



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS**

**ASTRÓCITOS E HORMÔNIO DA TIREÓIDE (T₃):
DESENVOLVIMENTO NEURONAL E NEUROPROTEÇÃO**

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Andréa Gonçalves Trentin

Departamento de Biologia Celular,
Embriologia e Genética – CCB/UFSC

Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Carla Inês Tasca

Departamento de Bioquímica – CCB/UFSC

CLÁUDIA BEATRIZ NEDEL MENDES DE AGUIAR

Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética – CCB/UFSC

Florianópolis, abril de 2008



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS**

**ASTRÓCITOS E HORMÔNIO DA TIREÓIDE (T₃):
DESENVOLVIMENTO NEURONAL E NEUROPROTEÇÃO**

Trabalho apresentado como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Neurociências, Área de Concentração II – Neurobiologia Celular e Molecular

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Andréa Gonçalves Trentin

Departamento de Biologia Celular,
Embriologia e Genética – CCB/UFSC

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Carla Inês Tasca

Departamento de Bioquímica – CCB/UFSC

CLÁUDIA BEATRIZ NEDEL MENDES DE AGUIAR

Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética – CCB/UFSC

Florianópolis, abril de 2008

*Dedico este trabalho aos meus queridos filhos,
Felipe, Beatriz e Isabela,
e ao meu amado esposo, Lúcio.
Vocês são a luz da minha vida e
são tudo o que eu preciso para viver!*

AGRADECIMENTOS

À Andréa, minha orientadora, agradeço por todo apoio, toda paciência e amizade em todos estes anos. Cada dia no laboratório foi muito importante na minha formação e eu agradeço muito a você por toda a confiança depositada em mim.

À Carla, minha co-orientadora, obrigada por todos os ensinamentos e conselhos; por ter aberto as portas do teu laboratório para mim, o que resultou em um trabalho tão bonito e do qual eu me orgulho tanto. Não posso deixar de te agradecer também pela grande amizade e, claro, por ter me dado a honra de ser madrinha do Pedro, meu afilhado (lindo e fofo) que eu adoro!

Ao Márcio, agradeço também pela confiança e amizade, por todas as dúvidas resolvidas e pelas discussões e momentos de descontração sobre música e futebol.

Aos meus queridos alunos, Ricardinho e Zucco, muito obrigada por toda a ajuda que vocês me deram e por acreditarem em mim. Sou muito orgulhosa de vocês e torço muito para que tudo dê certo! Preciso agradecer também à Gabriela, que participou do início deste trabalho e que também ajudou muito. Obrigada, Gabi!

Ao povo do lab, preciso agradecer de coração por todos os momentos, bons ou ruins, que passamos juntos. Em ordem alfabética, pra ninguém ficar com ciúme, Aluísio, Beatriz, Bianca, Bianka, Cássio, Denise, Diego, dos Anjos, Ezequiel, Fernanda, Gustavo, Larissa, Lucas, Maria Cecília, Maristela, Ricardo New, Rossana (obrigada pelas formatações!!!), Sarah, Suelen e a todos que infelizmente já saíram do lab. Cada um de vocês é igualmente muito especial para mim e eu nunca vou esquecer o respeito e carinho que todos sempre demonstraram. Muito obrigada!

Ao Bruno, meu primeiro filho científico, muito obrigada pela consideração e respeito, e também pelas longas discussões sobre os nossos experimentos e sobre as nossas vidas, preferencialmente no Iega. Tudo isto, Bruno, foi muito importante em alguns momentos cruciais da minha vida, e eu serei eternamente grata a você pela tua disponibilidade e total apoio.

À Talitinha, a minha “adotiva”, de quem eu tenho muito orgulho, obrigada por todas as filosofias e por pensar igual a mim em muitas coisas, por me fazer sentir importante com todas as suas perguntas e até por me fazer sentir fome, com a sua pergunta diária “o que eu vou comer hoje?”. Confio muito em ti e tenho certeza que o teu trabalho vai ficar lindo. Você merece!

À Meline, que sempre foi super-decida no seu querer, obrigada pela confiança e carinho. Tomara que você realize todos os seus sonhos e que seja muito feliz.

Aos meus eternos irmãos de laboratório, Giordano, Ricardo, Marco e ao primo de laboratório, Tiago. Obrigada por terem começado comigo esta jornada. Obrigada também por toda a acessoria científica, mas principalmente por sempre terem me feito acreditar na minha capacidade. Não posso deixar de lhes agradecer também, pelas grandiosas festas, sempre regadas a muita cerveja (nessas até o Scooby ganhou beijo), churrasco do Lúcio, muita cantoria e muita risada. Espero que sempre possamos repetir isto.

Ao pessoal do laboratório de Neuroquímica, que me recebeu tão bem e sempre me ajudou muito, muito obrigada. Tharine, obrigada pela acessoria nas eletroforeses cheias de emoção.

À Helena, que também já seguiu o seu caminho, mas que teve participação direta neste trabalho, obrigada por tudo o que eu aprendi com você e claro, por toda a amizade!

À minha querida e grande amiga Karina, a quem eu abandonei completamente ultimamente, mas a quem eu tenho grande admiração, muito obrigada por toda força.

Aos meus amigos (e ex-professores!!!!) Afonso, Risoleta, Rodrigo e Nelson, obrigada pelos valiosos ensinamentos em sala de aula e no laboratório e por todos os maravilhosos momentos de descontração.

Não posso deixar de agradecer ao Fábio Mendes e à sua família que me acolheu com tanto carinho nos meus tempos de Rio de Janeiro. Seu João, Marília e Dani, vocês são a minha família carioca. Nunca esquecerei tudo o que vocês fizeram por mim e sou eternamente grata por isto. Que Deus abençoe vocês!

À toda a minha família, todos os tios e primos, que sempre estiveram do meu lado e sempre se orgulharam de mim, muito obrigada por formarem a família mais linda do mundo.

Nestes últimos anos perdi pessoas muito importantes e não posso deixar de fazer uma homenagem a eles. Meu tio e compadre, Lucídio, meu avô e padrinho Azizo, meu querido sogro Béda, meu grande amigo Ângelo, que se foi tão precocemente. Ao meu pai, Luiz e à minha vó Ester, que já se foram há mais tempo, mas que seriam os mais orgulhosos de mim. Obrigada por vocês terem existido e por terem feito parte da minha história. Guardo vocês com muito carinho no meu coração.

Não posso deixar de agradecer à minha sogra, Dona Lúcia, por ter compreendido tão bem o quanto era importante para eu ir à luta, estudar, e conquistar um lugar. Obrigada por todo apoio e por toda a ajuda que a senhora nos deu.

À minha mãe, Aidée, mulher forte, que me ensinou também a ser forte e a não baixar a cabeça, obrigada por todo o apoio, todo o amor e por ter me ajudado tanto a vencer todos os obstáculos.

Ao meu irmão, Daniel, que sempre me apoiou e sempre acreditou que tudo ia dar certo, obrigada! Você continua sendo meu exemplo de cientista. Sempre adorei ouvir você falar filosoficamente de “super-cordas” e das coisas simples da vida, e, de que o tempo não existe (?). E mesmo eu não entendendo muita coisa, você me influenciou com toda a sua força e humildade, coragem e inteligência. À minha cunhada, Dáfni, obrigada por seu apoio e carinho e também por me ensinar a reconhecer meus erros de forma tão sutil. Obrigada por tudo!

Aos meus filhos, Felipe, Beatriz e Isabela, que são tudo na minha vida, muito obrigada. Vocês enchem a minha vida de amor e carinho todos os dias. Determinação, alegria, caráter, sabedoria... faltaria espaço para descrever tudo o que vocês representam para mim. Mas, a característica mais marcante é que vocês são as pessoas mais bondosas que eu conheço. Agradeço de todo o meu coração, toda a paciência que vocês tiveram comigo, todos os conselhos que vocês me deram, toda a compreensão pela minha ausência, todos os beijinhos e abraços. Nada neste mundo me dá tanto orgulho quanto vocês!!!!

Ao Lúcio, meu querido marido, que é o alicerce da minha vida, muito obrigada. Você foi o principal responsável por eu ter terminado este trabalho. Você esteve do meu lado incondicionalmente; você assumiu responsabilidades que eram minhas; você chorou comigo a cada derrota e comemorou comigo a cada vitória. E muitas vezes você deixou de viver seus sonhos para viver os meus. Só mesmo um grande amor para suportar tantas ausências e mesmo assim permanecer ao meu lado. Eu gostaria de poder agradecer o quanto você merece, mas a única forma de agradecer, é também te dando muito amor. Eu amo você, Lúcio. Você é o meu amor e eu não consigo nem pensar em como seria a minha vida longe de você! Obrigada.

Agradeço a Deus por ter me feito assim, por ter me colocado no meio de pessoas tão maravilhosas, pela vida e pelos meus experimentos terem dado certo.

*Imagine there's no heaven
It's easy if you try
No hell below us
Above us only sky*

*Imagine all the people
Living for today*

*Imagine there's no countries
It isn't hard to do
Nothing to kill or die for
And no religion too*

*Imagine all the people
Living life in peace*

*You may say,
I'm a dreamer
But I'm not the only one
I hope some day
You'll join us
And the world will be as one*

*Imagine no possessions
I wonder if you can
No need for greed or hunger
A brotherhood of man*

*Imagine all the people
Sharing all the world*

*You may say,
I'm a dreamer
But I'm not the only one
I hope some day
You'll join us
And the world will be as one*

(“Imagine”, John Lennon, 1971)

RESUMO

O hormônio da tireóide (T_3) exerce uma importante influência no desenvolvimento e maturação do SNC de mamíferos. Os efeitos do T_3 no desenvolvimento neuronal são mediados pelos astrócitos, que secretam fatores solúveis e outras moléculas, como proteínas de MEC, modulando o crescimento de neuritos, proliferação e migração neuronal. Os astrócitos também participam ativamente do metabolismo neuronal. Por exemplo, os transportadores de glutamato astrocitários, GLAST e GLT-1, têm papel essencial na retirada de glutamato do espaço extracelular e na manutenção deste neurotransmissor em níveis fisiológicos no cérebro. No presente estudo, demonstramos que o T_3 aumentou significativamente a captação de glutamato por astrócitos cerebelares, quando comparados às culturas sem o tratamento. A adição de L-PDC e DL-TBOA, inibidores da captação de glutamato, aboliu a captação de glutamato tanto nos astrócitos tratados com T_3 como nos controles. Além disto, os níveis de RNA mensageiro e de proteína para GLAST e GLT-1 em astrócitos foram aumentados após o tratamento com T_3 , embora não tenhamos observado diferenças significativas na distribuição destes transportadores. O efeito gliotóxico do glutamato nas culturas de astrócitos cerebelares foi abolido pelo tratamento com T_3 . Além disto, neurônios cerebelares cultivados sobre monocamadas de astrócitos tratados com T_3 permaneceram viáveis em uma maior proporção após a adição de glutamato do que os cultivados sobre monocamadas astrocitárias controle, demonstrando um efeito neuroprotetor do T_3 .

A expressão de sindecanas (1-4) em culturas de astrócitos de cerebelo, córtex cerebral e hipocampo de ratos neonatos foi analisada por RT-PCR. Nossos resultados demonstraram que as sindecanas 1-4 são expressas em astrócitos de cerebelo e córtex cerebral, enquanto que astrócitos de hipocampo expressam apenas as sindecanas 2 e 4. A análise por RT-PCR semi-quantitativa demonstrou que a expressão das sindecanas 1, 2 e 4 foi reduzida e a expressão da sindecana 3 foi aumentada em cerebelos de ratos hipotireoideos, comparados aos tecidos normais. Observamos também redução na expressão das sindecanas 2 e 3 em astrócitos cerebelares tratados com T_3 , quando comparados às culturas não tratadas. Este balanço de PGs pode estar envolvido na ação do T_3 , mediada pela sinalização por FGF₂.

Demonstramos também, neste trabalho, que astrócitos hipotireoideos apresentam alterações na expressão e organização de fibronectina e laminina. Monocamadas de astrócitos hipotireoideos corresponderam a um microambiente pobre para o desenvolvimento neuronal do que astrócitos normais. O tratamento de astrócitos hipotireoideos com T_3 , recuperou o microambiente hipotireoideo, aumentando a área de cobertura por fibronectina e laminina. Em co-culturas de neurônios hipotireoideos sobre astrócitos hipotireoideos tratados com T_3 foi observado maior número de neurônios e estes apresentando maior neuritogênese do que quando cultivados sobre astrócitos hipotireoideos não tratados. O meio condicionado de astrócitos hipotireoideos tratados com T_3 também promoveu sobrevivência e neuritogênese em neurônios hipotireoideos. Nossos resultados demonstram que os efeitos do T_3 na morfogênese astrocitária podem modular o desenvolvimento neuronal por diferentes mecanismos, como regulação dos níveis extracelulares de glutamato, e modulando contatos diretos célula-célula e célula-MEC.

ABSTRACT

Thyroid hormone (T_3) has a significant influence on the development and maturation of the mammalian SNC. T_3 modulates neuronal development in an astrocyte-mediated manner, secreting soluble factors and other molecules, as ECM proteins, and regulating neurite outgrowth, neuron proliferation and migration. Astrocytes also participate actively in the neuronal metabolism. For example, astrocytic glutamate transporters, GLAST and GLT-1, play an essential role in the clearance of the neuronal-released glutamate from the extracellular space and are essential for maintaining physiological extracellular glutamate levels in the brain. In the present study, we showed that T_3 significantly increased glutamate uptake by cerebellar astrocytes when compared to control cultures. Inhibitors of glutamate uptake, such as L-PDC and DL-TBOA, abolished glutamate uptake on control or T_3 -treated astrocytes. T_3 -treatment of astrocytes increased both mRNA levels and protein expression of GLAST and GLT-1, although no significant changes on the distribution of these transporters were observed. The gliotoxic effect of glutamate on cultured cerebellar astrocytes was abolished by T_3 -treatment of astrocytes. In addition, the neuronal viability against glutamate challenge was enhanced on T_3 -treated astrocytes, showing a putative neuroprotective effect of T_3 .

We also analyzed the modulation of syndecans expression by thyroid hormone via RT-PCR in astrocytes cultures from cerebellum, cortex and hippocampus of newborn rats. Our results showed that syndecans (1-4) are expressed in astrocytes of cerebellum and cortex, whereas in hippocampus only syndecans 2 and 4 were detected. Semi-quantitative RT-PCR analysis revealed reduced expression of syndecans 1, 2 and 4, and increased expression of syndecan 3 in hypothyroid cerebellum, when compared to the euthyroid tissue. Furthermore, we observed a reduced expression of syndecans 2 and 3 in T_3 -treated cerebellar astrocytes, when compared to non-treated culture. This balance of PGs may be involved in T_3 action mediated by FGF₂ signaling.

Moreover, we demonstrated that hypothyroid astrocytes showed an altered expression and organization of fibronectin and laminin. As expected, astrocytes hypothyroid represented a poor microenvironment to neuronal development than the normal ones. The T_3 -treatment recovered the microenvironment hypothyroid, increasing the covered area by fibronectin and laminin. In addition, hypothyroid neurons cultivated on T_3 -treated hypothyroid astrocytes had an increase in the number of cells and presented longer neurites than the cells cultured on astrocytes monolayers without T_3 . The conditioned medium of T_3 -treated hypothyroid astrocytes also promoted survival and neuritogenesis in hypothyroid neurons. Taken together our results demonstrate that the T_3 effects on astrocytic morphogenesis may influence neuronal development by different mechanisms as regulating the glutamate extracellular levels and secreting ECM proteins modulating direct cell to cell or cell to ECM contacts.

LISTA DE ABREVIATURAS

BSA: albumina sérica bovina

cDNA: ácido desoxi-ribonucleico complementar

CS: sulfato de condroitina

DL-TBOA: DL-treo- β - benzoil oxi-aspartato

DMEM: meio de Eagle modificado por Dulbecco

DMSO: dimetilsulfóxido

DNA: ácido desoxi-ribonucleico

dNTP: deoxi-nucleotídeos

DS: sulfato de dermatana

DTT: ditionitrotol

EAATs: transportador de aminoácidos excitatórios

ECL: quimioluminescência

EDTA: ácido etileno-dinitrilo-tetra-acético

FGF₂: fator básico de crescimento de fibroblastos

FITC: isotiocianato de fluoresceína

FN: fibronectina

GAPDH: gliceraldeído fosfato desidrogenase

GAGs: glicosaminoglicanos

GFAP: proteína fibrilar acídica glial

GLAST: transportador de glutamato-aspartato

GLT-1: transportador de glutamato

HBSS: solução salina de Hanks

HEPES : ácido N-2-hidroxi-etil-piperazina-N'-2-etanosulfônico

HS: sulfato de heparana

IgG: Imunoglobulina

KS: sulfato de queratana

LN: laminina

L-PDC: L-trans-2,4-pirrolidina dicarboxilato

MCT: transportador de monocarboxilatos

MEC: matriz extracelular

MMI: metil-mercaptopimidazol-2-tiol

MTT: brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolium

Oatp: proteína transportadora de ácidos orgânicos

P.A.: pureza analítica

PBS: salina tamponada por fosfato

PGs: proteoglicanos

RFGF: receptor do fator básico de crescimento de fibroblastos

RNA: ácido ribonucleico

rT₃: T₃ reverso

RXR: receptor de 9-cis-ácido retinóico

SBF: soro bovino fetal

SDS: duodecil sulfato de sódio

PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida

SNC: sistema nervoso central

SNP: sistema nervoso periférico

T₂: diiodotironina

T₃: triiodo-L-tironina

T₄: tiroxina

TBS: tampão Tris-salina

TBS-T: tampão Tris-salina com Tween

TRE: elemento de resposta ao hormônio da tireóide

TRs: receptor do hormônio da tireóide

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema representativo de algumas funções dos astrócitos.....	16
Figura 2 – Esquema representativo dos tipos de transportadores de glutamato presentes nas sinapses glutamatérgicas.	20
Figura 3 – Esquema representativo de MEC.	23
Figura 4 – Representação esquemática da molécula de fibronectina.	25
Figura 5 – Representação esquemática da molécula de laminina.	27
Figura 6 – Representação esquemática dos diferentes tipos de sindecanas em mamíferos.	30
Figura 7 – Modelo da circulação do T ₃ no cérebro.	33
Figura 8 – Esquema representativo da ação de enzimas desiodases.	34
Figura 9 – Esquema simplificado da ligação do T ₃ ao seu receptor nuclear.	36
Figura 10 – Efeitos do T ₃ na captação de L-[³ H]glutamato dependente de Na ⁺ em astrócitos cerebelares.	55
Figura 11 – Distribuição de GLAST e GLT-1 em astrócitos controle e tratados com T ₃	57
Figura 12 – Efeitos do T ₃ na expressão de RNA mensageiro para transportadores glutamatérgicos.	58
Figura 13 – Análise quantitativa da imunoquantidade de GLAST e GLT-1 por SDS-PAGE.	59
Figura 14 – Efeitos do T ₃ na viabilidade de astrócitos após insulto por glutamato.	60
Figura 15 - Efeitos do T ₃ na mortalidade de astrócitos após insulto por glutamato.	61
Figura 16 – Astrócitos tratados com T ₃ promovem sobrevivência neuronal após insulto excitotóxico induzido por glutamato.	63
Figura 17 – Representação gráfica do número de neurônios nas co-culturas controle ou tratadas com T ₃ , após insulto excitotóxico induzido por glutamato.	64
Figura 18 - Expressão das sindecanas 1-4 em culturas de astrócitos de diferentes regiões cerebrais.	66
Figura 19 – Efeitos do T ₃ na expressão das sindecanas 2 e 3 em astrócitos cerebelares.	67
Figura 20 – Expressão das sindecanas 1-4 em cerebelos de ratos neonatos normais e hipotireoídeos.	68
Figura 21 – Modelo da ação do hormônio da tireóide, mediado pelos astrócitos, na neuroproteção contra um insulto excitotóxico induzido por glutamato.	75

SUMÁRIO

1 - Introdução	15
1.1 – Astrócitos.....	15
1.2 - Astrócitos e transmissão glutamatérgica.....	18
1.3 - Astrócitos e Matriz Extracelular	22
1.3.1 - Fibronectina.....	24
1.3.2 – Laminina.....	26
1.3.3 – Proteoglicanos	28
1.4 - Astrócitos e Hormônio da tireóide	32
2 – Objetivos.....	39
2.1 – Objetivo geral	39
2.2 - Objetivos específicos.....	39
3 – Materiais e Métodos	40
3.1 – Reagentes.....	40
3.2 – Animais.....	41
3.3 - Métodos.....	42
3.3.1 - Culturas primárias	42
3.3.2 – Preparo de SBF depletado de T ₃	42
3.3.3 - Co-culturas astrócitos/neurônios.....	43
3.3.4 - Tratamento com 3, 3',5' Triiodo-L-tironina (T ₃).....	43
3.3.5 - Tratamento com L-glutamato.....	44
3.3.6 - Análise da captação de glutamato	44
3.3.7 - Imunocitoquímica para β -tubulina III.....	45
3.3.8 - Imunofluorescência para GLAST e GLT-1	46
3.3.9 - Imunofluorescência para laminina e fibronectina	47
3.3.10 – Avaliação da viabilidade celular pelo método do MTT	47
3.3.11 – Análise da mortalidade celular por incorporação de SYTOX Green	47
3.3.12 - Imunodeteção de GLAST, GLT-1, fibronectina e laminina.....	48
3.3.13 - Reação em cadeia da polimerase semi-quantitativa por transcriptase reversa (RT-PCR).....	50
3.3.14 – Análise da área de distribuição de fibronectina e laminina.....	51
3.3.15 – Avaliação da influência do microambiente de astrócitos hipotireoideos tratados com T ₃ no desenvolvimento neuronal	52
3.3.16 – Análise dos efeitos do meio condicionado de astrócitos hipotireoideos tratados com T ₃ no desenvolvimento neuronal	52
3.3.17 - Análise estatística.....	53
4.1 - Efeitos do T ₃ sobre o transporte de glutamato e sobrevida neuronal e astrocitária	54
4.1.1 - Avaliação dos efeitos do T ₃ na captação de glutamato por astrócitos cerebelares	54
4.1.2 - Análise da expressão de GLAST e GLT-1 por astrócitos cerebelares após o tratamento com T ₃	56
4.1.3 - Efeitos do T ₃ na proteção a astrócitos cerebelares contra a toxicidade induzida por glutamato	60
4.1.4 - Efeitos do T ₃ na proteção a neurônios contra a toxicidade induzida por glutamato	62
4.2 – Hormônio da tireóide e expressão de Sindecanas	65

4.2.1 - Análise da expressão de sindecanas em astrócitos de diferentes estruturas de cérebro e em cerebelos de ratos neonatos normais e hipotireoideos	65
5 – Discussão	69
5.1 – Efeitos do T ₃ no transporte astrocitário de glutamato e na neuroproteção	69
5.2 - Efeitos do T ₃ na matriz extracelular de astrócitos	76
5.2.1 - Expressão de sindecanas em astrócitos	76
6 - Referências bibliográficas	80
7 - Anexos.....	90

1 - INTRODUÇÃO

1.1 – ASTRÓCITOS

Astrócitos são as células gliais mais numerosas e de maior tamanho no sistema nervoso central (SNC), que se encontram muito próximas aos neurônios, por cerca de 20 nm. Os astrócitos protoplasmáticos possuem amplo citoplasma, podem apresentar prolongamentos curtos e são localizados apenas na substância cinzenta. Os astrócitos fibrosos são caracterizados pela presença de prolongamentos mais longos e estão presentes na substância branca. Muitos dos prolongamentos astrocitários se espessam nas regiões terminais, formando dilatações chamadas de pés vasculares e envolvendo a parede endotelial dos vasos sanguíneos. Os astrócitos também formam uma interface com o plexo coróide, estando em íntimo contato com o líquido cefalorraquidiano. Desta forma, podem regular trocas iônicas entre o plasma, líquido cefalorraquidiano e o tecido nervoso (LAMING *et al.*, 2000). Alguns astrócitos podem apresentar formas especializadas, o que inclui a glia de Bergmann no córtex cerebelar, as células de Muller na retina, pituicitos na neurohipófise e tanicitos no terceiro ventrículo (GARCIA-SEGURA *et al.*, 1996; FIELDS; STEVENS-GRAHAM, 2002). A astroglia também é implicada na fisiologia dos nódulos de Ranvier, devido a seus processos perinodais que estão em contato íntimo com a membrana dos axônios (WAXMAN; BLACK, 1984). As membranas dos processos perinodais apresentam uma alta densidade de canais de sódio, sugerindo uma importante função dos astrócitos na regulação do ambiente nodal e na propagação do potencial de ação (VERNADAKIS, 1996). O metabolismo da glicose é outro exemplo do importante papel dos astrócitos sobre a atividade neuronal. Nos astrócitos, através da glicólise, a glicose é convertida em lactato, que quando liberado no espaço extracelular é utilizado como substrato metabólico pelos neurônios (TSACOPOULOS; MAGESTRETI, 1999). Os astrócitos podem também regular a

concentração extracelular de íons como potássio e cálcio, sendo um mecanismo sinalizador entre as células, através do qual astrócitos podem modular a atividade neuronal (Figura 1) (LAMING *et al.*, 2000).

