometria**. Disponível em: http://www.ufrgs.br/leo/site_espec/bibliografia.html Acesso em: 05/01/2014

MERLO, S; BRUSCO, J; PADOVAN-NETO, F.E; ROHNER,C.J.S; IKEDAS, E.T; ROSS, J.B; JUNIOR BUENO, L.D; RUGGIERO, R.N; FACHIM, H.A; MOREIRA, J.E. *O ciclo da vesícula sináptica, espinhos dendríticos e a transdução de sinal*. **Rev. da Faculdade de Medicina do Ribeirão Preto e do Hospital das clinicas da FMRP**, vol. 44, nº2, p.157-171, 2011.

MOURA, P.R; VIDAL, F.A.P. *Transdução de sinais: uma revisão sobre a proteína G*. **Rev. Scientia Medica**, vol. 21, nº1, p. 31-36, 2011.

NARDIN, P. **Avaliação de parâmetros bioquímicos e morfológicos de células gliais expostas a um meio com alto conteúdo de glicose**. 2006. 75 f. Dissertação (Trabalho apresentado para obtenção do título de mestre em Bioquímica). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

NIMMERJAHN,A. *Astrocytes going live: advances and challenges*. **Rev. The Journal of Physiology**, vol.587, p. 1639-1647, 2009.

OLIVEIRA, D.L.C. **Ciclo de vesículas sinápticas com conteúdo reduzido em junção neuromuscular.** 2007. 76 f. Dissertação (Trabalho apresentado para obtenção do grau de mestre em Biologia Celular). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

OLIVEIRA, L.F. *Transmissão sináptica.* **Rev. Brasileira de Anestesiologia**, vol. 44, nº 1, p. 25-33, 1994.

OPPELT, D.M. **Papel das reservas intracelulares de cálcio no efeito de aminoácidos excitatórios sobre a fosforilação da proteína ácida fibrilar glial (GFAP) em hipocampo de ratos jovens.** 2002. 87 f. Dissertação (Trabalho apresentado para obtenção do título de mestre em Bioquímica). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

PAULA, A.M.; CESAR, C.L. Fotônica Aplicada à Biologia Celular. In: RESENDE, R.R.; GUATIMOSIM,S; LEITE, M.F. (Org). **Sinalização de cálcio – Bioquímica e Fisiologia Celulares.** 1 ed. São Paulo: Sarvier, 2012. Cap. 01, p. 03-25.

PEREIRA-JUNIOR; A. *Ciência do cérebro e a consciência humana: uma perspectiva astrocêntrica.* **Rev. Simbio-logias**, vol. 3; nº 04; junho de 2010.

PIMENTEL, S. **Canais e transportadores de cálcio.** Disponível em: http://fisiologia.med.up.pt/Textos_Apoio/Membranas/calcio.pdf Acesso em: 11/01/2013

PLISZKA, S.R. **Neurotransmissores.** Disponível em: <http://www.psiquiatriageral.com.br/cerebro/neurotransmissores.htm> Acesso em: 13/01/2013

SAMPAIO, M.I. **Biologia geral.** Disponível em: <http://pt.scribd.com/doc/3213165/Licenciatura-em-Biologia-Biologia-Geral> Acesso em: 20/01/2013

SANOFI AVENTIS. **Tudo sobre eIA –** Disponível em: http://www.tudosobreela.com.br/oqueeela/sistemanervoso_04.shtml Acesso em: 13/02/2012

SATHLER, M. F. **Efeito agudo de cocaína no transporte de aminoácidos excitatórios em córtex de camundongos.** 2012. 107 f.

Dissertação (Trabalho apresentado para obtenção do título de mestre em neurociências). Universidade Federal Fluminense, Niterói.

SCHEUCHER, P.S; SANTOS, G.A.S. Citometria de fluxo. In: SOARES, J.L.M.F; ROSA, D.D; LEITE, V.R.S; PASQUALOTTO, A.C. **Métodos Diagnósticos: Consulta rápida**. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2012, p. 176-181.

SMELTZER S. C.; BARE, B. G. **Tratado de enfermagem médico – cirúrgica**, 10ª edição, Editora Guanabara Koogan, 2005.