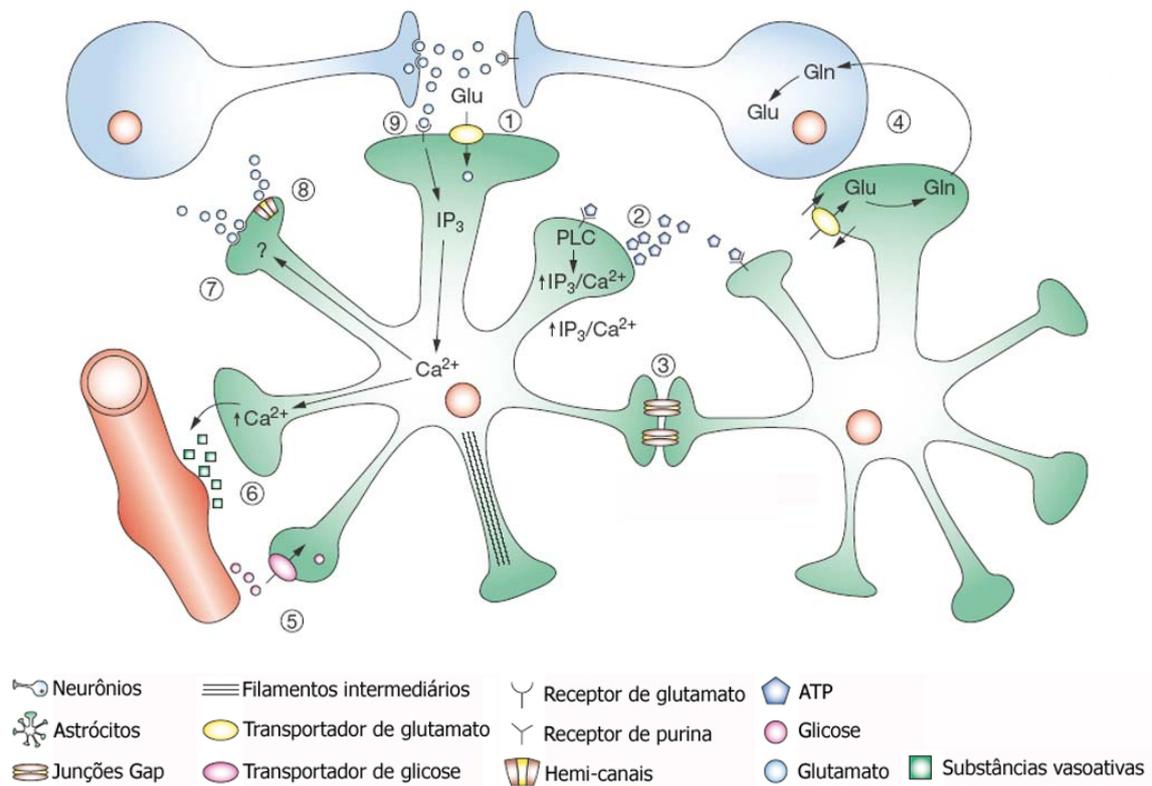


Figura 1 – Esquema representativo de algumas funções dos astrócitos. (1) Modulação da função sináptica; (2) comunicação entre astrócitos, via liberação de ATP e sua ligação em receptores de purinas em astrócitos adjacentes, resultando em ativação de fosfolipase C, inositol trifosfato e mobilização de cálcio; (3) comunicação entre astrócitos, via junções *gap* para troca de pequenas moléculas; (4) realização do ciclo glutamato-glutamina, retirando glutamato da fenda sináptica e liberando glutamina para os neurônios; (5) transporte de glicose a partir da vasculatura; (6) regulação do fluxo sanguíneo mediada pela liberação de substâncias vasoativas; (7) liberação de glutamato pelo aumento de cálcio intracelular; (8) liberação de glutamato pelos hemi-canais pela redução de cálcio intracelular (estudos *in vitro*); (9) ligação do glutamato a receptores metabotrópicos mobiliza o cálcio intracelular levando à liberação de substâncias vasodilatadoras. Abreviaturas: Gln: glutamina; Glu: glutamato; IP₃: inositol trifosfato; PLC: fosfolipase C. Adaptado de Maragakis e Rothstein (2006).

As múltiplas atribuições dos astrócitos no SNC estão relacionadas à outra importante função destas células: a de produção e secreção de diversas moléculas tróficas e sinalizadoras. Os astrócitos sintetizam e liberam diversos fatores de crescimento, como fator de crescimento de nervo (NGF), fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fator neurotrófico ciliar (CNTF); moléculas adesivas como molécula de adesão de célula neural (N-CAM) e N-caderinas; proteínas de matriz extracelular (MEC) como lamininas, fibronectinas e proteoglicanos (revisado em DOW; WANG, 1998). Embora o papel de defesa do SNC seja atribuído principalmente à microglia, os astrócitos podem também realizar esta função, atuando em vias inflamatórias e de regeneração de tecido, secretando mediadores solúveis como ligante 10 de quimiocina cisteína-X-cisteína (CXCL10), ligante 2 de quimiocina cisteína-cisteína (CCL-2), fator ativador de célula B (BAFF) e interleucina-6. Estas quimiocinas têm impacto tanto na atividade imunológica inata como na adaptativa. Além disto, os astrócitos expressam moléculas envolvidas na imunologia inata, como receptores do tipo *toll-like*, proteína cinase dependente da ligação de RNA de dupla-fita e também componentes do sistema complemento (revisado em FARINA *et al.*, 2007).

Recentemente, o papel dos astrócitos como células tronco tem sido bastante discutido. Diversos trabalhos, *in vitro e in vivo*, demonstraram que a glia radial e astrócitos podem gerar uma progênie neuronal e também glial. Estas “células tronco multipotentes astrocitárias” exibem reatividade para proteína fibrilar acídica glial (GFAP), um clássico marcador astrocitário, e expressam uma densa marcação de MEC, outra característica dos astrócitos durante o desenvolvimento do SNC. Além disto, a formação da gliose reativa após injúria do SNC é acompanhada pelo reaparecimento desta densa marcação para MEC, sugerindo uma possível tentativa dos astrócitos de recapitular certos eventos ontogenéticos, como repopulação celular, o que é considerado

uma característica da linhagem de células multipotentes (revisado em STEINDLER; LAYWELL, 2003).

Atualmente é bastante evidente que as funções cerebrais dependem de uma íntima sinalização entre neurônio e células da glia, que se influenciam mutuamente durante a diferenciação celular, desenvolvimento e metabolismo. Desta forma, os astrócitos guiam a migração neuronal e o crescimento axonal além de modularem a diferenciação neuronal. Essas interações neurônio-glia, particularmente neurônio-astrócitos, exercem um importante papel na manutenção da homeostase energética e plasticidade no cérebro, envolvendo receptores para diversos neurotransmissores e participando ativamente do ciclo glutamato-glutamina (LAMING *et al.*, 2000; CARMIGNOTO, 2000; DANBOLT, 2001).

1.2 - ASTRÓCITOS E TRANSMISSÃO GLUTAMATÉRGICA

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório no SNC de mamíferos e é diretamente envolvido em processos que incluem plasticidade, aprendizado e memória e desenvolvimento neural. As respostas fisiológicas do glutamato são dadas por receptores que podem ser do tipo ionotrópicos, que modulam o fluxo de íons através da membrana plasmática, ou do tipo metabotrópicos, que interagem com proteínas-G e assim modulam a atividade das células. No terminal pré-sináptico, o glutamato fica estocado dentro de vesículas e é liberado na fenda sináptica após despolarização da célula, promovida por processos dependentes de cálcio (MELDRUM, 2000). Além do seu papel fisiológico, o glutamato é também envolvido em condições patológicas como epilepsia, isquemia cerebral, esclerose amiotrófica lateral, mal de Alzheimer, doença de Parkinson e esquizofrenia. Além disto, altas concentrações de glutamato na fenda sináptica causam a ativação excessiva de seus receptores, produzindo processos

excitotóxicos que culminam na morte das células neurais. Desta forma, a concentração de glutamato na fenda sináptica deve ser mantida abaixo dos níveis excitotóxicos, regulação realizada por transportadores de aminoácidos excitatórios EAATs (transportadores de aminoácidos excitatórios) (LIPTON; ROSENBERG, 1994; DANBOLT, 2001).

Os astrócitos têm um papel crucial na manutenção dos níveis de glutamato em concentrações fisiológicas no meio extracelular, apesar da captação de glutamato não ser uma função exclusiva destas células. Os transportadores de glutamato astrocitários, GLAST (transportador de glutamato-aspartato) e GLT-1 (transportador de glutamato), são os principais responsáveis pela rápida retirada do glutamato na fenda sináptica, sendo responsáveis por mais de 80% de toda a captação de glutamato no cérebro, evitando os eventos tóxicos para neurônios e conseqüentemente sua morte (GUILLET *et al.*, 2005; MARAGAKIS; ROTHSTEIN, 2006) (Figura 2). Nos astrócitos o glutamato é convertido à glutamina, por ação de uma enzima exclusiva de astrócitos, a glutamina sintase, em um processo dependente de ATP. A glutamina é captada pelos neurônios e então transformada em glutamato, que será novamente liberado na fenda sináptica (NORENBERG; MARTINEZ-HERNANDEZ, 1979; DANBOLT, 2001).

A toxicidade do glutamato em neurônios é bem documentada, entretanto, este neurotransmissor pode também ser tóxico para astrócitos, quando em concentrações muito altas. Astrócitos provenientes de córtex cerebral de rato demonstram inchaço e morte celular após incubação com 1-10 mM de glutamato. Além disto, o tratamento dos astrócitos com glutamato promove o acúmulo da enzima lactato desidrogenase no meio de cultura destas células, acompanhado de redução nos níveis intracelulares de glutathiona, sugerindo que a perda de células nestas culturas ocorre via estresse oxidativo (CHEN *et al.*, 2000).

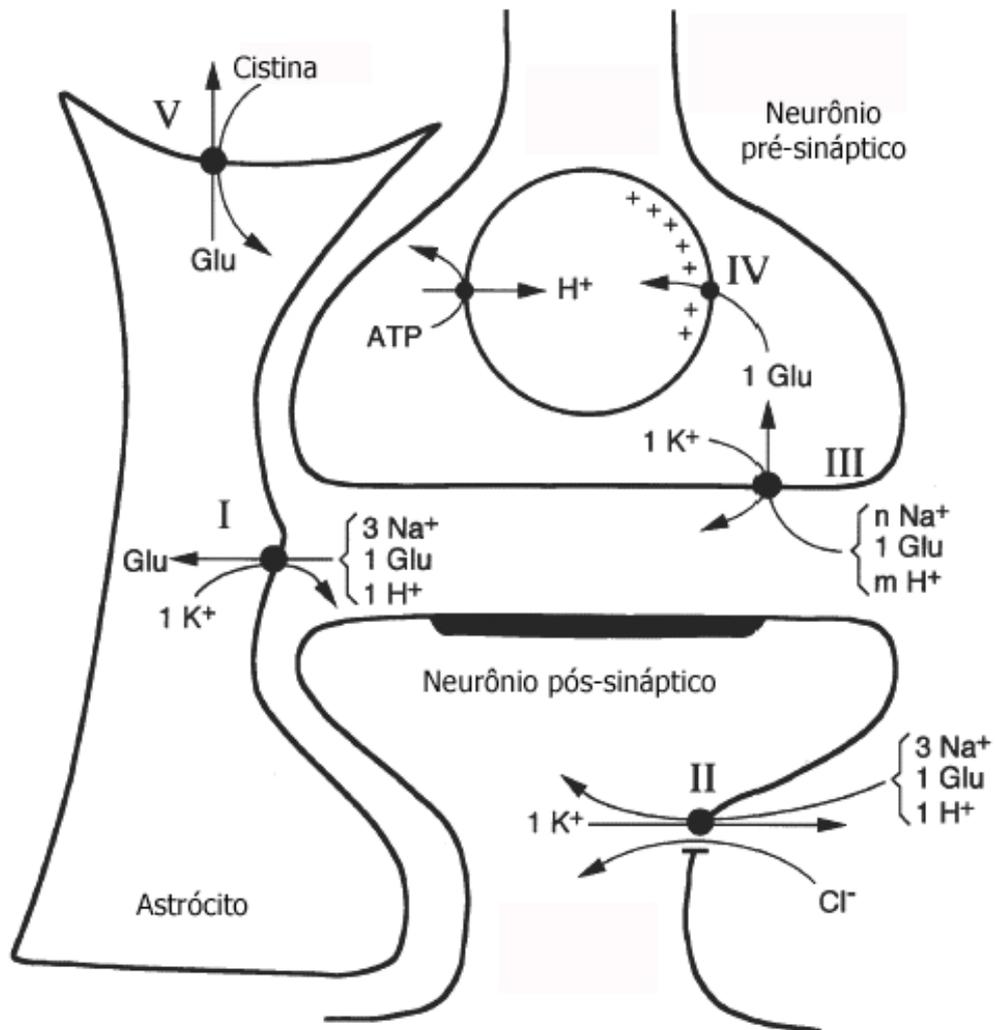


Figura 2 – Esquema representativo dos tipos de transportadores de glutamato presentes nas sinapses glutamatérgicas. (I) Transportadores de glutamato em astrócitos, GLAST e GLT-1; (II) transportadores de glutamato em neurônios pós-sinápticos, (III) nos terminais pré-sinápticos e (IV) nas vesículas sinápticas; (V) influxo de cistina pelo transportador antiporte de glutamato-cistina do tipo xCT. Glu: glutamato. ATP: adenosina trifosfato. Adaptado de Danbolt (2001).

São conhecidas cinco famílias de transportadores de glutamato, três delas são transportadores neuronais (EAAT3 ou EAAC1 (carreador de aminoácidos excitatórios), EAAT4 e EAAT5) e duas delas correspondem a transportadores astrocitários (EAAT1 ou GLAST e EAAT2 ou GLT-1). EAAT3 é principalmente expresso no sistema nervoso periférico (SNP), mas pode estar presente nas regiões CA2 e CA4 do hipocampo, no giro dentado, na camada granular do cerebelo e camadas II-IV do córtex cerebral. EAAT4 e EAAT5 são acoplados a canais de cloreto, sendo o primeiro expresso restritamente nas células de Purkinje e o segundo expresso principalmente na retina (STOFFEL *et al.*, 2004). GLAST e GLT-1 são amplamente distribuídos no cérebro, sendo GLAST o transportador mais abundante no cerebelo, e GLT-1 expresso em outras regiões do cérebro (ANDERSON *et al.*, 2001). A expressão de GLAST e GLT-1 também é diferenciada ao longo do desenvolvimento do SNC. Enquanto GLAST tem sua maior expressão durante os primeiros processos da embriogênese de mamíferos, a expressão de GLT-1 aumenta progressivamente a partir da maturação pós-natal (FURUTA *et al.*, 1997).

O transporte de glutamato é acoplado a processos dependentes de sódio e potássio, sendo capaz de concentrar o glutamato dentro da célula em concentrações 10.000 vezes maiores que a concentração extracelular (MARAGAKIS; ROTHSTEIN, 2006). Os transportadores de glutamato são modulados também pela atividade da bomba de sódio/potássio ATPase. Desta forma, um colapso no gradiente de sódio leva a condições limitantes de energia, o que pode promover ineficiências no transporte de glutamato. Uma das conseqüências do mau funcionamento destes transportadores é o transporte reverso do glutamato, quando ao invés de ser captado, o glutamato é eliminado da célula, aumentando assim a concentração deste aminoácido no meio extracelular a níveis tóxicos para as células (MONTIEL *et al.*, 2005; MARAGAKIS;

ROTHSTEIN, 2006). Além da manutenção de níveis ideais de glutamato nos espaços extracelulares, o transporte normal de glutamato também é essencial para vias metabólicas como produção de energia e síntese de glutathione, um tripeptídeo com importantes funções antioxidantes no SNC (DANBOLT, 2001; RE *et al.*, 2003).

A expressão e função de GLAST e GLT-1 podem ser reguladas por AMP cíclico (SWANSON *et al.*, 1997), bem como por fatores de crescimento. Zelenia e colaboradores (2000) demonstraram que EGF induz a expressão de GLT-1 em astrócitos imaturos. Além disto, Suzuki e colaboradores (2001) demonstraram aumento na captação de glutamato por astrócitos corticais após o tratamento com FGF₂, IGF-1 e EGF, efeito acompanhado por aumento na expressão dos níveis de RNA mensageiro para GLAST nestas células. Além de participarem ativamente do metabolismo neuronal e da modulação da transmissão glutamatérgica, os astrócitos podem modular o desenvolvimento de neurônios por interação com o microambiente, pela MEC.

1.3 - ASTRÓCITOS E MATRIZ EXTRACELULAR

Proteínas de MEC são produzidas e secretadas principalmente pelos astrócitos no SNC, que, além disto, mantém os padrões de organização necessários para a migração e diferenciação neuronal (LIESI *et al.*, 1995). A MEC é composta de um complexo multifuncional de proteínas e proteoglicanos (PGs), altamente organizados para providenciar a integridade estrutural do organismo (Figura 3). Classicamente, a MEC forma uma barreira física entre as células, mantendo a arquitetura dos tecidos. Entretanto, atualmente é bastante documentado o envolvimento das proteínas de MEC no dinâmico reconhecimento entre células, assim como na mobilização de diversos fatores de crescimento por remodelação da MEC, resultando em transdução de sinal, regulando a expressão gênica e modulando processos celulares como diferenciação, proliferação, adesão e migração (PORCIONATTO, 2006).

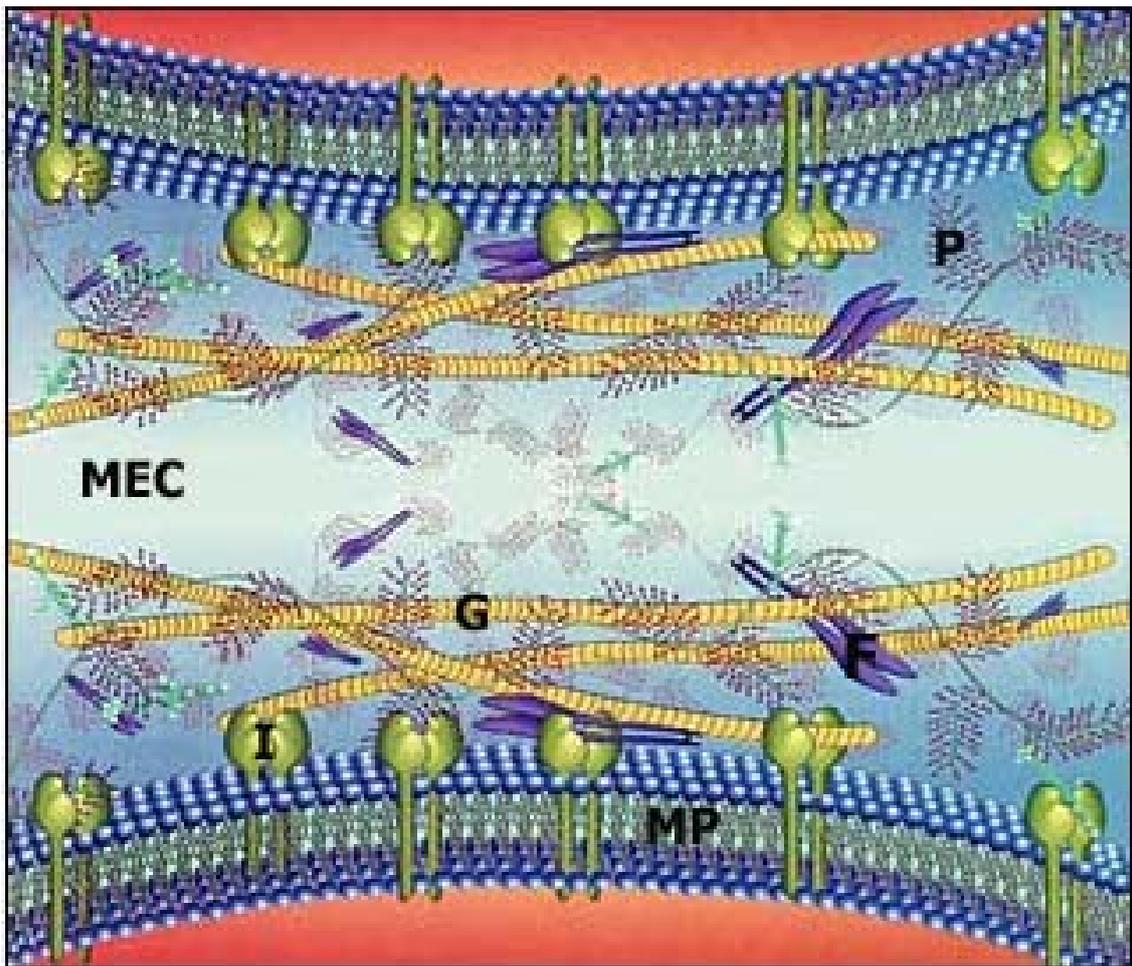


Figura 3 – Esquema representativo de MEC. A figura exemplifica diversos componentes de matriz extracelular (MEC), como glicoproteínas (G), proteoglicanos (P), fatores de crescimento (F) solúveis e associados aos componentes da MEC e as integrinas (I), inseridas na membrana plasmática (MP). Adaptado de Biostructural Medicine (2008).

Os efeitos da MEC nos processos celulares são mediados principalmente por receptores de superfície celular, chamados integrinas. As integrinas pertencem a uma família de proteínas transmembranares de superfície celular, formadas de heterodímeros de cadeias α e β unidas por ligações não-covalentes (ZOPPO; MILNER, 2006). A especificidade e funções das integrinas às diferentes moléculas de MEC são produtos da combinação de 16 cadeias α conhecidas e 8 cadeias β . Em astrócitos, são expressas as integrinas $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$, $\alpha_8\beta_1$, $\alpha_v\beta_1$, $\alpha_6\beta_4$, e $\alpha_v\beta_1$ (CLEGG *et al.*, 2003). As interações entre MEC e integrinas podem transmitir ou iniciar sinais intracelulares ou célula-célula, promovendo movimento, adesão, proliferação, diferenciação e morte celular, além de modular outros processos celulares incluindo organização de citoesqueleto (ZAGRIS, 2001).

Durante os estágios iniciais do desenvolvimento são detectáveis várias proteínas de MEC, como fibronectina, laminina, colágenos, tenascinas e PGs (PESHEVA; PROBSTMEIER, 2000). Entretanto, no desenvolvimento do SNC, laminina, fibronectina e sindecanas têm papel de destaque, tanto formando substratos permissivos e não permissivos que orientam a migração neuronal, como também provendo sinais e modulando a atividade de fatores solúveis que coordenam a proliferação, a adesão e a morfologia celular (SCHWARTZ; DOMOWICZ, 2004).

1.3.1 - Fibronectina

A fibronectina é uma glicoproteína homodimérica, composta de duas subunidades de 230-270 KDa unidas entre si por duas pontes dissulfeto, próximo às extremidades C-terminal. Esta molécula é sintetizada e secretada como um dímero unido por pontes dissulfeto, sendo que cada subunidade contém três tipos de módulos repetidos (I, II e III), correspondendo a domínios funcionais que interagem com outros

componentes de MEC, com os receptores de superfície celular e com outras moléculas de fibronectina (Figura 4). As integrinas envolvidas no reconhecimento e sinalização por fibronectina incluem a $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_4\beta_7$, $\alpha_v\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_6$, $\alpha_v\beta_3$ (VENSTROM; REICHARDT, 1993; CLEGG, *et al.*, 2003). A formação de uma estrutura extracelular multimérica de fibronectina é iniciada com a sua ligação na integrina $\alpha_5\beta_1$. Subseqüentes processos, que incluem mudanças conformacionais nas moléculas de fibronectina e agrupamento de integrinas, levam à mobilização de outras moléculas de fibronectina e à organização de pequenas fibrilas. Os domínios citoplasmáticos das integrinas associam-se ao citoesqueleto de actina, formando uma conexão essencial para a polimerização da fibronectina e estabilização do complexo formado (SCHWARZBAUER; SECHLER, 1999; MAO; SCHWARZBAUER, 2005).

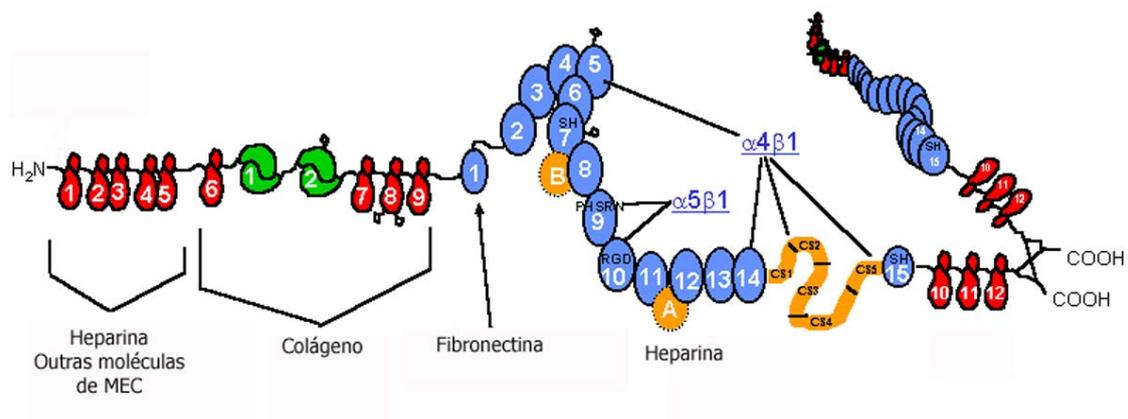


Figura 4 – Representação esquemática da molécula de fibronectina. O esquema demonstra as duas subunidades que compõem a fibronectina e os domínios de ligação à integrinas e a outros componentes da MEC. Adaptado de Kenneth (2008).

A fibronectina é expressa precocemente no desenvolvimento do SNC, influenciando a migração neuronal, crescimento neurítico e regeneração de nervo após injúria. No córtex cerebral, no período que antecede a migração dos neurônios para as camadas mais superficiais, a fibronectina é amplamente expressa na subplaca cortical. A expressão é reduzida no período em que se inicia a diferenciação destes neurônios, demonstrando seu papel como substrato para a migração neuronal. Além disto, a fibronectina é expressa em vias migratórias da crista neural, indicando o seu papel na modulação da migração neuronal e crescimento de neuritos também durante o desenvolvimento do SNP (VENSTROM; REICHARDT, 1993). A fibronectina exerce um importante papel na adesão celular e, devido à sua ligação em outros componentes da MEC e com as integrinas, que estão intimamente ligadas ao citoesqueleto, está também envolvida na manutenção da morfologia celular (ZAGRIS, 2001).

A fibronectina pode também influenciar diretamente a progressão do ciclo celular, visto que desorganização da matriz desta molécula promove redução na atividade de ciclinas e a interação da fibronectina com fatores de crescimento pode regular a diferenciação celular (SCHWARZBAUER; SECHLER, 1999).

1.3.2 – Laminina

A laminina é o maior componente de MEC depois dos colágenos. Cada molécula de laminina é formada geralmente de heterotrímeros de cadeias α , β e γ , sendo possíveis 45 combinações de acordo com as isoformas de cada tipo de cadeia. Entretanto, são conhecidos atualmente 20 tipos de laminina. No SNC são expressas principalmente a laminina-1, constituída de cadeias $\alpha 1-\beta 1-\gamma 1$ e laminina-2, formada por cadeias $\alpha 2-\beta 1-\gamma 1$. As cadeias α , β e γ associam-se por pontes dissulfeto, conferindo à molécula de laminina uma estrutura cruciforme, com domínios de ligação de alta afinidade a

outras proteínas de MEC, como colágeno IV, PGHSs e integrinas, o que promove a adesão da célula à matriz (Figura 5) (HARALSON; HASSEL, 1995). Os receptores celulares tanto para laminina-1 como para laminina-2 são principalmente integrinas dos tipos $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$, $\alpha_6\beta_4$, $\alpha_7\beta_1$ e PGs de heparan sulfato (PGHS), além de outros PGs (COLOGNATO; YURCHENCO, 2000).

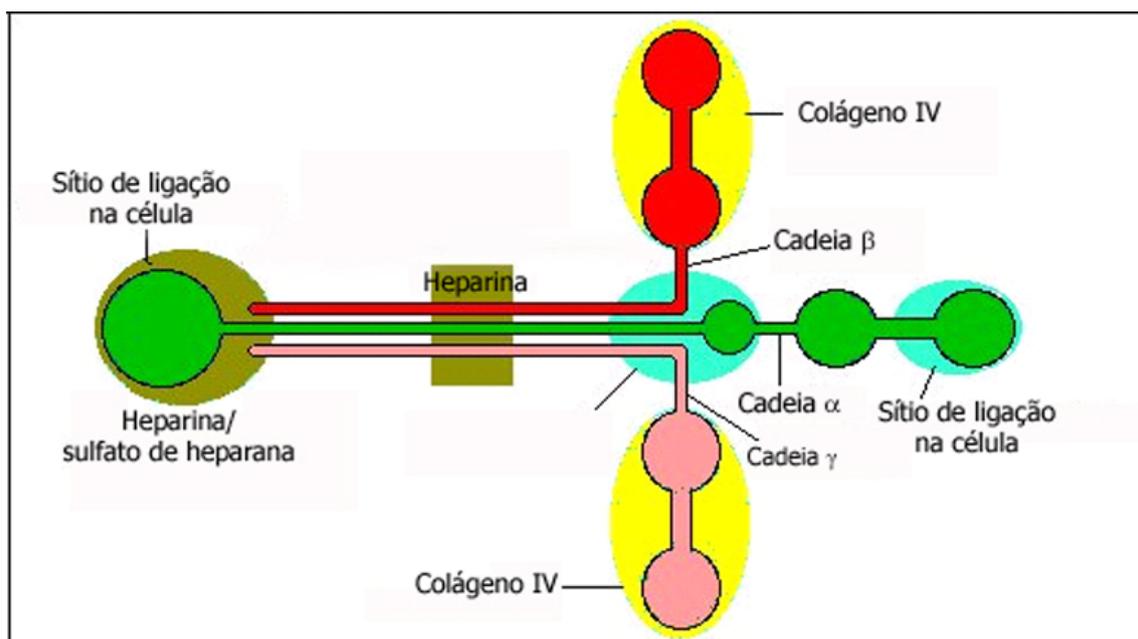


Figura 5 – Representação esquemática da molécula de laminina. O esquema demonstra as três cadeias (α , β e γ) que compõem a laminina e os domínios de ligação à célula e a outros componentes da MEC. Adaptado de The Extracellular Matrix (2008).

A laminina é sintetizada e secretada pelos astrócitos, depositada nos espaços extracelulares e fixada na superfície celular através da ligação das integrinas. A regionalização das moléculas de laminina na MEC é determinada pelos pontos de contatos focais. Estes são complexos macromoleculares formados pelo agrupamento de integrinas ligadas a microfilamentos de actina (FARWELL *et al*, 1995; LEONARD, 2008). A organização da laminina em padrões específicos na superfície celular promove orientação direcional para o crescimento de neuritos e para a migração neuronal. Por exemplo, em regiões permissivas à neuritogênese em mesencéfalo, a laminina tem um

padrão puntual, enquanto em regiões não permissivas nesta estrutura, a laminina apresenta padrão fibrilar (GARCIA-ABREU *et al.*, 1995). Durante a fase pré-migratória de neurônios cerebelares de camundongos (E18-P0), a laminina é encontrada em depósitos pontuais ao longo das fibras da glia de Bergmann. Além disto, nesta idade a concentração de laminina é mais alta quando comparada ao cerebelo pós-natal, sugerindo que poderia estimular o início da migração das células granulares (revisado em PORCIONATTO, 2006).

1.3.3 – Proteoglicanos

A MEC é composta, também, de uma mistura heterogênea de glicoconjugados, incluindo os proteoglicanos (PGs). Os PGs são encontrados predominantemente na superfície celular e nos espaços extracelulares, sendo constituídos por um centro proteico com uma ou mais cadeias laterais de glicosaminoglicanos (GAGs), ligadas covalentemente. Os principais GAGs são o sulfato de heparana (HS)¹, sulfato de condroitina (CS), sulfato de queratana (KS), sulfato de dermatana (DS) e o ácido hialurônico. Os GAGs são compostos de cadeias de polissacarídeos não ramificadas, formadas de repetições de dissacarídeos, sendo um dos açúcares aminado e sulfatado (com exceção do ácido hialurônico), que pode ser N-acetil-glicosamina ou N-acetil-galactosamina e sendo o outro açúcar um ácido urônico. Os GAGs são carregados negativamente devido aos radicais sulfato e aos radicais carboxila, o que atrai diversos cátions, como o sódio, que lhes confere caráter hidrofílico e promovem a formação de um gel na matriz, o que hidrata os espaços extracelulares. Desta forma, a sulfatação é um determinante crítico na densidade de carga do GAG, a qual pode ser essencial para

¹ As siglas entre parênteses correspondem ao nome do proteoglicano em inglês e serão mantidas ao longo do trabalho como segue: sulfato de heparana – HS (*heparan sulfate*), sulfato de condroitina – CS (*chondroitin sulfate*), sulfato de queratana – KS (*keratan sulfate*), sulfato de dermatana - DS (*dermatan sulfate*).

as interações moleculares com a superfície celular ou com a MEC (SCHLESSINGER *et al.*, 1995; DOW; WANG, 1998; SCHWARTZ; DOMOWICZ, 2004).

Entre os principais membros descritos de PG que apresentam CS podem ser citados a agrecana, versicana, neurocana, brevicana e fosfacana. Fibromodulina e lumicana são exemplos de PGKS; decorina e biglicana de PGDS/CS e perlecana e glipican de PGHS/CS). Entretanto, a maior família de PGs de superfície celular são as sindecanas, que apresentam em sua estrutura principalmente HS (SCHWARTZ; DOMOWICZ, 2004), embora algumas sindecanas possam também apresentar cadeias de CS. As principais funções biológicas destes PGs são atribuídas às suas cadeias de HS (BARTLETT *et al.*, 2007).

As sindecanas correspondem a proteínas transmembranas do tipo I, sendo atualmente descritos quatro tipos de sindecanas (1 a 4), codificadas por quatro genes distintos. Cada um dos tipos de sindecana apresenta um ectodomínio de tamanho variável, onde estão presentes os sítios de ligação para as cadeias de HS. Os domínios transmembranas destas moléculas são quase totalmente conservados entre os vertebrados. A parte citoplasmática da molécula apresenta dois domínios que não são variáveis – o domínio próximo à membrana, chamado de região C1, e o domínio próximo ao C-terminal, chamado de região C2. Entre as regiões C1 e C2 encontra-se um domínio variável entre as sindecanas 1-4, porém cada uma delas é conservada entre as espécies de vertebrados (Figura 6). Para as sindecanas 1 a 3 as funções deste domínio variável são desconhecidas até o momento, enquanto que para a sindecana-4 esta região é responsável pela ligação ao complexo fosfatidil-inositol-bifosfato (PIP₂) e à proteína cinase C (PKC) nos pontos de contatos focais (LOPES *et al.*, 2006).

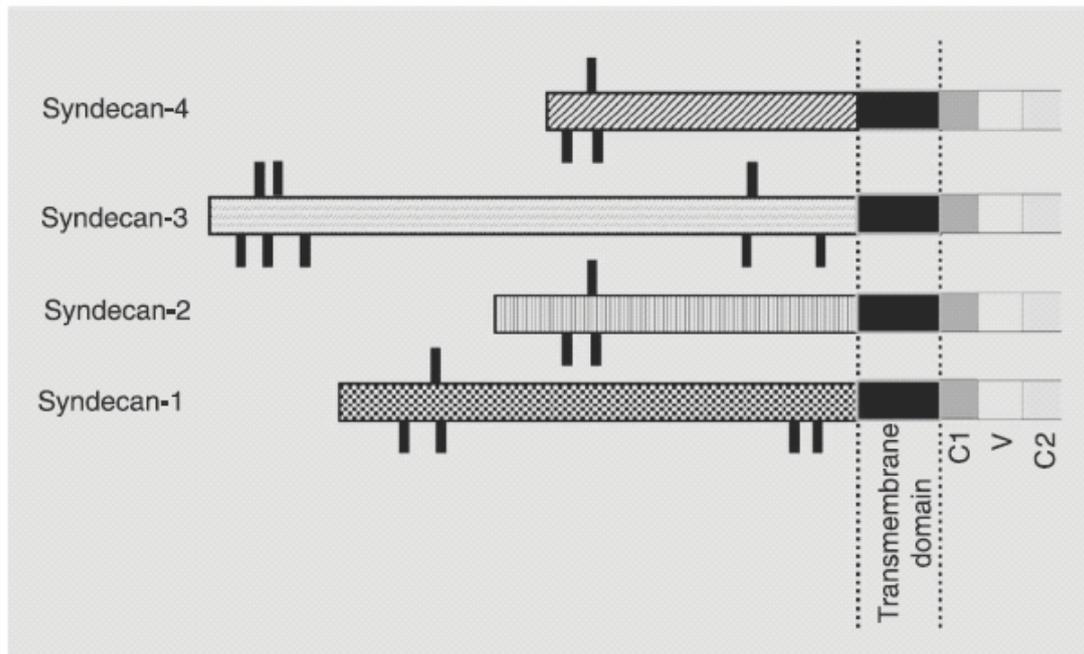


Figura 6 – Representação esquemática dos diferentes tipos de sindecanas em mamíferos. As linhas pretas indicam os sítios de ligação aos GAGs. Os domínios transmembranares e as regiões C1 e C2 são conservados entre os quatro tipos de sindecanas, enquanto a região V é variável. Adaptado de Lopes e colaboradores (2006).

Quanto à distribuição, as sindecanas têm um distinto padrão de expressão em diferentes células e tecidos, porém, a maioria das células expressa pelo menos um tipo de sindecana. A Sindecana-1 é característica de células epiteliais; a sindecana-2 é abundantemente expressa em células mesenquimais, podendo estar presente também no SN; a sindecana-3 (também chamada N-sindecana) é expressa principalmente nas células neurais; e a sindecana-4 é encontrada essencialmente nos rins, porém pode ser encontrada em uma grande variedade de células (CAREY, 1997; RAPRAEGER, 2001). O padrão de expressão das sindecanas é regulado com o desenvolvimento. Estas alterações são normalmente associadas a transições morfológicas ou alterações na organização dos tecidos. Em roedores, por exemplo, os níveis de sindecana-3 crescem rapidamente ao nascimento, atingindo o pico máximo de expressão aos 7 dias pós-natal e diminuem drasticamente na vida adulta. Sindecana-1 é expressa quase que

exclusivamente em células epiteliais, mas sua expressão é perdida nestes tecidos em regeneração. Além disto, durante a embriogênese, a sindecana-1 é expressa também em células mesenquimais, principalmente nos períodos de interações epitélio-mesênquima (CAREY, 1997).

Além das funções que vão desde a hidratação da superfície celular, modulação de concentração iônica e de crescimento, reconhecimento, migração e adesão celular, as sindecanas exercem um importante papel na sinalização química entre as células, ligando-se a moléculas sinalizadoras, como o FGF₂ (ALVAREZ-SILVA *et al.*, 1993; SCHWARTZ; DOMOWICZ, 2004). A interação com sindecanas estabiliza a molécula de FGF₂, protegendo-o da degradação proteolítica, aumentando a sua eficácia, além de servir como um reservatório deste fator, que pode ser liberado por proteases extracelulares (ALVAREZ-SILVA *et al.*, 1993; STREULI, 1999). A ligação do FGF₂ ao PGHS é requerida para a sua apresentação ao receptor (RFGF), promovendo então a formação do complexo FGF/RFGF e estabiliza a dimerização do RFGF, forma ativa do receptor (MASON, 1994; TURNBULL *et al.*, 2001). A formação do complexo FGF/RFGF potencializa a transdução do sinal, transmitindo as informações através da membrana plasmática e desencadeando as respostas biológicas induzidas pelo FGF₂ (SCHLESSINGER *et al.*, 1995; KLAGSBRUN; BAIRD, 1991; TURNBULL *et al.*, 2001). Além disto, o FGF₂ é secretado pelos astrócitos sob o estímulo do hormônio da tireóide, o T₃, é também um dos mediadores dos efeitos deste hormônio na organização de laminina e fibronectina (TRENTIN *et al.*, 2001; TRENTIN *et al.*, 2003). Desta forma, diversos trabalhos têm demonstrado os efeitos do T₃ na expressão e organização de moléculas de MEC no SNC (TRENTIN *et al.*, 1995; FARWELL *et al.*, 1995; GOMES *et al.*, 1999; CALLONI *et al.*, 2001; MARTINEZ; GOMES, 2002;).

1.4 - ASTRÓCITOS E HORMÔNIO DA TIREÓIDE

O papel essencial do hormônio da tireóide, triiodotironina ou T_3 , no crescimento, desenvolvimento e metabolismo em mamíferos é bem documentado. Durante o período fetal, a deficiência de T_3 pode resultar em retardo físico e mental, conhecido em humanos como cretinismo, afetando, principalmente, regiões do cérebro como o cerebelo, o hipocampo e o córtex cerebral (TRENTIN et al., 2006). Clos e colaboradores (1980) demonstraram que ratos hipotireoideos apresentam defeitos na formação da glia de Bergmann, interferindo na migração neuronal e causando a morte em grande escala de células precursoras de neurônios granulares. O hipotireoidismo congênito tem uma importante influência sobre a migração e a diferenciação neuronal. Por exemplo, o hipotireoidismo perinatal resulta em redução da arborização dendrítica em células de Purkinje e da sinaptogênese entre estas células e neurônios granulares, atraso na mielinização e alterações nas conexões entre neurônios cerebelares e fibras neuronais aferentes (KOIBUCHI; CHIN, 2000). Ao contrário, T_4 e T_3 promovem arborização dendrítica em células de Purkinje em camundongos BALB-C (KURODA *et al.*, 2002).

O principal produto secretado pela glândula tireóide é a tiroxina ou T_4 . O transporte de T_4 através da barreira hemato-encefálica é mediado por transportadores da família OATP (proteína transportadora de ácidos orgânicos), presente nos capilares do cérebro e plexo coróide sendo altamente específico para T_4 , com papel crucial no influxo desta molécula do sangue para o encéfalo (revisado em VISSER, 2006). Por apresentar caráter lipofílico, por muito tempo se acreditou que o mecanismo de entrada de T_4 e T_3 na célula fosse apenas por difusão (SUZUKI; ABE, 2007). Entretanto, diversos transportadores para iodotironinas têm sido descritos. Estas moléculas pertencem à família de transportadores de monocarboxilatos (MCT). A princípio,

MCT8 foi identificado como transportador de T_3 . Entretanto, se verificou que camundongos que não expressam o MCT8 apresentavam níveis elevados de T_3 , retardo psicomotor, porém, sem defeitos neurológicos. Recentemente, MCT10 também foi descrito como transportador de iodotironinas e de aminoácidos aromáticos, sendo o transportador preferencial de T_3 e mais efetivo que o MCT8 (VISSER *et al.*, 2007). No cérebro, MCT8 é expresso predominantemente em neurônios, sendo extremamente importante para a captação neuronal de T_3 (VISSER, 2006). Ainda não são conhecidos transportadores de iodotironinas em astrócitos. Entretanto, tem sido proposto um mecanismo pelo qual o T_4 é captado pelos astrócitos, convertido em T_3 e liberado para os neurônios (Figura 7) (BERNAL, 2005).

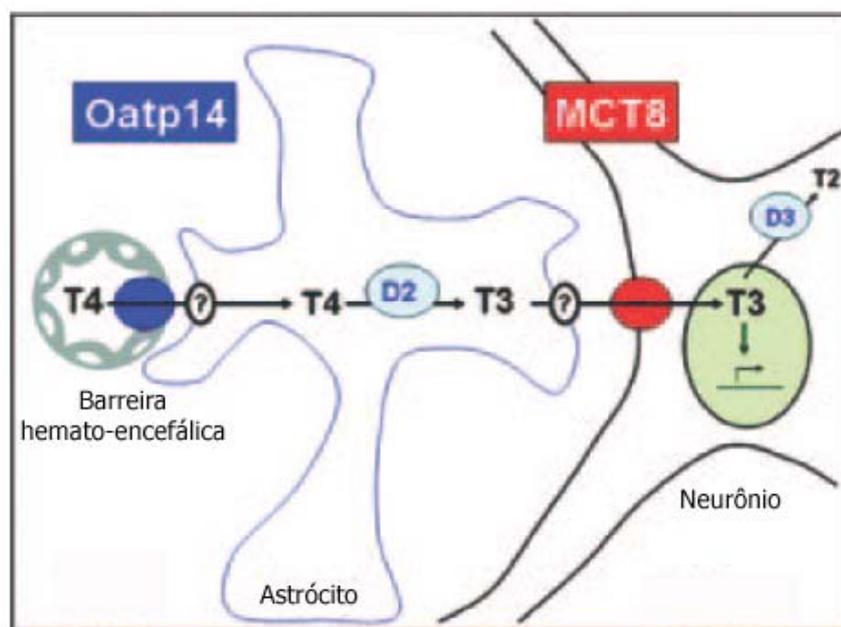


Figura 7 – Modelo da circulação do T_3 no cérebro. T_4 é transportado da barreira hemato-encefálica por Oatp14 e captado pelos astrócitos, onde é convertido a T_3 e liberado para os neurônios. T_4 : tiroxina; T_3 : triiodotironina; T_2 : diiodotironina; D3: desiodase tipo III; OATP: proteína transportadora de ácidos orgânicos; MCT: transportador monocarboxilato. Adaptado de Visser (2006).