SNEYD, J; KEIZER, J; SANDERSON, M.J. *Mechanisms of calcium oscillations and waves: a quantitative analysis*. **The FASEB Journal**, vol. 9 p. 1463-1472; nov. de 1995.

SIGMA-ALDRICH. **Sigma Product Information**. Disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com/brazil.html> Acesso em: 31/02/2013

SIMPSON, A.W.M. Fluorescent Measurement of $[Ca^{2+}]_c$. In: LAMBERT, D.G. **Calcium Signaling Protocols**. Vol. 114. Ed. Human Press. 1999. Cap. 01, p. 03-25.

SOCIETY FOR NEUROSCIENCE. **Brain Facts – A primer on the brain and nervous system**, 6ª edição. Disponível em: http://www.sfn.org/skins/main/pdf/brainfacts/2008/brain_facts.pdf
Acesso em:
25/01/2013

SOUSA, S.I.O; **Excitotoxicidade em Células Granulares do Cerebelo que Expressam Ataxina-3 Mutante – Relevância para a Patogênese da Doença de Machado-Joseph**. 2011. 67 f. Dissertação (Trabalho apresentado para obtenção do título de mestre em Física). Universidade de Coimbra, Portugal.

SOUZA, G. **Ciências (Células)**. Disponível em: <http://guimaraessouza.blogs.sapo.pt/2556.html> Acesso em: 31/01/2013

SOUZA, I.A. **Expressão heteróloga de neurotoxinas do veneno da aranha *Phoneutria nigriventer***. 2011. 160 f. Tese (Trabalho apresentado para obtenção do título de doutor em ciências biológicas). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

SOUZA, B.R. **A modulação da via cAMP/PKA pelo sensor neuronal de cálcio – 1 independe de receptores de dopamina.** 2007. 151 f. Tese (Trabalho apresentado para obtenção do título de doutor em biologia: farmacologia bioquímica e molecular). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

TAREILUS E.; BREER H. *Presynaptic calcium channels: Pharmacology and regulation.* **Neurochem.** vol. 26, nº 6, p. 539-558, 1995.

THOMAZI, A.P. **Perfil da captação de glutamato em diferentes modelos de isquemia cerebral em ratos: injúria x neuroproteção.** 2009. 138 f. Tese (Trabalho apresentado para obtenção do grau de doutor em Bioquímica). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

TERASHIMA J.Y. et al. Sinalização de Ca²⁺ e Modulação dos Mecanismos de Morte Celular. In: RESENDE, R.R; GUATIMOSIM,S; LEITE, M.F. (Org). **Sinalização de cálcio – Bioquímica e Fisiologia Celulares.** 1 ed. São Paulo: Sarvier, 2012. Cap. 25, p. 561-587.

TSIEN, R.Y. *Fluorescence readouts of biochemistry in live cells and organisms.*In: **Molecular Imaging: Principles and Practice**, ed. Por WEISSLEDES, et al.. People's Medical Publishing House – USA. Capítulo 48, p. 808-828.

ULRICH,H. Prefácio. In: RESENDE, R.R; GUATIMOSIM,S; LEITE, M.F. (Org). **Sinalização de cálcio – Bioquímica e Fisiologia Celulares.** 1 ed. São Paulo: Sarvier, 2012. Prefácio.

VIEIRA, R.M; SOUZA, D.O; KAPCZINSKI, F. *Neuropatologia de células gliais em modelo de integração neurônio-glia no transtorno de humor bipolar.* **Rev. de Psiquiatria Clínica**, vol. 24, nº 4, p. 197-203, 2002.

VILELA, A.L.M. **Sinapses.** Disponível em: <http://www.afh.bio.br/nervoso/nervoso2.asp> Acesso em: 12/01/2013

VINES, A; McBEAN, G.J; FERNANDEZ, A.B. *Continuous Measurement of Intracellular calcium on the BD Accuri™ C6 Flow cytometer.* In: **BD Biosciences**, 2012, p.01-12.

WADE, J.J; MCDAID, L.J; HARKIN, J; CRUNELLI, V; KELSO, J.A. *Bidirectional coupling between astrocytes and neurons mediates learning and dynamic coordination in the brain: a multiple modeling approach*. **PLOS ONE**, vol. 6; n° 12, p.01-24, 2011.