O T_4 , em comparação a T_3 , é praticamente inativo, sendo por isso considerado por muitos autores como um pró-hormônio. Desta forma, atividade do hormônio da tireóide é regulada via conversão do T_4 em T_3 , por desiodação do anel externo pela ação

de enzimas desiodases, no citoplasma (DARRAS *et al.*, 1999; BIANCO; KIM, 2006). As desiodases de iodotironinas são enzimas que regulam a disponibilidade local do T₃ para seus receptores nucleares. A desiodase I está presente predominantemente no fígado, rins e tecidos tireóideos e catalisa a desiodação de T₄ em T_{3r}, T₃ em T₄ e T_{3r} em T₂ nestes tecidos (BERRY *et al.*, 1991; MANDEL *et al.*, 1992; DARRAS *et al.*, 1999). O tipo II de desiodase catalisa a monodesiodação do T₄ e do rT₃ (T₃ reverso) em T₃ e para diiodotironina (T₂), respectivamente. Desta forma, o suprimento do hormônio ativo, T₃, no cérebro, depende da captação do T₄ pelos transportadores celulares e da sua desiodação intracelular pela desiodase tipo II (VISSER, 2006). A desiodase tipo III catalisa a desiodação do anel interno do T₄ em rT₃ e do T₃ em T₂ (Figura 8). Como rT₃ e T₂ têm pouca atividade biológica, essa enzima é a responsável pela regulação da concentração intracelular de T₃ e tem um papel essencial na maturação e função cerebral (BIANCO; KIM, 2006). No SNC, a desiodase II é predominantemente expressa nos astrócitos e tanícitos (BERNAL, 2005).

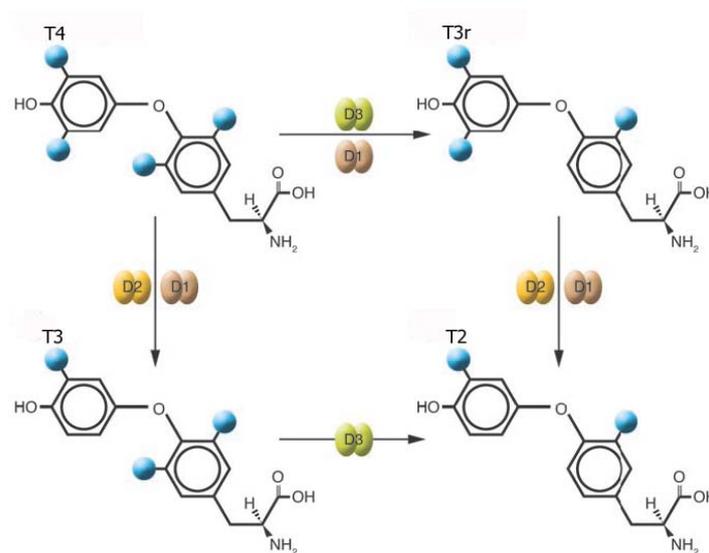


Figura 8 – Esquema representativo da ação de enzimas desiodases. D3 e D1 catalisam a desiodação do anel interno, convertendo T₄ em T_{3r} e T₃ em T₂. D2 e D1 catalisam a desiodação do anel externo, convertendo T₄ em T₃ e T_{3r} em T₂. T₄: tiroxina T₃: triiodotironina; T₂: diiodotironina; T_{3r}: triiodotironina reverso. Adaptado de Bianco e Kim (2006).

Os principais efeitos do T_3 nas células ocorrem pela sua ligação nos receptores nucleares, TRs. Dois genes distintos codificam as duas formas conhecidos de TRs, $TR\alpha$ e $TR\beta$. O gene $TR\alpha$ codifica as isoformas $TR\alpha1$, $TR\alpha2$, $TR\alpha3$ e as formas truncadas $\Delta TR\alpha1$ e $\Delta TR\alpha2$, sendo que apenas $TR\alpha1$ é ligante de T_3 . $TR\beta$ codifica $TR\beta1$, $TR\beta2$ e $TR\beta3$, ligantes de T_3 , e $\Delta TR\beta3$ que se liga ao T_3 , mas não ao DNA (BERNAL *et al.*, 2003). Entretanto, a expressão dos TRs em astrócitos tem sido alvo de diversos trabalhos com resultados bastante controversos, promovidos provavelmente, por diferenças de condições experimentais. Leonard e colaboradores (1994) demonstraram a presença de $TR\alpha1$ em culturas de neurônios de ratos E17, enquanto que culturas de astrócitos neonatos apresentaram apenas a forma não ligante de T_3 , $TR\alpha2$. Por outro lado, Carlson e colaboradores (1996) mostraram que $TR\beta1$, $TR\beta2$, $TR\alpha1$ e $TR\alpha2$ são expressos em culturas de astrócitos tipo 2, células com muitos prolongamentos, e somente o receptor $TR\beta2$ é expresso em astrócitos tipo 1, células protoplasmáticas. Entretanto, outro grupo demonstrou a presença de $TR\alpha1$, $TR\alpha2$ e $TR\beta1$ em astrócitos tipo 1. O tratamento destas células com T_3 promoveu aumento na expressão de RNA mensageiro para $TR\beta1$, mas não teve influência na expressão de $TR\alpha1$, $TR\alpha2$ (LEBEL *et al.*, 1993). Recentemente, foi demonstrada em astrócitos cerebelares, a presença do $TR\alpha1$ e do $TR\beta1$ (MORTE *et al.*, 2004). Além disto, os TRs são expressos diferencialmente de acordo com o estágio de desenvolvimento. Em geral, $TR\alpha1$ é expresso em altos níveis no início do desenvolvimento cerebral, enquanto a expressão de $TR\beta1$ é bastante aumentada no final desse período (ANDERSON, 2001; FORREST *et al.*, 2002), coincidindo com o desenvolvimento do cerebelo.

Os TRs se ligam a regiões específicas do DNA, conhecidas como elementos de resposta ao hormônio da tireóide (TREs) (Figura 9), na forma de monômeros, homodímeros ou mais comumente, como heterodímeros formados entre o TR e o

receptor de 9-cis-ácido retinóico (RXR). O complexo TR/RXR é considerado por muitos autores como mediador chave nos efeitos biológicos do T₃. Porém, a ligação do receptor ao TRE é independente da presença do hormônio, podendo assim ativar ou reprimir a expressão gênica (FORREST *et al.*, 2002).

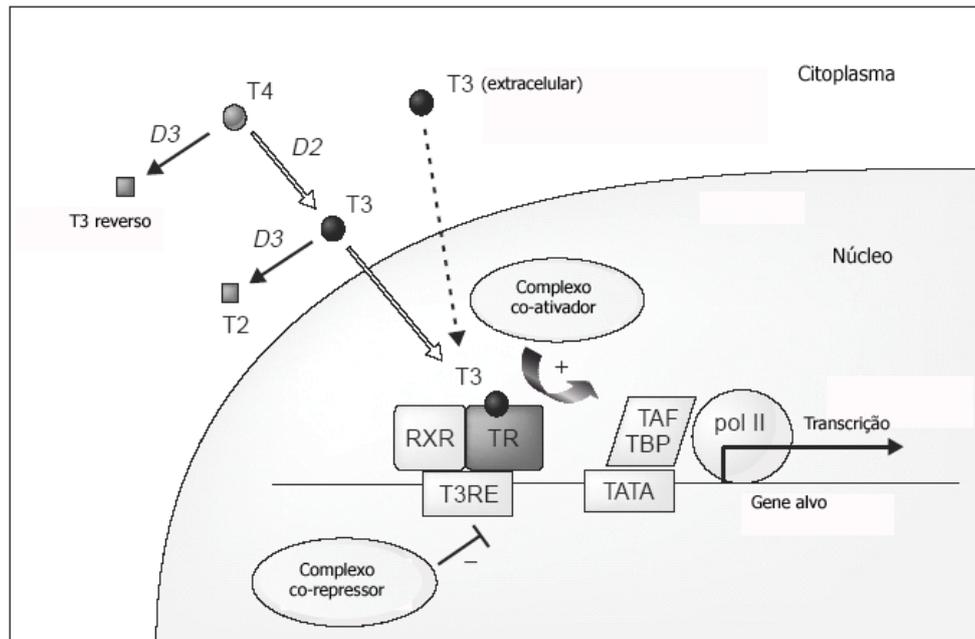


Figura 9 – Esquema simplificado da ligação do T₃ ao seu receptor nuclear. No citoplasma, T₄ é convertido em T₃ que se liga ao seu receptor nuclear. O TR então se liga ao complexo co-ativador que ativa a transcrição gênica por estímulo de proteínas ligadoras de TATA *box*. Na ausência do T₃, TRs podem se ligar a co-repressores, reprimindo a transcrição. T₄: tiroxina; T₃: triiodotironina; T₂: diiodotironina; D2: desidatase tipo 2; D3: desidatase tipo 3; TR: receptor de hormônio da tireóide; RXR: receptor de ácido retinóico; T3RE: elemento de resposta ao hormônio da tireóide; TBP: proteínas ligadoras de TATA *box*; TAF: fatores associados à TBP; pol II: polimerase II. Adaptado de Forrest e colaboradores (2002).

Os efeitos do hormônio da tireóide em astrócitos são bastante conhecidos. T₃ induz alterações morfológicas em culturas de astrócitos de hemisférios cerebrais e mesencéfalos de animais neonatos, efeito acompanhado de reorganização e aumento na expressão de GFAP (TRENTIN *et al.*, 1995). Recentemente, dados do nosso laboratório demonstraram redução na expressão de fibronectina em mesencéfalos de ratos neonatos hipotireoideos quando comparados a animais normais. Esse efeito não é observado em hemisférios cerebrais (CALLONI *et al.*, 2001). Além disto, T₄ aumenta a adesão de

astrócitos à laminina, modulando a formação de contatos focais (FARWELL *et al.*, 1995). Por outro lado, astrócitos cerebelares e células do glioblastoma C6 proliferam em resposta ao tratamento hormonal. Esse efeito é mediado pela secreção de uma combinação de fatores de crescimento, como FGF₁ e FGF₂, fator de necrose tumoral-β (TNF-β) e interleucina-3 (IL-3). Apesar de estes fatores atuarem coordenadamente, FGF₂ parece apresentar efeito proeminente (TRENTIN *et al.*, 2001). Fatores de crescimento secretados por astrócitos sob estímulo de T₃, também exercem efeito sobre o desenvolvimento neuronal. Gomes e colaboradores (1999) verificaram que o meio condicionado obtido de astrócitos tratados com T₃ promove aumento significativo no número de neurônios cerebelares em cultura. Além disto, o fator de crescimento epidermal (EGF) é capaz de mediar os efeitos do T₃ na expressão de laminina e fibronectina em astrócitos cerebelares, promovendo assim aumento na neuritogênese (MARTINEZ; GOMES, 2002). Diversos trabalhos sugerem que os efeitos do hormônio da tireóide podem ser mediados também pela MEC.

Estudos anteriores em nosso laboratório demonstraram que o tratamento com 50 nM de T₃ promoveu alterações na organização e aumento na expressão de proteínas da MEC, laminina e fibronectina, em culturas de astrócitos cerebelares de ratos neonatos. Astrócitos tratados com T₃ aderiram melhor ao substrato, provavelmente devido às modificações observadas nas moléculas da MEC. O tratamento com FGF₂ também promoveu alterações na organização de laminina e fibronectina dos astrócitos cerebelares, porém não tão expressivas quanto às observadas com T₃. Estas alterações na MEC não foram observadas quando estas células foram tratadas com T₃ e anticorpo neutralizante para FGF₂, demonstrando o papel mediador do FGF₂ sobre os efeitos do T₃. Além disto, foi observado um maior número de neurônios e com neuritos mais

longos quando co-cultivados sobre astrócitos tratados com T₃ do que quando cultivados sobre astrócitos controle (TRENTIN *et al.*, 2003).

Estes resultados sugerem que o T₃ promove a formação de um microambiente mais adequado ao desenvolvimento e sobrevivência neuronal e neuritogênese. Assim, este hormônio poderia também proteger os neurônios em situações de dano celular, como por exemplo, um insulto excitotóxico promovido por glutamato, demonstrado largamente na literatura como tóxico para as células do SNC. Então, no presente trabalho, estudamos os efeitos do tratamento do T₃ em astrócitos sobre a captação de glutamato, expressão de transportadores glutamatérgicos e sobrevivência neuronal em modelo de co-cultura com astrócitos. Estudamos também a expressão de proteoglicanos, laminina e fibronectina em astrócitos provenientes de animais normais ou hipotireoideos e sua influência no desenvolvimento neuronal. Analisamos ainda, a recuperação do microambiente hipotireoideo após o tratamento com T₃.

2 – OBJETIVOS

2.1 – OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo geral avaliar os efeitos do hormônio da tireóide analisando diversos aspectos morfológicos e funcionais de astrócitos cerebelares, como a atividade e a expressão de transportadores de glutamato, a consequência destes processos na sobrevivência neuronal e a expressão de componentes de matriz extracelular, como as sindecanas.

2.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Verificar os efeitos do tratamento com T₃ sobre a captação de glutamato em culturas de astrócitos cerebelares de ratos neonatos;
2. Avaliar, nestas culturas, a expressão dos transportadores de glutamato astrocitários, GLAST e GLT-1;
3. Determinar os efeitos do T₃ sobre a viabilidade dos astrócitos após um insulto excitotóxico induzido por glutamato;
4. Avaliar a sobrevivência neuronal após insulto excitotóxico induzido por glutamato, em co-culturas com astrócitos tratados com T₃.
5. Verificar a influência do hormônio da tireóide na expressão das sindecanas em culturas de astrócitos provenientes de cerebelos de ratos neonatos.
6. Comparar a expressão das sindecanas em cerebelos provenientes de animais neonatos normais e hipotireoideos.

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – REAGENTES

Ácido acético, ácido clorídrico, hidróxido de sódio, metanol (todos P.A.), adquiridos da REAGEN.

Ácido etileno-dinitrilo-tetracético (EDTA), ácido hidroxietil-piperazina-etanosulfônico (HEPES), acrilamida, albumina sérica bovina (BSA), anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase, anticorpo secundário anti-IgG de camundongo (FITC), anticorpo secundário anti-IgG de coelho (Cy3), azul de coomassie R-250, brometo de etídeo, dimetilsulfóxido (DMSO), entelan, glicerol, glutamina, Hoescht 33342, metil-mercapto-imidazol-2-tiol (MMI), 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolium brometo (MTT), poli-ornitina, triiodotironina (T₃), adquiridos da SIGMA.

Ácido L-Glutâmico, Ponceau, Tween-20, adquiridos da USB Corporation.

Agarose, dodecil sulfato de sódio (SDS), kit para quimioluminescência (ECL), membranas de nitrocelulose, padrões de peso molecular, película Hyperfilm e tris, adquiridos da AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH.

Anticorpos policlonais anti-GLAST e anti-GLT, anticorpo secundário anti-porco-da-Índia conjugado à peroxidase, adquiridos da CHEMICON.

Anticorpos policlonais anti-laminina e anti-fibronectina, adquiridos da DAKO.

Cloreto de potássio, cloreto de sódio, ditioneitol (DTT), fosfato de potássio, fosfato de sódio dibásico, meio de Eagle modificado por Dulbecco acrescido de mistura de nutrientes F12 (DMEM/F12), penicilina/estreptomicina, soro bovino fetal (SBF), TRIzol[®], adquiridos da GIBCO, BRL.

Kit de amplificação de sinal por tiramida (TSA), adquirido da PERKIN-ELMER.

Kit Master Mix, adquirido da PROMEGA.

L-[³H]glutamato, adquirido da GE HEALTHCARE.

L-trans-2,4-pirrolidina-dicarboxilato (L-PDC), DL-treo-β-benzil-oxiaspartato (DL-TBOA), adquiridos da TOCRIS BIOSCIENCE.

Paraformaldeído, glicose, peróxido de hidrogênio, adquiridos da MERCK.

Placas de 24 poços e garrafas de cultura de 25 cm², adquiridos da CORNING.

Resina AG 2-X8, adquirido da BIO RAD.

VIP-vector, adquirido da VETEC.

3.2 – ANIMAIS

Para a realização das culturas de células foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) de 0 a 3 dias pós-natal neonatos normais e hipotireoideos de ambos os sexos. Fêmeas prenhas foram obtidas no Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina e mantidas no biotério do Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética, em ciclo de claro/escuro de 12 horas e temperatura entre 22 e 25°C, com água e ração *ad libitum*, até o nascimento dos filhotes. Para a obtenção dos animais hipotireoideos, as fêmeas prenhas foram mantidas com metil-mercaptopimidazol-2-tiol (MMI, 0,02%) dissolvido na água e ração *ad libitum*, até o nascimento e utilização dos filhotes (CALLONI *et al.*, 2001). Os ratos neonatos foram mortos por decapitação, de acordo com o código de ética de utilização de animais para pesquisa, conforme protocolo aprovado pela CEUA/UFSC (nº 062/CEUA/PRPe/2007).

3.3 - MÉTODOS

3.3.1 - Culturas primárias

As culturas primárias de astrócitos foram obtidas de cerebelo, córtex cerebral ou hipocampo de ratos neonatos normais e hipotireoideos. Os animais foram decapitados e os cérebros foram retirados dentro do fluxo laminar, em salina tamponada por fosfato (PBS)-glicose (0,6%). As estruturas cerebrais foram dissecadas e as meninges retiradas. O tecido foi picotado e dissociado manualmente com pipeta Pasteur em PBS-glicose. As células foram precipitadas por centrifugação e ressuspensas em meio de cultura DMEM/F12, acrescido de glicose (0,6%), glutamina (2mM), bicarbonato de sódio (0,06%) e penicilina/estreptomicina (1U/1 µg) e suplementado com 10 % de soro bovino fetal (SBF). As culturas provenientes de animais hipotireoideos foram mantidas em DMEM/F12 suplementado com 10 % de SBF depletado de T₃, conforme descrito abaixo. As células então foram plaqueadas em garrafas de cultura de 25 cm² a uma densidade de 5 x 10⁶ células, em placas de cultura de 24 poços na densidade de 3 x 10⁵ células ou em placas de cultura de 96 poços na densidade de 7,5 x 10⁴ células. As garrafas e placas de cultura foram previamente tratadas com 1,5 µg/ml de poli-ornitina em PBS e lavadas com PBS. As culturas foram mantidas em estufa úmida a 37°C a 5% de CO₂ até a confluência (10-14 dias), trocando-se o meio de cultura a cada 3-4 dias.

3.3.2 – Preparo de SBF depletado de T₃

A depleção de T₃/T₄ do SBF foi realizada por adsorção, com o uso da resina analítica por troca aniônica AG 2-X8. A ausência de T₃ e T₄ no SBF após a depleção dos hormônios foi confirmada por Rádio-Imuno-Ensaio (LIMA *et al.*, 2001). A resina foi adicionada ao SBF e a solução foi mantida em agitação, no escuro a 4°C, por 6

horas. A seguir, o SBF foi mantido em repouso por aproximadamente 1 hora, no escuro, permitindo a decantação da resina, que foi descartada. O SBF foi então transferido para outro frasco contendo resina e novamente a solução foi mantida em agitação, no escuro a 4°C, desta vez por 12 horas. Após o período de decantação da resina, o SBF foi transferido para tubos de centrífuga de vidro e centrifugado por 20 minutos a 12.000 g, a 4°C. Em seguida, o SBF depletado de T₃/T₄ foi adicionado ao DMEM/F12 ou estocado a -20°C.

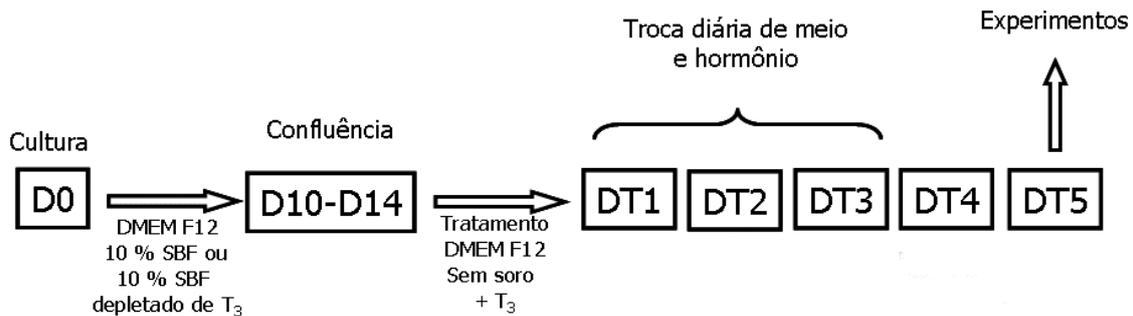
3.3.3 - Co-culturas astrócitos/neurônios

As co-culturas foram realizadas após a confluência dos astrócitos. Os neurônios foram obtidos da mesma maneira que os astrócitos, a partir de cerebelos de animais normais ou hipotireoideos neonatos (P0). Para os experimentos de neuroproteção, os astrócitos normais foram tratados com T₃ conforme descrito abaixo. Após os 5 dias de tratamento, os neurônios (1 x 10⁵ células) provenientes apenas de animais normais foram plaqueados sobre as monocamadas astrocitárias e mantidos por 24 horas. Para os experimentos de interação célula/MEC e célula/célula, os neurônios foram obtidos de animais normais e hipotireoideos e plaqueados (1,5 x 10⁵ células) tanto sobre astrócitos normais como sobre astrócitos hipotireoideos e mantidos por 24 horas em estufa úmida a 37°C com 5% de CO₂. Após este período as co-culturas foram fixadas e os neurônios analisados por imunocitoquímica, conforme descrito no item 3.3.7.

3.3.4 - Tratamento com 3, 3',5' Triiodo-L-tironina (T₃)

O sistema de tratamento dos astrócitos com T₃ está ilustrado no esquema abaixo. Para os experimentos de neuroproteção, os astrócitos foram mantidos após a confluência, em DMEM/F12 desprovido de SBF, suplementado com 50 nM de T₃, por

três dias, com renovação diária de meio e hormônio. No quarto e quinto dia não houve troca do meio de cultura. Os experimentos foram realizados no quinto dia de tratamento. Astrócitos hipotireoideos receberam o mesmo sistema de tratamento, com diferença apenas na concentração de T_3 utilizada, sendo 0,5, 1, 5 e 10 nM de T_3 .



3.3.5 - Tratamento com L-glutamato

Após os 5 dias de tratamento com 50 nM de T_3 , os astrócitos foram incubados com 50, 100 ou 200 μ M de L-glutamato, adicionado diretamente ao meio de cultura. Depois de um período de três horas, os neurônios foram plaqueados conforme descrito acima, e mantidos por mais 24 horas, e a seguir a co-cultura foi fixada e analisada por imunocitoquímica para β -tubulina III.

3.3.6 - Análise da captação de glutamato

Os experimentos de captação de glutamato pelos astrócitos foram realizados no 5º dia de tratamento com T_3 conforme descrito por Tavares e colaboradores (2002). O meio de cultura foi removido e as células incubadas com solução salina de Hanks (HBSS) (pH 7,2) contendo $CaCl_2$ (1,29 mM), $NaCl$ (136,9 mM), KCl (5,36 mM), $MgSO_4$ (0,65 mM), Na_2HPO_4 (0,27 mM), KH_2PO_4 (1,1 mM), HEPES (5 mM) e glicose (2 mM). Após 15 minutos de incubação, foi adicionado 0.33 μ Ci/ml de L- $[^3H]$ glutamato

com L-glutamato não radioativo para alcançar as concentrações finais de glutamato (de 1 a 200 μM) a 35°C. A reação foi interrompida após 7 minutos por duas lavagens com HBSS gelado, seguidas imediatamente por lise celular em solução contendo NaOH (0,1 N)/SDS (0.01%) por 15 minutos. Aliquotas das amostras foram separadas para dosagem de proteínas pelo método de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951) e a captação de L-[³H]glutamato pelos astrócitos foi analisada em leitor de cintilação líquida. Os parâmetros cinéticos obtidos com as curvas de concentração de glutamato, como velocidade máxima de captação (V_{max}) e constante de Michaelis-Menten (K_{M}), foram calculados pela análise de duplo-recíproco de Lineweaver-Burk, de acordo com Tasca e colaboradores (2004).

Os ensaios de inibição da captação de glutamato foram realizados com a adição dos inibidores de transportadores de glutamato L-trans-2,4-pirrolidina dicarboxilato (L-PDC) ou DL-treo- β -benziloxiaspartato (DL-TBOA), ambos na concentração de 50 μM , 15 minutos antes da adição de L-[³H]glutamato (100 μM). Os experimentos de captação foram realizados conforme descrito acima.

3.3.7 - Imunocitoquímica para β -tubulina III

As co-culturas foram fixadas com paraformaldeído 4 % durante 30 minutos, lavadas por 20 minutos com PBS-Triton X-100 (0,25 %) e depois com PBS (pH 7,6), à temperatura ambiente. Os sítios inespecíficos foram bloqueados com 5 % de SBF em PBS durante 1 hora e as células foram então lavadas com PBS e incubadas com anticorpo monoclonal IgG de camundongo anti- β -tubulina-III (1:400) durante 12 horas em câmara úmida a 4°C. As células foram lavadas novamente com PBS e incubadas por 1 hora à temperatura ambiente, com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase (1:400), no caso dos experimentos de neuroproteção, e com

anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado à rodamina (Cy3, 1:2.500) no caso dos experimentos de interação astrócitos/neurônios normais e hipotireoideos. Para as imunocitoquímicas onde o anticorpo secundário é conjugado à peroxidase, antes do bloqueio dos sítios inespecíficos, a peroxidase endógena das células foi inativada com 0,25 % de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em PBS, por 20 minutos no escuro. A revelação foi realizada com VIP-VECTOR, conforme instruções do fabricante e analisadas em microscópio óptico. Para as imunocitoquímicas para fluorescência, após a incubação com o anticorpo secundário, as culturas foram lavadas com PBS e analisadas em microscópio epifluorescente.

3.3.8 - Imunofluorescência para GLAST e GLT-1

Conforme descrito acima, as culturas de astrócitos foram fixadas com paraformaldeído 4% durante 30 minutos e lavadas com PBS (pH 7,6), à temperatura ambiente. Os sítios inespecíficos foram bloqueados com 5 % de SBF em PBS durante 1 hora e as células foram então lavadas com PBS e incubadas com anticorpo policlonal IgG de porco-da-Índia anti-GLAST (1:4.000) ou anti-GLT-1 (1:2.000) por aproximadamente 12 horas em câmara úmida a 4°C. As células foram lavadas novamente com PBS e incubadas por 1 hora à temperatura ambiente com anticorpo secundário anti-IgG de porco-da-Índia conjugado à peroxidase (1:1.000). As células foram lavadas e a reação foi revelada com *kit* de amplificação do sinal por tiramida, de acordo com as instruções do fabricante. Para obtenção do número total de células, incubadas por 10 minutos com Hoescht 33342 (5 µg/ml). As seguir as culturas foram lavadas com PBS e analisadas em microscópio epifluorescente.

3.3.9 - Imunofluorescência para laminina e fibronectina

Depois de fixadas com paraformaldeído (4 %), as culturas de astrócitos foram lavadas com PBS e incubadas com 5 % de SBF em PBS. Em seguida, os astrócitos foram incubados com os anticorpos policlonais IgG de coelho anti-laminina (1:50) ou anti-fibronectina (1:200), a 4°C por 12 horas. As células foram lavadas com PBS e incubadas com anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (1:100) por 1 hora, lavadas novamente com PBS e, para obtenção do número total de células, incubadas por 10 minutos com Hoescht 33342 (5 µg/ml). As culturas foram então lavadas com PBS e analisadas em microscópio epifluorescente.

3.3.10 – Avaliação da viabilidade celular pelo método do MTT

O MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolium) é um sal de tetrazólio solúvel em água, convertido em formazana púrpura após a clivagem do anel de tetrazólio por desidrogenases mitocondriais, avaliando desta forma a viabilidade celular. No quinto dia de tratamento com T₃, L-glutamato (1 ou 10 mM) foi adicionado ao meio de cultura dos astrócitos e mantido por 24 horas. As células foram lavadas com PBS e foram incubadas com MTT (2,5 mg/ml) dissolvido em PBS por 2 horas a 37°C. Após este período, o PBS foi removido e o composto foi solubilizado com 100 µl de DMSO (dimetilsulfóxido) e analisado em leitor de Elisa (550 nM). A viabilidade celular é proporcional à leitura da absorbância obtida.

3.3.11 – Análise da mortalidade celular por incorporação de SYTOX Green

A análise da mortalidade de astrócitos induzida por glutamato foi avaliada por incorporação de SYTOX Green, corante de alta afinidade por ácidos nucleicos que atravessam apenas a membrana plasmática de células comprometidas, sem penetrar a

membrana das células vivas. Para isto, culturas tratadas ou não com T₃ foram incubadas com L-glutamato na concentração de 10 mM, adicionado ao meio de cultura. Este meio foi mantido por mais 24 horas, quando as culturas foram lavadas com tampão HEPES pH 7,4 [HEPES (5 mM), NaCl (125 mM), KCl (5,5 mM), MgCl₂. 6H₂O (1 mM), CaCl₂. 2H₂O (1.8 mM)] e incubadas com SYTOX Green, de acordo com as instruções do fabricante, por 10 minutos. A seguir, as células foram lavadas com PBS e fixadas como descrito acima. A proporção de células SYTOX Green positivas foi calculada em relação ao número total de células, que foi obtido por coloração com corante lipofílico Hoescht 33342. Após serem lavadas com PBS, as culturas foram examinadas em microscópio epifluorescente.

3.3.12 - Imunodeteção de GLAST, GLT-1, fibronectina e laminina

Culturas de astrócitos tratadas com T₃ ou de astrócitos normais e hipotireoideos confluentes foram solubilizadas em tampão de extração de proteínas contendo Tris (10 mM), EDTA (2 mM) e β-mercaptoetanol (2 mM), em gelo. A quantificação do conteúdo proteico das amostras foi realizada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), utilizando-se como padrão a albumina sérica bovina (BSA). As amostras foram quantificadas a 595nm em espectrofotômetro.

A eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) foi realizada sobre um gel de entrada de 4 %. Para a detecção de GLAST e GLT-1, a concentração de poliacrilamida para o gel de separação foi de 10 % e para a detecção de laminina e fibronectina, de 6,5 %, de acordo com o sistema de Laemmli (LAEMMLI, 1970). Os extratos celulares obtidos foram preparados em tampão de amostra contendo SDS (4 %), glicerol (40 %) e β-mercaptoetanol (2 mM). As amostras foram aplicadas (50 µg/poço) no gel de entrada e a separação das proteínas foi realizada com corrente fixa

de 40 mA e voltagem máxima de 140 mV, por 2 horas e 30 minutos, à temperatura ambiente.

A eletrotransferência das proteínas presentes no gel SDS-PAGE para membrana de nitrocelulose foi realizada em tampão Tris–glicina (Tris/HCl 25 mM pH 7,0; glicina 192 mM) contendo metanol (20 %), com corrente fixa de 350 mA, a 4°C por 1 hora e 30 minutos de acordo com TOWBIN e colaboradores (1979). As membranas foram coradas com vermelho de Ponceau (0,5 %) e a quantidade equivalente de proteína em todas as amostras foi confirmada pela análise por densitometria da banda de 68 KDa das membranas de nitrocelulose, conforme realizado anteriormente por Decker e colaboradores (2007). As membranas então foram incubadas por 1 hora a temperatura ambiente em tampão TBS-T (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 0,05%, pH 7,5), contendo 5% de leite em pó desnatado. Para a detecção de GLAST e GLT-1, as membranas foram incubadas por 12 horas a 4°C com anticorpo policlonal IgG de porco-da-Índia anti-GLAST (1:10.000) ou anti-GLT-1 (1:8.000). Depois de lavadas com TBS-T, as membranas incubadas com os anticorpos anti-GLAST ou anti-GLT-1 foram incubadas com anticorpo secundário anti-IgG de porco-da-Índia conjugado à peroxidase (1:10.000) por 1 hora a temperatura ambiente. Para a detecção de fibronectina e laminina, as membranas foram incubadas com anticorpos policlonais IgG de coelho anti-fibronectina (1:20.000) ou anti-laminina (1:5.000) por 12 horas a 4°C. Após lavagem com TBS, seguiu-se a incubação das membranas com anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado à peroxidase (1:2.000) por 1 hora a temperatura ambiente. Após as lavagens com TBS, as imunodeteções foram realizadas pelo método de quimioluminescência (ECL). Os reagentes foram incubados durante 1 minuto sobre a nitrocelulose e a película Hyperfilm foi revelada após a emissão de quimioluminescência, de acordo com as instruções do fabricante. Os filmes foram

fotografados e as bandas proteicas imunorreativas foram analisadas por densitometria através da utilização do programa de computador Scion Image (Scion Corporation).

3.3.13 - Reação em cadeia da polimerase semi-quantitativa por transcriptase reversa (RT-PCR)

Após o tratamento das culturas astrocíticas e/ou confluência das células, os frascos de cultura foram lavados com PBS e a extração do RNA total foi realizada com TRIZOL[®]. Para a extração do RNA de cerebelo dos animais neonatos, as estruturas foram dissecadas e as meninges foram retiradas. Alíquotas de 50 mg de cada estrutura foram separadas e congeladas em nitrogênio líquido. As amostras congeladas foram trituradas com auxílio de bastão de vidro e para a extração do RNA foi adicionado o reagente TRIZOL[®]. Para a reação da transcriptase reversa (RT), o DNA complementar (cDNA) foi sintetizado com o uso de 5 µg de RNA total em um volume final de 20 µl de uma mistura contendo enzima transcriptase reversa, iniciador oligo-dT (0,5 mg/ml), DTT (0,1 M), inibidor de RNAase (40 U/µl), nucleotídeos (dNTP 10mM) e MgCl₂ (50 mM), em termociclador, por 1 hora a 40°C. A amplificação dos cDNA de interesse foi realizada com a utilização de iniciadores específicos (Tabela 1) e do *kit* Master Mix. Para as reações de PCR semi-quantitativa, foram realizadas diluições seriadas das amostras (1:2, 1:5, 1:10, 1:20 e 1:50) em água ultra-pura e todas as amostras foram normalizadas pela realização de PCR semi-quantitativa para a enzima gliceraldeído fosfato desidrogenase (GAPDH) simultaneamente à PCR do iniciador de interesse. Os produtos das PCRs foram visualizados em gel de agarose (2 %) e coloração com brometo de etídeo (1:1000) em água ultra-pura. As bandas correspondentes aos produtos foram submetidas à análise por densitometria e os valores calculados com auxílio do programa de computador Scion Image[®].

Tabela 1 – Sequência de oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a detecção dos RNAs mensageiros por RT-PCR.

Iniciador	Sequência	Nº de ciclos	Anelamento (T em °C)
GAPDH	Sense: TAA AGG GCA TCC TGG GCT ACA CT Anti-sense: TTA CTC CTT GGA GGC CAT GTA GG	40	57
GLAST	Sense: ATG CCT TTG TGC TACT CA CC Anti-sense: GTG TTT CGT TGG CCT GGA TG	38	55
GLT-1	Sense: CTC ACT GAC TGT GTT TGG TG Anti-sense: GAG GTG CCA CCA GAA CTT TC	45	54
Sindecana-1	Sense: GAC AAC TTC TCT GGC TCA GG Anti-sense: CTT CGT CCT TCT TCT TCA TCC	36	54
Sindecana-2	Sense: GAC TAT TCT TCT TCT GCC TCT GGC Anti-sense: GGT TTG CGT TCT CCA AGG TC	32	57
Sindecana-3	SENSE: AGT ACC CTC ACC ACC CAC TA Anti-sense: TAG ATG AGC AAC GTG ACC AG	36	54
Sindecana-4	Sense: GTC ATA GAC CCC CAG GAC C Anti-sense: CCC TTT TGG GAA TGA CCT C	30	55

3.3.14 – Análise da área de distribuição de fibronectina e laminina

A análise da área de distribuição de fibronectina e laminina nas culturas astrocíticas foi realizada com a utilização de todas as imagens obtidas após os ensaios de imunofluorescência nos astrócitos normais e hipotireoídeos e nos astrócitos hipotireoídeos tratados com T₃. A partir das imagens coloridas obtidas da imunofluorescência, descartou-se a coloração com auxílio do programa de computador Adobe Photoshop CS®. As cores preto e branco foram invertidas e os pixels pretos considerados equivalentes aos pontos de marcação das moléculas de MEC. A quantificação dos pixels com auxílio do programa de computador Image J® corresponde às áreas cobertas por fibronectina e laminina. Os resultados foram

divididos pelo número total de pixels por imagem e representados como “porcentagem de distribuição de MEC por campo” (ALCHINI, 2007).

3.3.15 – Avaliação da influência do microambiente de astrócitos hipotireoideos tratados com T₃ no desenvolvimento neuronal

Para analisar os efeitos dos contatos célula-célula ou célula-MEC no desenvolvimento neuronal, culturas confluentes de astrócitos hipotireoideos foram tratadas com 0,5, 1 ou 10 nM de T₃, conforme descrito no item 3.3.4. No quinto dia de tratamento com T₃ o meio condicionado foi removido e substituído por meio de cultura fresco e a seguir neurônios provenientes de animais hipotireoideos (1,5 x 10⁵ células) foram plaqueados sobre estas monocamadas astrocitárias. As co-culturas foram mantidas por 24 horas em estufa úmida a 37°C com 5% de CO₂, fixadas e analisadas por imunocitoquímica para β-tubulina III, conforme descrito no item 3.3.7.

3.3.16 – Análise dos efeitos do meio condicionado de astrócitos hipotireoideos tratados com T₃ no desenvolvimento neuronal

Para verificar os efeitos diretos dos fatores de crescimento de astrócitos no desenvolvimento neuronal, astrócitos hipotireoideos foram cultivados conforme descrito acima e, após a confluência foram tratados com 0,5, 1, 5 e 10 nM, conforme item 3.3.4. Foram realizadas então culturas primárias de neurônios cerebelares provenientes de animais hipotireoideos que foram cultivadas na presença do meio condicionado dos astrócitos tratados com T₃. Após 24 horas de cultura, os neurônios foram fixados e submetidos à imunocitoquímica para β-tubulina III, conforme descrito no item 3.3.7.

3.3.17 - Análise estatística

A análise estatística foi realizada com a utilização do software GraphPad Prism 4[®]. Foi empregada a análise de variância de uma via (ANOVA), comparando-se as médias de cada grupo tratado em relação às médias de um grupo controle, seguida pelo teste de Newmann-Keuls, o qual compara todos os grupos entre si. Quando diferentes experimentos foram considerados como pertencentes ao mesmo grupo amostral, os resultados foram submetidos ao teste do Chi-quadrado de Pearson, com 95% de significância, analisando desta forma, a relação entre duas variáveis, como por exemplo, presença e tamanho de neuritos.

4 – RESULTADOS

4.1 - EFEITOS DO T₃ SOBRE O TRANSPORTE DE GLUTAMATO E SOBREVIDA NEURONAL E ASTROCITÁRIA

4.1.1 - Avaliação dos efeitos do T₃ na captação de glutamato por astrócitos cerebelares

Os astrócitos são os principais responsáveis pela retirada do glutamato dos espaços extracelulares (DANBOLT, 2001). Para determinar o efeito do T₃ sobre a atividade dos transportadores glutamatérgicos astrocitários, foi avaliada a captação de L-[³H]glutamato (25 – 200 μM) por astrócitos tratados ou não com T₃. Nas culturas tratadas com T₃ foi observado um aumento significativo na captação de glutamato a partir de 25 μM quando comparadas às células controle. Além disso, na concentração de glutamato de 100 μM o aumento da captação foi de 115% e a saturação observada entre 100 e 200 μM de glutamato (dados não mostrados). A análise cinética demonstrou que a velocidade máxima (V_{max}) da reação de captação de glutamato por astrócitos tratados com T₃ foi maior, porém com constante de Michaelis-Mendel (K_M) similar à observada astrócitos controle (V_{max} = 6.54 ± 1.08 e 2.65 ± 0.96 nmol/mg protein/min; K_M = 39.06 ± 5,9 e 36.53 ± 4,8 μM, respectivamente) (Figura 10).

A adição de 50 μM de L-PDC, um potente inibidor do transporte glutamatérgico com baixa afinidade para receptores de glutamato (BRIDGES *et al.*, 1999), reduziu nas mesmas proporções a captação de glutamato, tanto nos astrócitos tratados com T₃ (82.4% ± 6.3 de inibição) como nos controles (86.9 % ± 4.6 de inibição). Da mesma forma, o tratamento com DL-TBOA (50 μM), considerado bloqueador de transportadores glutamatérgicos (ANDERSON *et al.*, 2001), apresentou valores

similares de inibição da captação de glutamato, tanto nas culturas tratadas com T₃ como nas culturas não tratadas (84,63 % ± 6,4 e 87,0 % ± 8,9, respectivamente) (Figura 10, inserto). Estes resultados demonstram que o tratamento com T₃ aumenta significativamente a atividade de transporte de glutamato de maneira dependente da concentração utilizada, sem alteração nas propriedades de afinidade dos transportadores, sugerindo que este efeito poderia ser acompanhado por um aumento no nível de expressão proteica dos transportadores de glutamato.

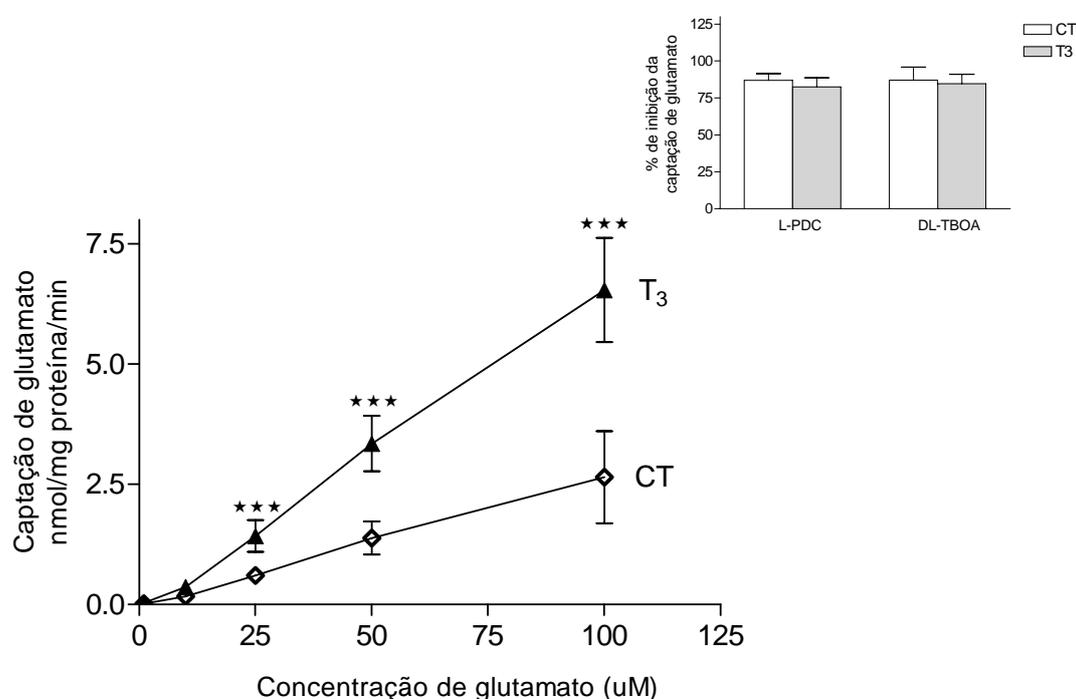


Figura 10 – Efeitos do T₃ na captação de L-[³H]glutamato dependente de Na⁺ em astrócitos cerebelares. As células foram tratadas com T₃ (50 nM) ou mantidas em condições controle (DMEM/F12 sem SBF) e incubadas com glutamato (1 a 100 μM) por 7 minutos. Os dados são expressos como nmol/mg proteína/min de captação de L-[³H]glutamato. Os resultados representam as médias ± erro padrão de três experimentos independentes realizados em duplicata. ***p < 0.001 em relação ao controle na mesma concentração de glutamato por ANOVA de uma via seguido do teste de Newman-Keuls's. Inseto: L-PDC ou DL-TBOA (50 μM) reduziram a captação de glutamato em mais de 80% tanto por astrócitos controle como por astrócitos tratados com T₃.

4.1.2 - Análise da expressão de GLAST e GLT-1 por astrócitos cerebelares após o tratamento com T₃

A análise imunocitoquímica de GLAST e GLT-1 demonstrou que estas proteínas estão distribuídas homogeneamente nos astrócitos, tanto nos controles como nas células tratadas com T₃ (Figura 11). Entretanto, a análise das fotografias sugeriu um possível aumento na intensidade de fluorescência de GLAST e GLT-1 nos astrócitos tratados com T₃, apesar de a microscopia de fluorescência simples não comprovar a localização destes transportadores na membrana celular e nem aumento na expressão destas proteínas. Desta forma, verificamos por RT-PCR que T₃ induziu um aumento nos níveis de RNA mensageiro tanto de GLAST como de GLT-1 em 95% e 49%, respectivamente, em relação aos controles (Figura 12). Além disto, a avaliação da expressão proteica, realizada por imunodeteção demonstrou aumento também nos níveis proteicos dos transportadores, de 86 % e 31 %, respectivamente, em relação aos astrócitos controle (Figura 13).

Para verificar possíveis efeitos diretos do T₃ na transcrição de GLAST, realizamos o tratamento de astrócitos cerebelares com T₃ (50 nM) por 3 horas, ao invés do tratamento convencional por 5 dias. O ensaio de RT-PCR demonstrou um aumento de 6 % (\pm 1,5 %, n = 3) nos níveis de RNA mensageiro para GLAST (dados não mostrados), não significativo para este ensaio, demonstrando que o T₃ não atua diretamente na transcrição dos transportadores glutamatérgicos, o que pode ocorrer possivelmente, via fatores de crescimento secretados pelos astrócitos sob estímulo deste hormônio. Contudo, nossos resultados demonstram um importante papel do T₃ na modulação da atividade e da expressão dos transportadores de glutamato no cerebelo.