ZABLITH, M.B. **Vias de sinalização desencadeadas pela estimulação do adrenoceptor β em células secretoras da glândula de veneno da serpente *Bothrops jararaca***. 2007. 70 f. Dissertação (Trabalho apresentado para obtenção do título de mestre em Ciências). Universidade de São Paulo, São Paulo.

APÊNDICE

APÊNDICE A. Protocolo experimental

1. Materiais

- Solução contendo cálcio (cloreto de cálcio)
- Água Milli-q
- Células de glioma C-6
- Indicador de cálcio FURA-2/AM
- TRITON X-100
- EGTA
- Seringas de 10 mL
- SFM - 4000/S

2. Procedimento

2.1 Preparação das células

2.1.1 Repique celular

- Retirar as células da estufa;
- Descartar o meio de cultura que as células estavam acondicionadas;
- Acrescentar 1,8 mL de tampão fosfato salino (PBS) - para lavar as células - e 200 μ L de tripsina - para que haja o desprendimento das células do fundo da placa;
- Incubar as células durante três minutos;
- Adicionar 2 mL de meio de cultura e homogeneizar a suspensão celular;
- Centrifugar a suspensão celular a 1200 rpm por quatro minutos;
- Descartar o sobrenadante;
- Ressuspender o pellet celular em 1 mL de meio de cultura;
- Proceder a contagem das células (10 μ L de célula + 190 μ L de azul de tripan);
- Transferir as células em placa contendo 8 mL de meio de cultura;
- Proceder ao repique celular - 200 μ L de células em 7 mL de meio de cultura por garrafa.

2.1.2 Adição do indicador de cálcio às células

- Preparar uma suspensão das células (em PBS);
- Preparar 1mM de solução-estoque com FURA-2/AM em DMSO (0,1%);
- Diluir uma alíquota (0,03 mL) do indicador 300 vezes em PBS;
- Adicionar tal solução aquosa para um volume igual de células;
- Incubar durante 30 minutos à 37°C;
- Lavar as células duas vezes com PBS;
- Acondicionar as células em seringas.

OBS: A composição do tampão fosfato-salino não pode conter cálcio.

2.2 Preparação da solução de cálcio

- Adicionar 250 mL de água Milli-q em recipiente apropriado;
- Diluir 194,44 g de cloreto de cálcio na água destilada para conseguir uma solução estoque de concentração 7M;
- Filtrar a solução com filtro 0,2 µm para retirar resíduos e contaminantes;
- Acondicione 10 mL de tal solução em uma seringa.

Quando utilizar concentrações menores do que 7M, proceder a rediluição no próprio equipamento SFM-4000/S.

2.3 SFM – 4000/S

- Ajustar o equipamento de modo que consiga a seguinte configuração: modo avançado; cubeta FC – 15/7,5; misturador Berger Ball; vazão total 18 mL/s; comprimento de onda de excitação 340 nm e 380 nm; comprimento de onda de detecção: 515 nm.
- Colocar no espaço destinado a primeira seringa a água Milli-q; no espaço dois a solução de cálcio na concentração 7M; no espaço três células contendo indicador de cálcio, e no quarto espaço TRITON X-100 (0,1%).
- Inicializar as seringas manualmente ou através do software “BioKine.

- Na janela “Sequência de mistura” (mixing sequence), editar a seqüência a ser utilizada (conforme, por exemplo, mostra a figura abaixo) e configurar a cubeta (FC-15/7,5)

Figura 1. Sequência de mistura hipotética para experimento-teste.

Fonte: Dados primários (2014).

- Na janela “Configuração de aquisição (*acquisition setup*)” selecionar o modo de fluorescência e confirmar a configuração escolhida
- Iniciar a aquisição dos dados.

OBS: A cada aquisição de dados, modificar a proporção de água Milli-q usada (S1) para modificar a concentração de cálcio. Para que a fluorescência mínima seja mensurada, deve-se pegar uma quantia de células, adicionar TRITON X-100 e em seguida colocar a mesma quantidade de EGTA em concentração 4,5 mM para que seja possível mensurar a fluorescência mínima. Salienta-se que o conteúdo da quarta seringa modifica-se, em relação ao desejado; ou seja, utiliza-se TRITON X-100 para obter fluorescência máxima; EGTA para a mínima, e, Glutamato, quando objetivar obter a captação de cálcio após estímulo glutamatérgico.