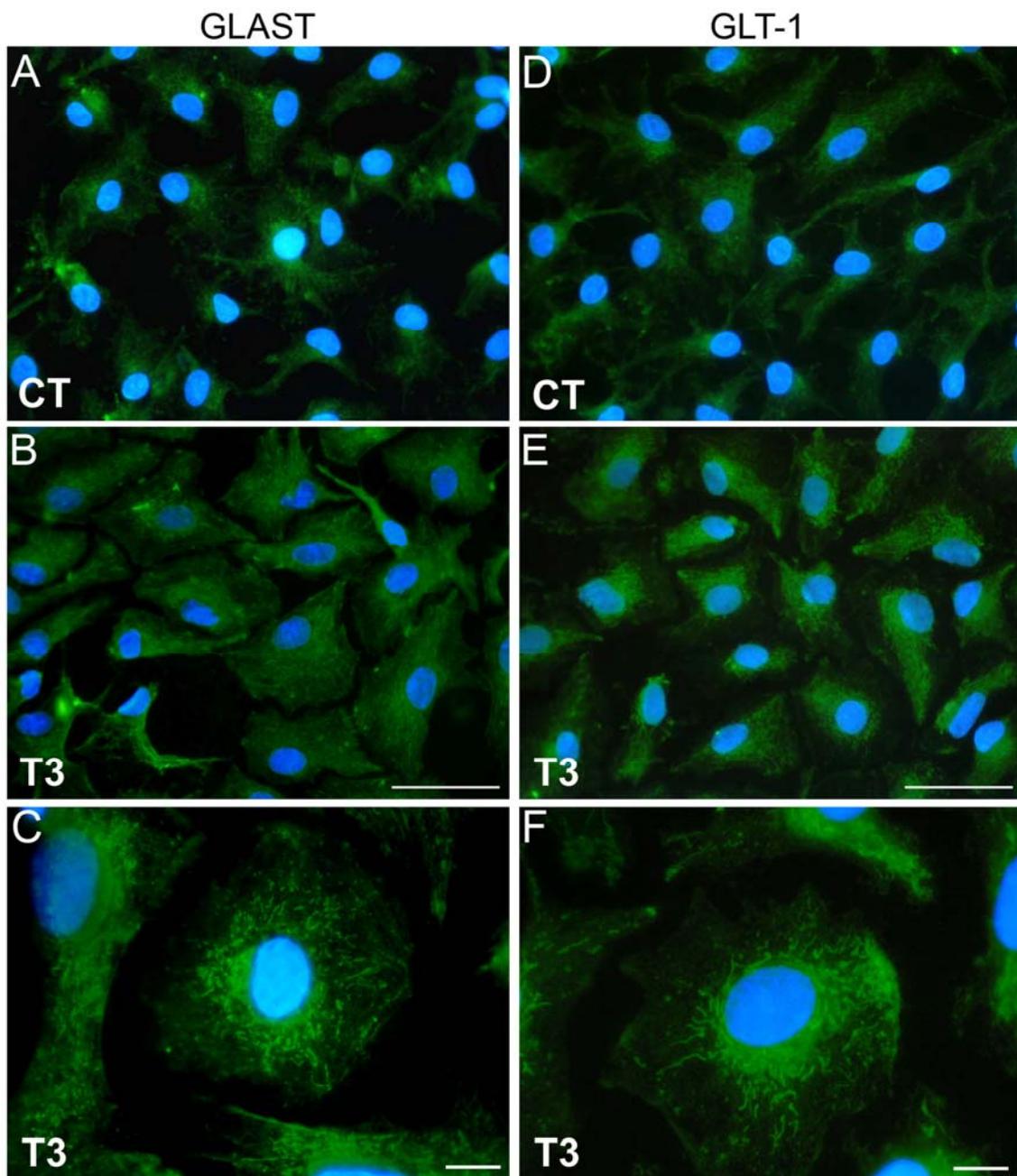


Figura 11 – Distribuição de GLAST e GLT-1 em astrócitos controle e tratados com T₃. Imunofluorescência para GLAST (A, B, C) e GLT-1 (D, E, F), demonstrando a distribuição destes transportadores em astrócitos controle (A, D) e tratados com 50 nM de T₃ (B, C, E, F). Os núcleos foram corados com Hoescht. Fotografias digitais representativas de três experimentos independentes. Barras = 50 µm (A, B, D, E) e 10 µm (C, F).

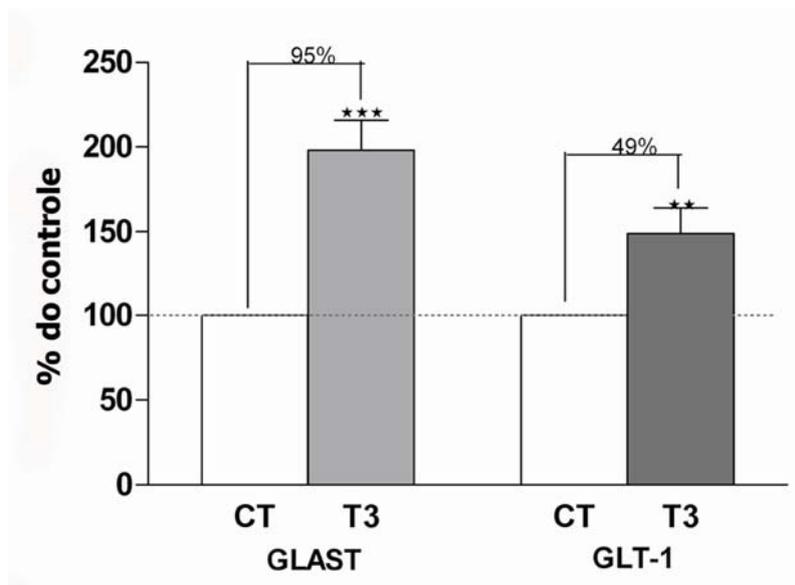


Figura 12 – Efeitos do T₃ na expressão de RNA mensageiro para transportadores glutamatérgicos.

As bandas de GLAST, GLT-1 e GAPDH visualizadas no gel de agarose foram analisadas por densitometria e os valores de GLAST e GLT-1 foram normalizados pelos valores de GAPDH. As médias obtidas para astrócitos controle foram consideradas como 100% e os valores para astrócitos tratados com T₃ (50 nM) foram calculados como porcentagem do controle. Os resultados são expressos como médias \pm erro padrão de três experimentos independentes, por ANOVA de uma via seguido do teste de Newmann-Keuls. ***p < 0,001 e ** p < 0,05 em relação aos controles.

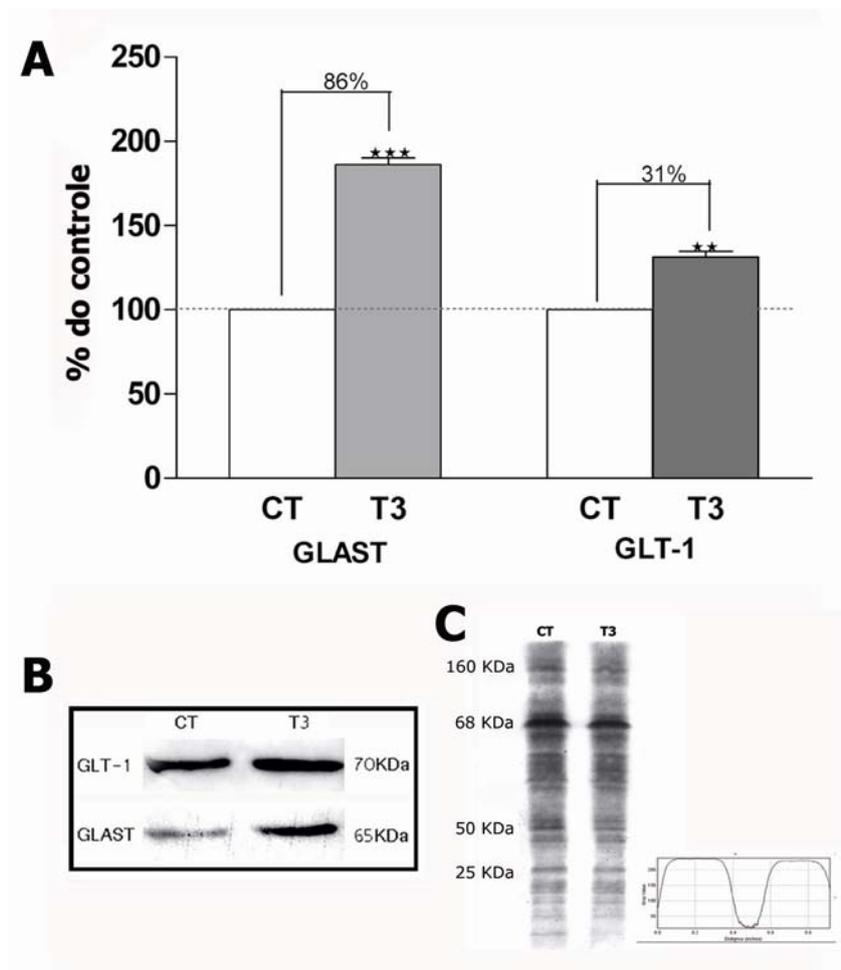


Figura 13 – Análise quantitativa da imunoquantidade de GLAST e GLT-1 por SDS-PAGE. (A) Representação gráfica dos valores obtidos por densitometria de bandas imunorreativas de GLAST e GLT-1 foram analisadas por densitometria e os valores obtidos dos astrócitos controle foram considerados 100 %, enquanto os valores obtidos dos astrócitos tratados com T₃ (50 nM) foram calculados como porcentagem do controle. Os resultados são expressos como médias \pm erro padrão de três experimentos independentes, por ANOVA de uma via seguido do teste de Newmann-Keuls. ***p < 0,001 e ** p < 0,05. (B) Fotografia representativa de *Western blot* para GLAST e GLT-1 em astrócitos controle e tratados com T₃. (C) A banda de 68 KDa corada na membrana de nitrocelulose foi analisada por densitometria em todas as amostras, para confirmar a normalização da quantidade de proteína aplicada no gel em todos os experimentos.

4.1.3 - Efeitos do T₃ na proteção a astrócitos cerebelares contra a toxicidade induzida por glutamato

Analisamos a seguir o efeito do tratamento com T₃ na proteção de astrócitos cerebelares. Para isto, culturas de astrócitos tratadas ou não com T₃ receberam glutamato nas concentrações de 1 mM ou 10 mM. O ensaio de MTT demonstrou que glutamato na concentração de 10 mM reduziu significativamente a viabilidade dos astrócitos controle. Entretanto, astrócitos tratados com T₃ permaneceram viáveis. Glutamato na concentração de 1 mM não alterou a viabilidade dos astrócitos, tanto no controle como nas células tratadas com T₃ (Figura 14).

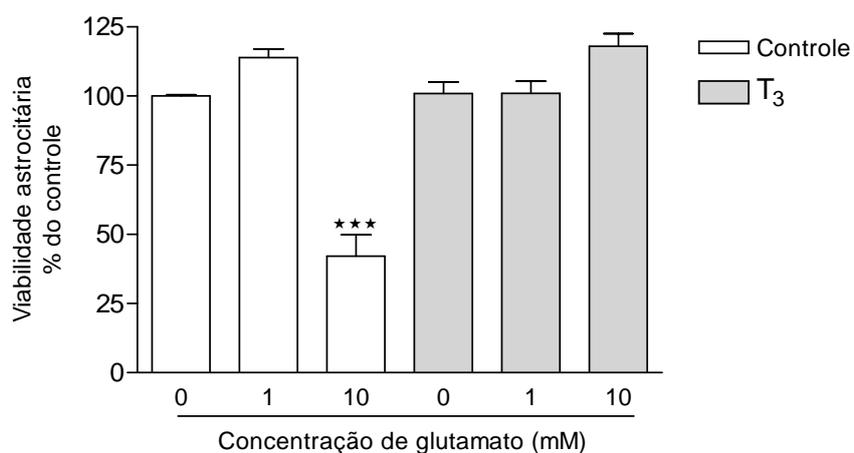


Figura 14 – Efeitos do T₃ na viabilidade de astrócitos após insulto por glutamato. Astrócitos controle e tratados com T₃ (50 nM) foram incubados por 24 horas com 1 ou 10 mM de glutamato e a viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT, conforme Materiais e Métodos. Os resultados são expressos como porcentagem do controle e representam as médias \pm erro padrão de três experimentos independentes realizados em quadruplicata, por ANOVA de uma via seguido do teste de Newmann-Keuls. ***p < 0,001.

Para analisar a mortalidade celular, culturas de astrócitos tratadas ou não com T_3 foram incubadas com SYTOX Green, corante fluorescente que penetra apenas em células com membrana plasmática comprometida. Observamos que o tratamento com 10 mM de glutamato induziu uma perda significativa de astrócitos nas culturas controle, enquanto que nos astrócitos tratados com T_3 não se observou morte celular significativa (Figura 15), demonstrando que o tratamento com T_3 aumenta a resistência dos astrócitos à toxicidade do glutamato, aumentando com isso sua sobrevivência. Estes resultados estão de acordo com nossos dados anteriores, de que o T_3 enriquece o microambiente para os astrócitos e conseqüentemente para os neurônios (TRENTIN *et al.*, 2003).

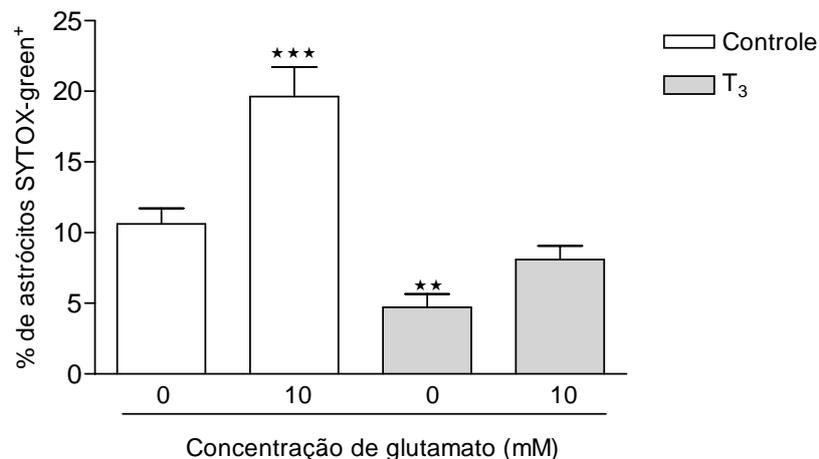


Figura 15 - Efeitos do T_3 na mortalidade de astrócitos após insulto por glutamato. Astrócitos controle ou tratados com T_3 (50 nM) foram incubados por 24 horas com glutamato (10 mM) e a morte celular foi avaliada por incorporação de SYTOX Green em relação ao número total de células. As células SYTOX Green⁺ foram contadas em pelo menos oito campos randômicos por condição de cultura de três experimentos independentes realizados em duplicatas, por ANOVA de uma via seguido do teste de Newmann-Keuls. ***p < 0,001, **p < 0,05.

4.1.4 - Efeitos do T₃ na proteção a neurônios contra a toxicidade induzida por glutamato

Para verificar se astrócitos tratados com T₃ poderiam promover neuroproteção contra a toxicidade por glutamato, neurônios cerebelares de ratos neonatos foram cultivados sobre monocamadas astrocitárias tratadas ou não com 50 nM de T₃ e submetidos a um insulto com glutamato (50, 100 ou 200 μM) (Figura 16). Observamos que neurônios cultivados sobre monocamadas de astrócitos tratados com T₃ permaneceram viáveis em uma maior proporção após a adição de glutamato do que os cultivados sobre monocamadas astrocitárias controle. Entretanto, a viabilidade neuronal foi progressivamente reduzida de acordo com o aumento da concentração do glutamato, embora mesmo na mais alta concentração de glutamato (200 μM) o número de neurônios sobre astrócitos tratados com T₃ tenha sido duas vezes maior do que o observado nas culturas controle (Figura 17). Nossos resultados demonstram pela primeira vez o papel do hormônio da tireóide como promotor de um efeito neuroprotetor contra a excitotoxicidade por glutamato, mediado pelos astrócitos cerebelares.

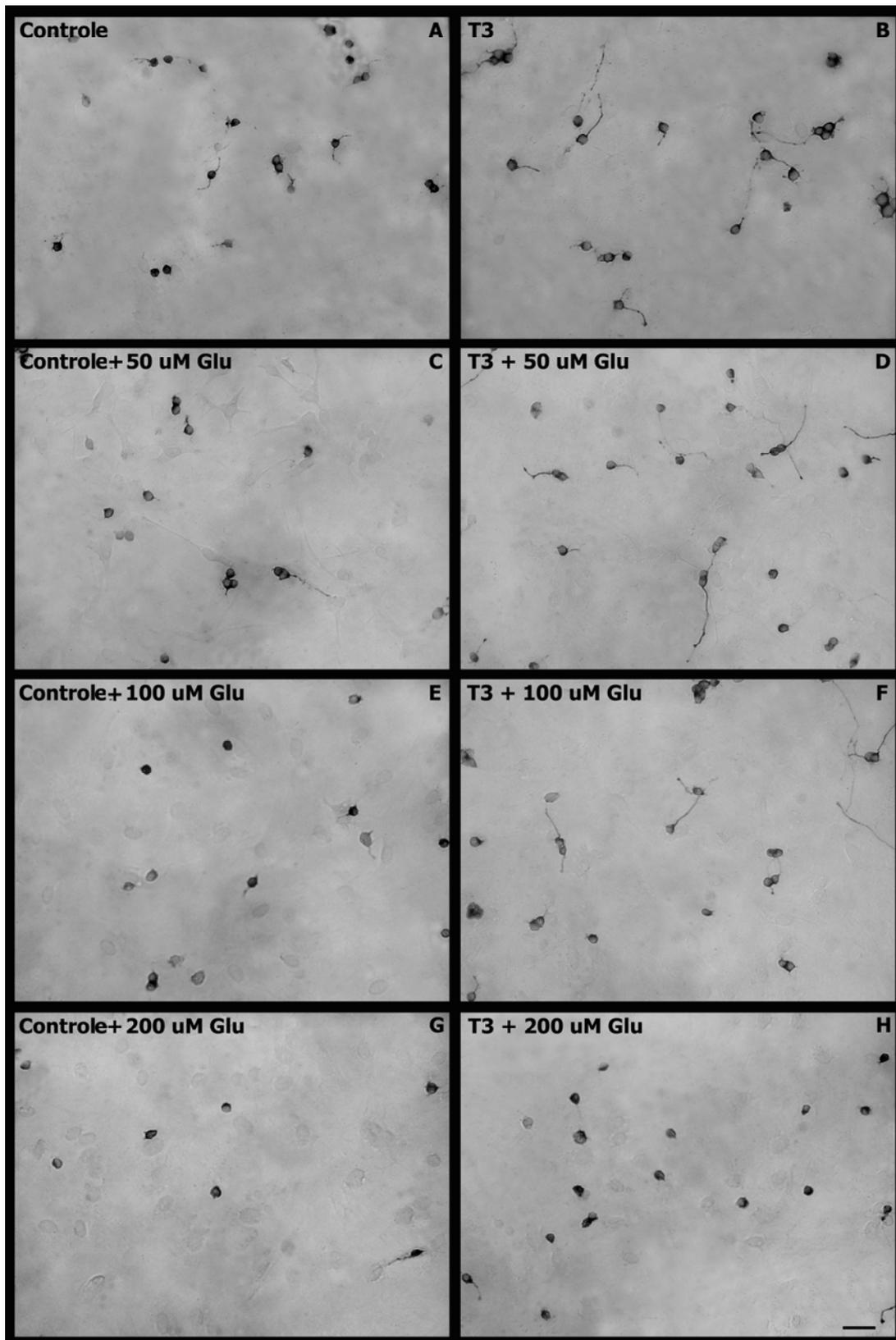


Figura 16 – Astrócitos tratados com T_3 promovem sobrevivência neuronal após insulto excitotóxico induzido por glutamato. Glutamato (50, 100 ou 200 μM) foi adicionado 3 horas após o plaqueamento dos neurônios sobre os astrócitos controle (A, B e C) ou tratados com 50 nM de T_3 (D, E e F). As coculturas foram mantidas por 24 horas e os neurônios foram identificados por imunocitoquímica para β -tubulina III, conforme Materiais e Métodos. Barra = 50 μm .

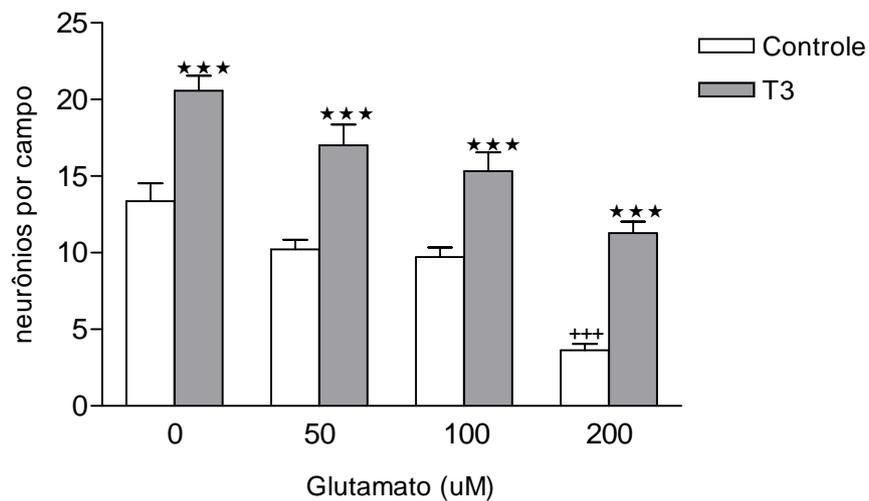


Figura 17 – Representação gráfica do número de neurônios nas co-culturas controle ou tratadas com T₃, após insulto excitotóxico induzido por glutamato. Glutamato (50, 100 ou 200 μM) foi adicionado 3 horas após o plaqueamento dos neurônios sobre os astrócitos controle ou tratados com 50 nM de T₃. O número de neurônios foi avaliado por contagem de pelo menos oito campos em cada condição de cultura. Os resultados são expressos como médias ± erro padrão de três experimentos independentes realizados em duplicatas, por ANOVA de uma via seguido do teste de Newmann-Keuls. ***p < 0,001 vs. o controle respectivo, em cada concentração de glutamato. +++p < 0,001 vs. todos os outros controles.

4.2 – HORMÔNIO DA TIREÓIDE E EXPRESSÃO DE SINDECANAS

4.2.1 - Análise da expressão de sindecanas em astrócitos de diferentes estruturas de cérebro e em cerebelos de ratos neonatos normais e hipotireoideos

Em trabalhos anteriores demonstramos que o hormônio da tireóide modula a expressão de proteínas de MEC, efeito que é mediado por FGF₂ (TRENTIN *et al.*, 2003). Por outro lado, é bastante descrito o papel de proteoglicanos de heparan sulfato como co-receptores e atuando como moléculas reguladoras deste fator. Com o objetivo de verificar se as sindecanas estariam diferencialmente expressas em distintas regiões do cérebro, foram realizados ensaios de RT-PCR de culturas de astrócitos de cerebelos, de córtex cerebrais e de hipocampos provenientes de ratos neonatos normais. Nossos resultados demonstraram que tanto em astrócitos cerebelares quanto de córtex cerebrais, foi detectada a presença de RNA mensageiro para todas as sindecanas (1-4). Entretanto, em astrócitos hipocampais foram detectados apenas RNA mensageiro para sindecanas 2 e 4 (Figura 18).

Por outro lado, para analisar a influência do hormônio da tireóide na expressão de sindecanas 2 e 3 em astrócitos cerebelares de ratos normais, estas células foram tratadas ou não com T₃ (50 nM) e submetidas ao ensaio de RT-PCR semi-quantitativa. Verificamos que o tratamento de T₃ promoveu a redução dos níveis de RNA mensageiro para sindecanas 2 e 3, respectivamente em 55 % e 90 %, em comparação aos astrócitos não tratados (Figura 19).

Visto que o T₃ regula a expressão das sindecanas em culturas de astrócitos cerebelares, investigamos possíveis diferenças na expressão destas moléculas em cerebelos provenientes de ratos hipotireoideos e comparado a cerebelos de animais normais. A análise semi-quantitativa de RNA mensageiro demonstrou redução na

expressão de sindecanas 1 (88%), 2 (50%) e 4 (55 %) e aumento na expressão de RNA mensageiro para sindecana 3 (80 %) (Figura 20).

Estes resultados demonstram um papel regulador do hormônio da tireóide também na expressão destes PGHS e sugerem um possível efeito compensatório da super-expressão ou da sub-expressão de outras sindecanas não analisadas neste trabalho.

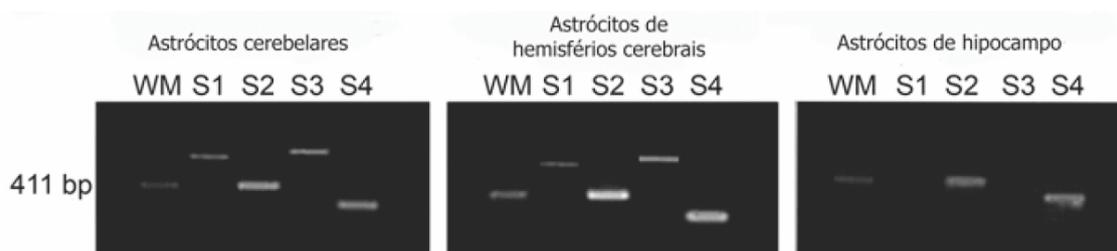


Figura 18 - Expressão das sindecanas 1-4 em culturas de astrócitos de diferentes regiões cerebrais. Fotografias representativas de produtos de RNA mensageiro em gel de agarose, demonstrando a expressão de genes para as sindecanas 1-4 por RT-PCR em astrócitos de cerebelos, hemisférios cerebrais e hipocampus de ratos neonatos. WM: marcador de peso molecular; S1: sindecana 1; S2: sindecana 2, S3: sindecana 3, S4: sindecana 4.

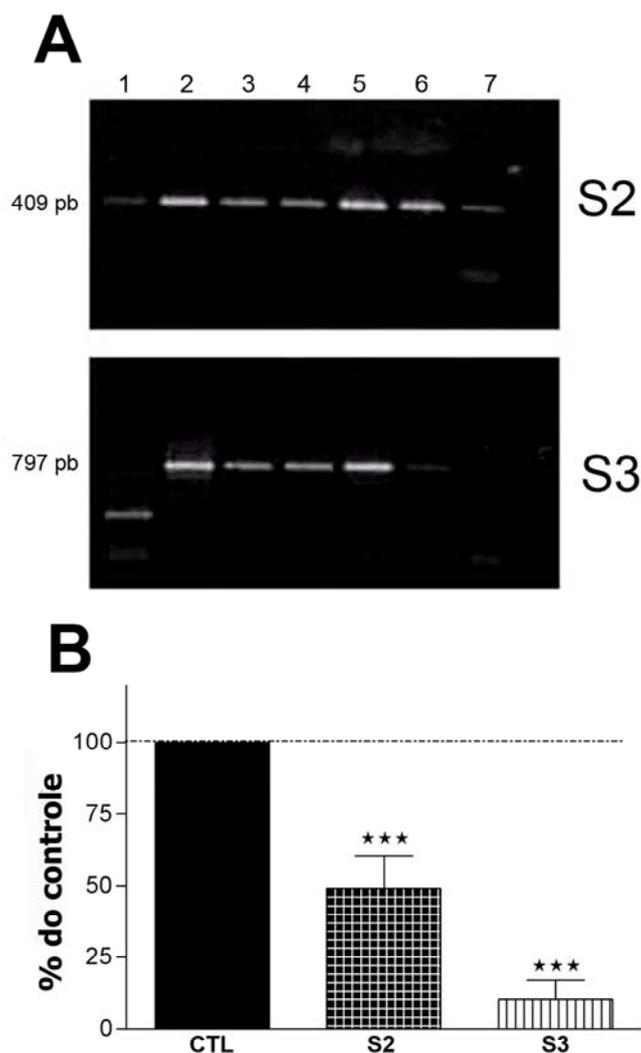


Figura 19 – Efeitos do T_3 na expressão das sindecanas 2 e 3 em astrócitos cerebelares. (A) Fotografias representativas da expressão dos genes das sindecanas 2 e 3 em culturas de astrócitos cerebelares tratados com T_3 (50 nM). (B) Representação gráfica da expressão de RNA mensageiro para as sindecanas 2 e 3 por RT-PCR semi-quantitativa. As bandas das sindecanas foram analisadas por densitometria e os valores das sindecanas foram normalizados pelos valores obtidos para GAPDH. As médias obtidas para células controle foram consideradas como 100% (CTL) e os valores para astrócitos tratados com T_3 foram calculados como porcentagem do controle. Os resultados são expressos como médias \pm erro padrão de três experimentos independentes, por ANOVA de uma via de seguido do teste de Newmann-Keuls. *** $p < 0,001$.

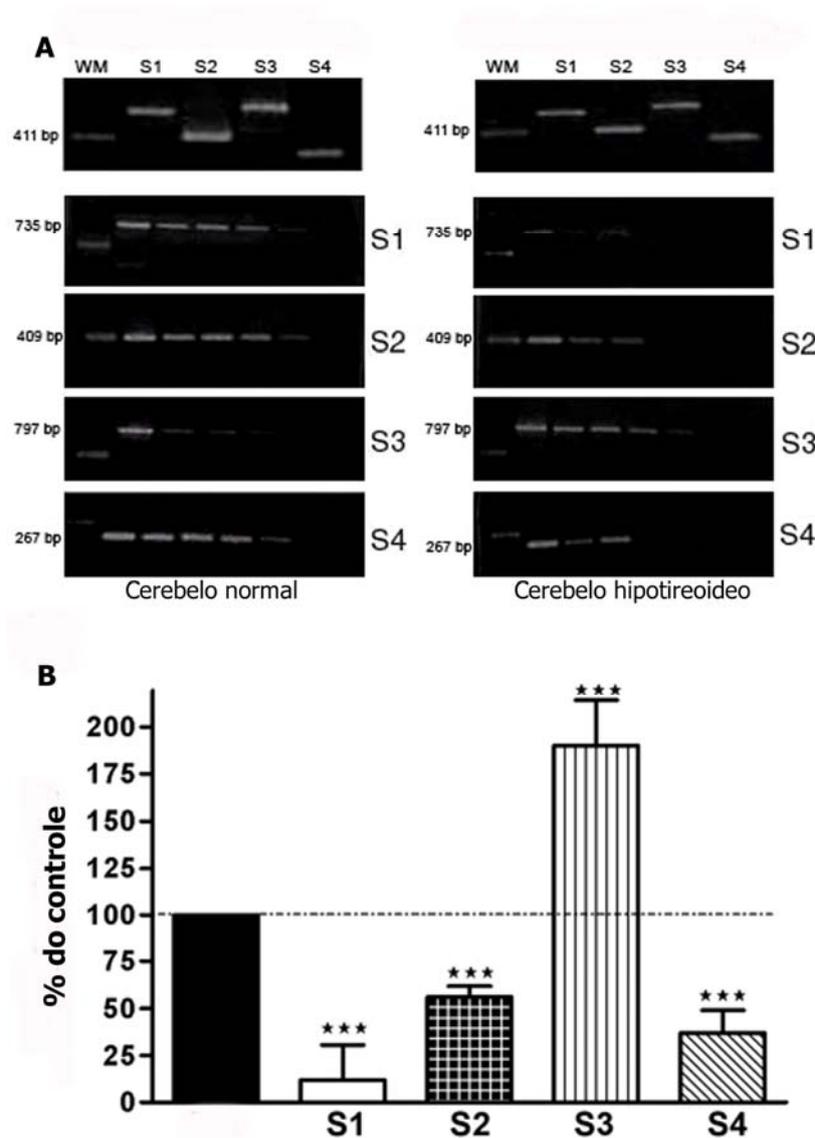


Figura 20 – Expressão das sindecanas 1-4 em cerebelos de ratos neonatos normais e hipotireoideos. (A) Fotografias representativas da expressão dos genes das sindecanas 1-4 nos cerebelos de ratos neonatos. (B) Representação gráfica da análise da expressão de RNA mensageiro para as sindecanas 1-4 por RT-PCR semi-quantitativa. As bandas das sindecanas e GAPDH, visualizadas no gel de agarose, foram analisadas por densitometria e os valores das sindecanas foram normalizados pelos valores de GAPDH. As médias obtidas para cerebelos normais foram consideradas como 100% e os valores para cerebelos hipotireoideos foram calculados como porcentagem do controle. Os resultados são expressos como médias \pm erro padrão de três experimentos independentes, por ANOVA de uma via de seguimento do teste de Newmann-Keuls. *** $p < 0,001$.

5 – DISCUSSÃO

5.1 – EFEITOS DO T₃ NO TRANSPORTE ASTROCITÁRIO DE GLUTAMATO E NA NEUROPROTEÇÃO

O hormônio da tireóide, T₃, pode regular diversos aspectos da diferenciação astrocitária, incluindo produção e secreção de moléculas de MEC e fatores de crescimento. Os processos de maturação em astrócitos estão implicados diretamente no desenvolvimento neuronal, que dependem da manutenção correta do microambiente e também dos contatos diretos com a glia. Os efeitos do T₃ nestas interações são bem documentados, entretanto, os aspectos moleculares ainda não são totalmente esclarecidos. Neste trabalho, demonstramos pela primeira vez o papel do T₃ na regulação da captação de glutamato em culturas de astrócitos cerebelares de ratos recém-nascidos. No SNC, a captação de glutamato é um processo mediado principalmente pelos transportadores deste aminoácido expressos em astrócitos, GLAST e GLT-1. Este mecanismo é essencial para manter os níveis extracelulares deste neurotransmissor em concentrações abaixo dos níveis neurotóxicos, modulando a transmissão glutamatérgica e evitando a excessiva ativação dos receptores de glutamato em neurônios, a qual parece estar diretamente relacionada a diversas doenças neurodegenerativas (ROTHSTEIN *et al.*, 1996; TANAKA *et al.*, 1997; MELDRUM, 2000; DANBOLT, 2001). No presente estudo, observamos em astrócitos cerebelares aumento de mais de 100% na captação de glutamato após o tratamento com 50 nM de T₃, sem alteração do K_M da reação (Figura 10), demonstrando que a afinidade dos transportadores por seu substrato não foi alterada com o tratamento.

O transporte astrocitário de glutamato, além de manter os níveis extracelulares do neurotransmissor em concentrações fisiológicas, também é necessário para a produção de energia destas células e para a síntese de glutathione (GSH), um tripeptídeo com funções antioxidantes essenciais para o SNC (DANBOLT, 2001). Outros estudos demonstraram que o tratamento de astrócitos com L-PDC (250 μ M), um inibidor que se liga ao transportador e promove a liberação de glutamato para o meio extracelular, diminuiu os níveis intracelulares de GSH e aumentou nos níveis de espécies reativas de oxigênio. Estes resultados demonstram que o glutamato, assim como a cisteína, é um fator limitante para a síntese de GSH. Além disto, o tratamento com DL-TBOA (250 μ M), bloqueador dos transportadores astrocitários de glutamato, assim como o L-PDC, resultou em aumento dos níveis extracelulares de glutamato (RE *et al.*, 2003). Em nossos experimentos, a adição de L-PDC e DL-TBOA (50 μ M) (Figura 10), aboliu quase que completamente a captação do glutamato tanto pelos astrócitos tratados com T₃ como pelos astrócitos controle, demonstrando que o tratamento com T₃ não alterou os sítios de interação com glutamato dos transportadores astrocitários. Resultados similares foram observados em culturas de astrócitos corticais, onde L-PDC e DL-TBOA (250 μ M) inibiram em mais de 80 % a captação de glutamato (ANDERSON *et al.*, 2001). Entretanto, segundo Re e colaboradores (2003) sugeriram que o tratamento com L-PDC pode ter um efeito tóxico nos astrócitos, provavelmente causado pela depleção de GSH. Estes autores demonstraram que o tratamento com 250 μ M de L-PDC durante 6 dias promoveu morte astrocitária. Em nosso estudo a concentração dos inibidores utilizada foi de 50 μ M, incubados por apenas 15 minutos antes do experimento de captação. Após dosagem proteica, a quantidade de proteína nas placas foi similar entre as culturas controle e as tratadas com T₃. Desta forma, é provável que os inibidores de transporte glutamatérgico não tenham efeito tóxico sobre as células.

Além do aumento na captação de glutamato, no presente trabalho demonstramos que o T₃ promoveu aumento nos níveis proteicos e de RNA mensageiro dos transportadores GLAST e GLT-1. É bastante documentado que o hormônio da tireóide pode modular a transcrição de diversos genes. Denver e colaboradores (1999) demonstraram que o tratamento com 30 nM de T₃ por apenas 30 minutos, aumentou os níveis de RNA mensageiro para BTEB (proteína de ligação a elemento de transcrição básico), comprovando que o hormônio da tireóide pode ter efeitos na expressão gênica mesmo em curtos períodos de tratamento. O aumento na expressão de GLAST e GLT-1 em nosso trabalho foi observado após o tratamento com o hormônio por 5 dias. Por outro lado, verificamos que o tratamento com T₃ por apenas 3 horas não foi suficiente para aumentar significativamente os níveis de RNA mensageiro para GLAST (dados não mostrados), sugerindo que os efeitos observados sejam resultado de um efeito indireto do T₃, mediado possivelmente pela ação autócrina de fatores de crescimento. Em trabalhos anteriores realizados por nós e outros autores, foi demonstrado que T₃ induz astrócitos cerebelares a secretar uma combinação de fatores de crescimento, incluindo FGF₂ (TRENTIN *et al.*, 2001) e EGF (GOMES *et al.*, 1999; MARTINEZ; GOMES, 2002), influenciando assim diferentes aspectos da diferenciação astrocitária. Além disto, EGF, FGF₂ e IGF aumentaram a captação de glutamato e a expressão do RNA mensageiro de GLAST em astrócitos de ratos recém-nascidos (SUZUKI *et al.*, 2001) e o tratamento com EGF e TGF α promoveu um aumento nos níveis proteicos de GLAST e de GLT-1 em astrócitos corticais (FIGIEL *et al.*, 2003). A expressão dos transportadores de glutamato pode também ser regulada por outras moléculas. Zelenia e colaboradores (2000) demonstraram que NF- κ B induziu a expressão de GLT-1 em astrócitos imaturos e recentemente foi demonstrado que estrógenos aumentam a expressão de GLAST e GLT-1, em astrócitos mesencefálicos de camundongo

(PAWLAK *et al.*, 2005). Desta maneira, é possível que a regulação da expressão de GLAST e GLT-1 observada em nosso modelo de estudo seja um efeito indireto do T₃, mediado pela secreção de fatores de crescimento como FGF₂ e EGF.

Observamos ainda que a diferença no aumento da expressão de RNA mensageiro e de proteína foi maior para GLAST (95 % e 86 %, respectivamente) do que para GLT-1 (49 % e 31 %, respectivamente) (Figuras 12 e 13). Este resultado pode ser explicado pela regionalização na expressão destes transportadores de glutamato. GLAST é o transportador mais abundante no cerebelo, região objeto de nosso estudo, e GLT-1 é distribuído de maneira regular em várias regiões do cérebro (ANDERSON *et al.*, 2001). Outra explicação poderia ser a expressão diferenciada de GLAST e GLT-1 ao longo do desenvolvimento do SNC. Em cortes histológicos de cérebros de ratos, foi observado que logo após o nascimento, período que corresponde à idade de utilização dos animais para nossas culturas, GLAST é expresso abundantemente no cerebelo e no neocórtex. No cerebelo, a expressão de GLT-1 é muito baixa neste período, aumentando progressivamente a partir da maturação pós-natal (FURUTA *et al.*, 1997).

Classicamente, degeneração e morte de neurônios são consideradas como as conseqüências finais de diversos processos patológicos. Entretanto, como as células astrocíticas são reguladoras do metabolismo e do desenvolvimento neuronal, alterações na função glial são cruciais na progressão de doenças neurodegenerativas. Altas concentrações de glutamato podem ser tóxicas também para os astrócitos. Chen e colaboradores (2000) demonstraram que o tratamento de astrócitos com glutamato (1 – 10 mM) promoveu a morte destas células por estresse oxidativo. Corroborando com estes dados, verificamos que glutamato na concentração de 10 mM reduziu a viabilidade dos astrócitos controle. Entretanto, astrócitos tratados com T₃ foram mais resistentes à toxicidade induzida por glutamato do que os controles (Figuras 14 e 15). Apesar do

exato mecanismo da toxicidade do glutamato em astrócitos ser controverso, a depleção de glutatona por diminuição da captação deste neurotransmissor parece estar envolvida (RE *et al.*, 2006). Além disto, considerando que os transportadores de glutamato também são os principais carreadores de outro aminoácido componente da glutatona, a cisteína (AOYAMA *et al.*, 2006), a modulação da atividade dos transportadores glutamatérgicos é crucial para a síntese de glutatona, manutenção do potencial antioxidante astrocitário e conseqüentemente, sobrevivência astrocitária e neuronal. Já foi reportado que o tratamento de astrócitos com hormônios da tireóide aumenta a biossíntese de glutatona por regulação positiva da enzima glutamato-cisteína-ligase (DASGUPTA *et al.*, 2007). Em nossos experimentos verificamos que o T₃ protegeu os astrócitos cerebelares contra toxicidade por glutamato e promoveu aumento na expressão e na atividade dos transportadores de glutamato. Assim, podemos sugerir que estes efeitos estão relacionados ao aumento nos níveis de glutamato e cisteína intracelulares, ou regulação positiva na síntese de glutatona, ou ambos, resultando em aumento das defesas antioxidantes astrocitárias. Rahaman e colaboradores (2001) observaram efeitos similares em neurônios provenientes de animais hipotireoideos. Nestas células, foi verificado acúmulo aberrante de neurofilamentos, relacionado a marcado estresse oxidativo e significativo decréscimo na enzima glutamato-cisteína-ligase, confirmando a importância do hormônio da tireóide para a síntese da glutatona.

Conforme evidenciado anteriormente, o hormônio da tireóide promoveu a formação de um microambiente adequado à manutenção das funções normais dos astrócitos, o que implicou, por sua vez, em favorecimento do desenvolvimento neuronal (TRENTIN *et al.*, 2003). No presente trabalho, observamos que o T₃ modula a atividade e expressão de GLAST e GLT-1 e aumenta a resistência dos astrócitos à toxicidade por glutamato. Além disto, analisamos também, os efeitos de T₃ mediados pelos astrócitos

na sobrevivência de neurônios após um insulto com glutamato. Corroborando com nossos dados anteriores e com a literatura, observamos um maior número de neurônios sobre as culturas astrocitárias tratadas com T₃, mesmo na presença de concentrações neurotóxicas de glutamato (Figuras 16 e 17). Isto indica que o T₃, além de conferir resistência aos astrócitos contra o insulto glutamatérgico, aumenta a viabilidade neuronal.

Recentemente foi demonstrado que a administração aguda de T₃ (10, 50 e 100 μM) protege neurônios hipocámpais da toxicidade por glutamato por meio de regulação não genômica, provavelmente por interação direta com receptores NMDA (LOSI *et al.*, 2007). Neste sentido, diversos trabalhos têm mostrado a ação não genômica do T₃, com efeitos rápidos (menos de 1 segundo) e sem envolver a ligação do hormônio aos seus receptores nucleares. Em nossos experimentos, antes da realização das co-culturas, o meio condicionado dos astrócitos foi substituído por meio de cultura fresco e sem SBF, para evitar um possível efeito direto do T₃ residual do meio de cultura sobre os neurônios. Desta forma, podemos sugerir que os efeitos na viabilidade neuronal foram promovidos indiretamente pelo hormônio da tireóide, mediado pelos astrócitos, via aumento da quantidade de transportadores glutamatérgicos, da captação do glutamato e conseqüente redução nos níveis extracelulares de glutamato (Figura 41).

A redução ou perda de expressão e/ou atividade dos transportadores de glutamato pode ser considerada um agente de doenças neurológicas, principalmente as neurodegenerativas (DANBOLT, 2001). Sabendo que o T₃ é responsável pela formação de um microambiente astrocitário adequado ao desenvolvimento e proteção neuronal, neste trabalho demonstramos um novo papel para o hormônio da tireóide: a manutenção de funções astrocitárias normais, como a de modular a concentração de glutamato no

espaço extracelular e promover proteção aos neurônios contra a excitotoxicidade induzida por glutamato.

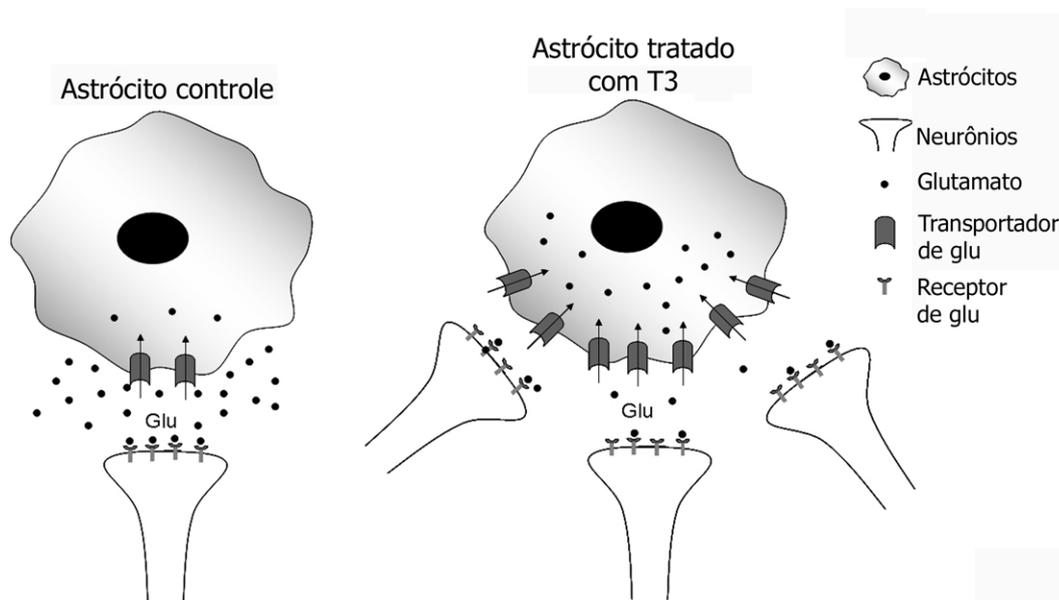


Figura 21 – Modelo da ação do hormônio da tireóide, mediado pelos astrócitos, na neuroproteção contra um insulto excitotóxico induzido por glutamato. T₃ promove aumento na síntese dos transportadores glutamatérgicos GLAST e GLT-1 em astrócitos cerebelares, resultando no aumento da captação de glutamato por estas células e conseqüentemente na sobrevivência neuronal. Glu: glutamato. (Adaptado de MENDES DE AGUIAR *et al.*, 2008, *in press*).

5.2 - EFEITOS DO T₃ NA MATRIZ EXTRACELULAR DE ASTRÓCITOS

5.2.1 - Expressão de sindecanas em astrócitos

As interações célula-MEC são dinâmicas e influenciam importantes eventos do desenvolvimento como adesão, morfologia, migração, proliferação, diferenciação e morte celular (STREULI, 1999). Neste estudo, demonstramos que as sindecanas são expressas de forma heterogênea no cérebro em desenvolvimento e que T₃ afeta diferentemente a expressão destas moléculas em cerebelo de ratos recém-nascidos. Durante o desenvolvimento do SNC de mamíferos, são expressos os quatro tipos de sindecanas, sendo as sindecanas 2 e 3 as principais formas expressas neste sistema (revisado em RAPRAEGER, 2001). Entretanto, a expressão das sindecanas no SNC é frequentemente relacionada a neurônios (RAPRAEGER, 2001; AKITA *et al.*, 2004) e oligodendrócitos (BANSAL *et al.*, 1996; WINKLER *et al.*, 2002). Alguns trabalhos relacionam a presença de sindecanas em astrócitos após injúria do tecido nervoso na gliose reativa (ISEKI *et al.*, 2002; PROPERZI *et al.*, 2008). No presente trabalho, demonstramos que astrócitos de cerebelo e de córtex cerebral em cultura expressam os quatro tipos de sindecanas, enquanto que culturas de astrócitos de hipocampo expressam apenas as sindecanas 2 e 4 (Figura 18). Hsueh e Sheng (1999) demonstraram que a expressão da sindecana 3 em hipocampo é restrita a neurônios na idade adulta, o que pode explicar a ausência desta molécula em astrócitos de hipocampo de ratos recém-nascidos. A sindecana 1 é a forma mais abundante em células epiteliais sendo expressa precocemente no estágio embrionário de 4 células em camundongo, nos locais de contato célula-célula nos estágios embrionários de 16-32 células e em todas as células da massa interna do blastocisto (SUTHERLAND; SANDERSON, 1991). Desta forma, a sindecana-1 está diretamente relacionada nas interações célula-célula durante

os primeiros estágios de desenvolvimento. É possível que a sindecana-1 esteja restrita também aos neurônios hipocámpais de ratos recém-nascidos e por isso não tenha sido detectado nas culturas de astrócitos provenientes desta estrutura, embora não existam trabalhos na literatura para corroborar estes dados.

Observamos, em cerebelos de ratos recém-nascidos, redução das sindecanas 1, 2 e 4 e aumento na expressão da sindecana 3 em cerebelos hipotireoideos, comparados aos normais (Figura 20). Em estudos anteriores, sugerimos que o hipotireoidismo altera a expressão de cerebroglicana, glipicana e sindecana 3 em córtex e mesencéfalos (CALLONI *et al.*, 2001). Estes efeitos podem contribuir com as alterações promovidas por T₃ no cérebro neonatal, já que o papel dos PGs neurais nas interações célula-célula e célula-substrato durante o desenvolvimento neuronal é bem conhecido. Diversos trabalhos têm demonstrado o papel das sindecanas 1, 3 e 4 como co-receptores na sinalização por FGF₂ (KLAGSBRUN; BAIRD, 1991; STEINFELD *et al.*, 1996; FILLA *et al.*, 1998; VOLK *et al.*, 1999; HOROWITZ *et al.*, 2002). A sindecana 2 é importante para mediar a sinalização por FGF₂ em células gliais (FUXE *et al.*, 1994). Entretanto, camundongos modificados geneticamente para que não expressem as sindecanas 1 e 4 são aparentemente normais, férteis e sem defeitos cerebrais (ECHTERMEYER *et al.*, 1999; ALEXANDER *et al.*, 2000). Como nenhuma alteração foi percebida no cérebro dos indivíduos nocaute, é possível que cada tipo de sindecana possa compensar a redução ou o aumento de outra. Deste modo, o aumento na expressão da sindecana 3 em cerebelos hipotireoideos observada em nossos experimentos poderia ser um efeito compensatório da redução das sindecanas 1, 2 e 4. Da mesma forma, a redução na expressão das sindecanas 2 e 3 nas culturas de astrócitos cerebelares tratados com T₃ poderia ser um efeito compensatório do aumento na expressão de outras moléculas não analisadas neste trabalho, considerando que o cérebro contém 25 ou mais PGs

(OOHIRA *et al.*, 1994). Trentin e colaboradores (2001) demonstraram que astrócitos tratados com T₃ secretam uma combinação de fatores de crescimento, mas principalmente o FGF₂, que atuam coordenadamente e autocrinamente aumentam a proliferação destes astrócitos. É conhecido que a sinalização por este fator envolve a molécula de sindecana 3, que promove a dimerização e a apresentação deste fator ao seu receptor tirosina cinase (SCHLESSINGER *et al.*, 1995).

Os efeitos diferenciais de T₃ na expressão das PGs observados neste trabalho podem estar relacionados ao bem descrito papel do hormônio em processos de diferenciação astrocitária e neuronal. Entretanto, é importante lembrar que neste estudo analisamos apenas a expressão da região proteica das sindecanas. É bastante conhecido e discutido que muitos dos efeitos biológicos destas moléculas são atribuídos aos GAGs, cadeias laterais dos PGs formados de açúcares, que são essenciais para as interações moleculares das PGs com a superfície celular ou com outras moléculas de MEC (SCHLESSINGER *et al.*, 1995; DOW; WANG, 1998; SCHWARTZ; DOMOWICZ, 2004).

Neste trabalho analisamos diferentes aspectos do hormônio da tireóide em astrócitos cerebelares e em neurônios. Demonstramos o importante e novo papel do T₃ em astrócitos, mediando o processo de neuroproteção. Astrócitos tratados com T₃ expressam mais transportadores glutamatérgicos e aumentam a captação de glutamato do que os controles, aumentando com isto a sobrevivência dos neurônios cultivados sobre estas monocamadas. Além disto, mostramos como as sindecanas, importantes para a sinalização por FGF₂, são expressas de modo balanceado e compensatório em astrócitos tratados com T₃, hipotireoideos e em cerebelos normais e hipotireoideos. Por fim, demonstramos a importância do microambiente astrocitário normal para o desenvolvimento neuronal. Além disto, demonstramos que o tratamento com T₃

recuperou a MEC de astrócitos hipotireoideos, recuperando também, o desenvolvimento neuronal. Em conjunto nossos resultados demonstram que os efeitos do hormônio da tireóide sobre os astrócitos podem influenciar o desenvolvimento neuronal por diferentes mecanismos que não são exclusivos: matriz extracelular e/ou contatos diretos célula-célula e também fatores de crescimento solúveis.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKITA, K.; TODA, M.; HOSOKI, Y.; INOUE, M.; FUSHIKI, S.; OOHIRA, A.; OKAYAMA, M.; YAMASHINA, I.; NAKADA, H. (2004). Heparan sulphate proteoglycans interact with neurocan and promote neurite outgrowth from cerebellar granule cells. *J Biochem* **383**:129-38.

ALCHINI, R. (2007). Papel do hormônio da tireóide, T₃, na formação de um microambiente para a diferenciação neuronal. *Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina*. 48p.

ALEXANDER, C.M.; REICHSMAN, F.; HINKES, M.T.; LINCECUM, J.; BECKER, K.A.; CUMBERLEDGE, S.; BERNFIELD, M. (2000). Syndecan-1 is required for Wnt-1-induced mammary tumorigenesis in mice. *Nat Genet* **25**: 329-32.

ALVAREZ-SILVA, M., SILVA, L.C.F., BOROJEVIC, R. (1993). Cell membrane-associated proteoglycans mediate extramedullary myeloid proliferation in granulomatous inflammatory reactions to schistosome eggs. *J Cell Sci* **104**:477-484.

ANDERSON, C.M.; BRIDGES, J.R.; CHAMBERLIN, R.A.; SHIMAMOTO, K.; YASUDA-KAMATANI, Y.; SWANSON, R.A. (2001). Differing effects of substrate and non-substrate transport inhibitors on glutamate uptake reversal. *J Neurochem* **79**:1207-1216.

ANDERSON, G.W. (2001). Thyroids hormones and the brain. *Front. Neuroendocrinol.* **22**:1-17.

AOYAMA, K.; SUH, S.W.; HAMBY, A.M.; LIU, J.; CHAN, W.Y.; CHEN, Y.; SWANSON, R.A. (2006). Neuronal glutathione deficiency and age-dependent neurodegeneration in the EAAC1 deficient mouse. *Nat Neurosci* **9**:119-126.

BANSAL, R.; KUMAR, M.; MURRAY, K.; PFEIFFER, S.E. (1996). Developmental and FGF-2-mediated regulation of syndecans (1-4) and glypican in oligodendrocytes. *Mol Cell Neurosci* **7(4)**:276-88.

BARTLETT, A.H.; HAYASHIDA, K.; PARK, P.W. (2007). Molecular and cellular mechanisms of syndecans in tissue injury and inflammation. *Mol Cells* **24(2)**:153-66.

BERNAL, J.; GUADAÑO-FERRAZ, A.; MORTE, B. (2003). Perspectives in the Study of Thyroid Hormone Action on Brain Development and Function. *Thyroid* **13(11)**: 1005-1012.

BERNAL; J. (2005). The significance of thyroid hormone transporters in the brain. *Endocrinol* **146**:1698-1700.

BERRY, M.J.; KIEFFER, J.D.; HARNEY, J.W.; LARSEN, P.R. (1991). Selenocysteine confers the biochemical properties characteristic of the type I iodothyronine deiodinase. *J.Biol.Chem.* **266**:14155-14158.

BIANCO, A.C.; KIM, B.W. (2006). Deiodinases: implications of the local control of thyroid hormone action. *J Clin Invest* **116(10)**:2571-9.

BIOSTRUCTURAL MEDICINE. **Biostructural® Medicine Concept**. Disponível em:< http://www.recoverysa.com/biostructural_medicine_dogs.htm>. Acesso em: 29 mar. 2008.

BRADFORD, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**:248-254.

BRIDGES, R.J.; KAVANAUGH, M.P.; CHAMBERLIN, A.R. (1999). A pharmacological review of competitive inhibitors and substrates of high-affinity, sodium-dependent glutamate transport in the central nervous system. *Curr Pharm Des* **5(5)**:363-79.

CALLONI, G.W.; ALVAREZ-SILVA, M.; VITURI, C.; TRENTIN, A.G. (2001). Thyroid hormone deficiency alters extracellular matrix protein expression in rat brain. *Dev Brain Res* **126**:121-124.

CAREY, D. (1997). Syndecans: multifunctional cell-surface co-receptors. *Biochem J*

327:1-16.

CARLSON, D.J.; STRAIT, K.A.; SCHWARTZ, H.L.; OPPENHEIMER, J.H. (1996). Thyroid hormone receptor isoform content in cultured type 1 and type 2 astrocytes. *Endocrinol* **137** 911-917.

CARMIGNOTO, G. (2000). Reciprocal communication systems between astrocytes and neurones. *Prog Neurobio* **62**:561-581.

CHEN, C.J.; LIAO, S.L.; KUO, J.S. (2000). Gliotoxic action of glutamate on cultured astrocytes. *J Neurochem* **75(4)**:1557-65.

CLEGG, D.O.; WINGERD, K.L.; HIKITA, S.T.; TOLHURST, E.C. (2003). Integrins in the development, function and dysfunction of the nervous system. *Front Biosci May* **8**:d723-50.

CLOS, J.; LEGRAND, C.; LEGRAND, J. (1980). Effects of thyroid state on the formation and early morphological development of Bergmann glia in the developing rat cerebellum. *Dev Neurosci* **3**:199-208.

COLOGNATO, H.; YURCHENCO, P.D. (2000). Form and function: the laminin family of heterotrimers. *Dev Dyn* **218(2)**:213-34.

DANBOLT, C.N. (2001). Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* **65(1)**:1-105.

DARRAS, V.M.; HUME, R.; VISSER, T.J. (1999). Regulation of thyroid hormone metabolism during fetal development. *Mol Cell Endocrinol* **151**:37-47.

DASGUPTA, A.; DAS S.; SARKAR, P.K. (2007). Thyroid hormone promotes glutathione synthesis in astrocytes by up regulation of glutamate cysteine ligase through differential stimulation of its catalytic and modulator subunit mRNAs. *Free Radic Biol Med* **42(5)**:617-26.

DAVIES, A.; BLAKELEY, A.G.H.; KIDD, C. (2002). *Fisiologia Humana*. 1^{ed}. Porto Alegre: ARTMED Editora S.A.

DAVIS, F.B.; MOUSA, S.A.; O'CONNOR, L.; MOHAMED, S.; LIN, H.Y.; CÃO, H.J.; DAVIS, P.J. (2004). Proangiogenic action of thyroid hormone is fibroblast growth factor-dependent and is initiated at the cell surface. *Circ Res* **94(11)**:1500-6.

DECKER, H.; FRANCISCO, S.S.; MENDES DE AGUIAR, C.B.N; ROMÃO, L.F.; BOECK, C.R.; TRENTIN, A.G.; MOURA NETO, V.; TASCA, C.I. (2007). Guanine derivatives modulate extracellular matrix proteins organization and improve neuron-astrocyte co-culture. *J Neurosci Res* **85**:1943-1951.

DENVER, R.J.; OUELLET, L.; FURLING, D.; KOBAYASHI, A.; FUJII-KURIYAMA, Y.; PUYMIRAT, J. (1999). Basic transcription element-binding protein (BTEB) is a thyroid hormone-regulated gene in the developing central nervous system. Evidence for a role in neurite outgrowth. *J Biol Chem* **274(33)**:23128-34.

DOW, K.E.; WANG, W. (1998). Cell biology of astrocyte proteoglycans. *Cell Mol Life Sci* **54**:567-581.

ECHTERMEYER, F.; BACIU P.C.; SAONCELLA, S.; GE, Y.; GOETINCK, P.F. (1999). Syndecan-4 core protein is sufficient for the assembly of focal adhesions and actin stress fibers. *J Cell Sci* **112** :3433-41.

FARINA, C.; ALOISI, F.; MEINL, E. (2007). Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends Immunol* (3):138-45.

FARWELL, A.P.; DUBORD-TOMASETTI, S. (1999). Thyroid hormone regulates the extracellular organization of laminin on astrocytes. *Endocrinol* **140**:5014-5021.

FARWELL, A.P.; TRANTER, M.P.; LEONARD, J.L. (1995). Thyroxine-dependent regulation of integrin-laminin interactions in astrocytes. *Endocrinol* **136**:3909-3915.

FIELDS, R.D.; STEVENS-GRAHAM, B. (2002). Neuroscience - New insights into neuron-glia communication. *Sci* 298:556-562.

FIGIEL, M.; MAUCHER, T.; ROZYCZKA, J.; BAYATTI, N.; ENGELE J. (2003). Regulation of glial glutamate transporter expression by growth factors. *Exp Neurol* 183(1):124-35.

FILLA, M. S.; DAM, P.; RAPRAEGER, A.C. (1998). The cell surface proteoglycan syndecan-1 mediates fibroblast growth factor-2 binding and activity. *J Cell Physiol* **174**:310-21.

FORREST, D.; REH, T.A.; RÜSCH, A. (2002). Neurodevelopmental control by thyroid hormone receptors. *Curr Op Neurobiol* **12**:49-56.

FURUTA, A.; ROTHSTEIN, J.D.; MARTIN, L.J. (1997). Glutamate transporter protein subtypes are expressed differentially during rat CNS development. *J Neurosci* **17**(21):8363-75.

FUXE, K.; CHADI, G.; TINNER, B.; AGNATI, L.F.; PETTERSSON, R.; DAVID, G. (1994). On the regional distribution of heparan sulfate proteoglycan immunoreactivity in the rat brain. *Brain Res* **636**:131-8.

GARCIA-ABREU, J., MOURA NETO, V., CARVALHO, S.L, CAVALCANTE, L.A. (1995). Regionally specific properties of midbrain glia: I. Interactions with midbrain neurons. *J Neurosci Res* 40:471-477.

GARCIA-SEGURA, L.M.; CHOWEN, J.A.; NAFTOLIN, F. (1996). Endocrine glia: roles of glial cells in the brain actions of steroid and thyroid hormones and in the regulation of hormone secretion. *Front Neuroendocrinol* **17**:180-211.

GOMES, F. C.; LIMA, F.R.; TRENTIN, A.G.; MOURA NETO, V. (2001). Thyroid hormone role in nervous system morphogenesis. *Prog Brain Res* **132**:41-50.

GOMES, F.C.A.; MAIA, C.G.; MENEZES, J.R.L. de; MOURA NETO, V. (1999). Cerebellar astrocytes treated by thyroid hormone modulate neuronal proliferation. *Glia* **25**:247-255.

GUILLET, B.A.; VELLY, L.J.; CANOLLE, B.; MASMEJEAN, F.M.; NIEOULLON, A.L.; PISANO, P. (2005). Differential regulation by protein kinases of activity and cell surface expression of glutamate transporters in neuron-enriched cultures. *Neurochem Int* **46**(4):337-46.

HARALSON, M.A.; HASSEL, J.R. (1995). Extracellular Matrix – a practical approach. *Oxford University Press*, New York, U.S.A.. 404p.

HOROWITZ, A.; TKACHENKO, E; SIMONS, M. (2002). Fibroblast growth factor-specific modulation of cellular response by syndecan-4. *J Cell Biol* **157**:715-25.

HSUEH, Y. P.; SHENG, M. (1999). Regulated expression and subcellular localization of syndecan heparan sulfate proteoglycans and the syndecan-binding protein CASK/LIN-2 during rat brain development. *J Neurosci* **19**:7415-25.

INGHAM, Kenneth. **Fibronectin Molecular Interactions**. Disponível em: <<http://www.gwumc.edu/biochem/ingham/>>. Acesso em: 3 abr. 2008.

ISEKI, K.; HAGINO, S.; MORI, T.; ZHANG, Y.; YOKOYA, S.; TAKAKI, H.; TASE, C.; MURAKAWA, M.; WANAKA, A. (2002). Increased syndecan expression by pleiotrophin and FGF receptor-expressing astrocytes in injured brain tissue. *Glia* **39**(1):1-9.

KIMURA-KURODA, J.; NAGATA, I.; NEGISHI-KATO, M.; KURODA, Y. (2002). Thyroid hormone-dependent of mouse cerebellar Purkinje cells in vitro. *Brain Res Dev* **137**(1):55-65.

KLAGSBRUN, M.; BAIRD, A. (1991). A dual receptor system is required for basic fibroblast growth factor activity. *Cell* **67**:2 229-31.

KOIBUCHI, N.; CHIN, W.W. (2000). Thyroid hormone action and brain development. *Trends Endocrinol Metab* **11**(4):123-128.

LAEMMLI, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage t 4. *Nature* **227**:680-685.

LAMING, P.R.; KIMELBERG, H.; ROBINSON, S.; SALM, A.; HAWRYLAK, N.; MÜLLER, C.; ROOTS, B.; NG, K. (2000). Neuronal–glial interactions and behaviour. *Neurosci Biobehav Rev* **24**:3:295-340.

LEBEL, J.M., LHERAULT, S.; DUSSAULT, J.H.; PUYMIRAT, J. (1993). Thyroid-Hormone Up-Regulates Thyroid-Hormone Receptor Beta-Gene Expression in Rat Cerebral Hemisphere Astrocyte Cultures. *Glia* **9**:105-112.

LEONARD, J.L. (2008). Non-genomic actions of thyroid hormone in brain development. *Steroids* **Doi**:10.1016/2007.12.016 .

- LEONARD, J.L.; FARWELL, A.P.; YEN, P.M.; CHIN, W.W.; STULA, M. (1994). Differential Expression of Thyroid-Hormone Receptor Isoforms in Neurons and Astroglial Cells. *Endocrinol* **135**:548-555.
- LIESI, P.; HAGER, G.; DODT, H.U.; SEPPALA, I.; ZIEGLGANSBERGER, W. (1995). Domain-specific antibodies against the B2 chain of laminin inhibit neuronal migration in the neonatal rat cerebellum. *J Neurosci Res* **40** 199-206.
- LIMA, F.R.; GERVAIS, A.; COLIN, C.; IZEMBART, M.; NETO, V.M.; MALLAT, M. (2001). Regulation of microglial development: a novel role for thyroid hormone. *J Neurosci* **21(6)**:2028-38.
- LIPTON, S.A.; ROSENBERG, P.A. (1994). Excitatory amino acids as a final common pathway for neurological disorders. *The New Eng J Med* **330**: 613-622.
- LOPES, C.C.; DIETRICH, C.P.; NADER, H.B. (2006). Specific structural features of syndecans and heparan sulfate chains are needed for cell signaling. *Braz J Med Biol Res* **39(2)**:157-67.
- LOSI, G.; GARZON, G.; PUIA, G. (2007). Nongenomic regulation of glutamatergic neurotransmission in hippocampus by thyroid hormones. *Neurosci* **151(1)**:155-63.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193(1)**:265-75.
- MANDEL, S.J.; BERRY, M.J.; KIEFFER, J.D.; HARNEY, J.W.; WARNE, R.L.; LARSEN, P.R. (1992). Cloning and in vitro expression of the human selenoprotein, type I iodothyronine deiodinase. *J Clin Endocrinol Metab* **75**:1133-1139.
- MAO, Y.; SCHWARZBAUER, J.E. (2005). Fibronectin fibrillogenesis, a cell-mediated matrix assembly process. *Matrix Biol* **24(6)**:389-99.
- MARAGAKIS, N.J.; ROTHSTEIN, J.D. (2006). Mechanisms of disease: astrocytes in neurodegenerative disease. *Nat Clin Pract Neurol* **2(12)**:679-89.
- MARTINEZ, R.; GOMES, F.C.A. (2002). Neuritogenesis induced by thyroid hormone-treated astrocytes is mediated by epidermal growth factor/mitogen-activated protein kinase-phosphatidylinositol 3-kinase pathways and involves modulation of extracellular matrix proteins. *J Biol Chem* **277** 49311-49318.
- MARTINEZ, R.; GOMES, F.C.A. (2005). Proliferation of cerebellar neurons induced by astrocytes treated with thyroid hormone is mediated by a cooperation between cell contact and soluble factors and involves the epidermal growth factor-protein kinase A pathway. *J Neurosci Res* **80**:341-349.
- MASON, I. (1994). Do adhesion molecules signal via FGF receptors? *Curr Biol* **4**:1158-1161.
- MELDRUM, B.S. (2000). Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *J Nutr* **130**:1007S-1015S.

MENDES DE AGUIAR, C.B.N.; ALCHINI, R.; DECKER, H.; ALVAREZ-SILVA, M.; TASCA, C.; TRENTIN, A.G. (2008). Thyroid hormone increases astrocytic glutamate uptake and protects astrocytes and neurons against glutamate toxicity. *J Neurosci Res* (in press).

MONTIEL, T.; CAMACHO, A.; ESTRADA-SÁNCHEZ, A.M.; MASSIEU, L. (2005). Differential effects of the substrate inhibitor l-trans-pyrrolidine-2,4-dicarboxylate (PDC) and the non-substrate inhibitor DL-threo-beta-benzyloxycarboxylate (DL-TBOA) of glutamate transporters on neuronal damage and extracellular amino acid levels in rat brain in vivo. *Neurosci* **133**(3):667-78.

MORTE, B.; MANZANO, J.; SCANLAN, T.S.; VENNSTROM, B.; BERNAL, J. (2004). Aberrant maturation of astrocytes in thyroid hormone receptor alpha 1 knockout mice reveals an interplay between thyroid hormone receptor isoforms. *Endocrinol* **145**:386-1391.

NORENBERG, M.D.; MARTINEZ-HERNANDEZ, A. (1979). Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain. *Brain Res* **161**(2):303-10.

OOHIRA, A.; MATSUI, F.; WATANABE, E.; KUSHIMA, Y.; MAEDA, N. (1994). Developmentally regulated expression of a brain specific species of chondroitin sulfate proteoglycan, neurocan, identified with a monoclonal antibody IG2 in the rat cerebrum. *Neuroscience* **60**:145-57.

PAWLAK, J.; BRITO, V.; KÜPPERS, E.; BEYER, C. (2005). Regulation of glutamate transporter GLAST and GLT-1 expression in astrocytes by estrogen. *Brain Res Mol* **138**(1):1-7.

PESHEVA, P.; PROBSTMEIER, R. (2000). The yin and yang of tenascin-R in CNS development and pathology. *Prog Neurobiol* **61**:465-493.

PORCIONATTO, M. A. (2006). The extracellular matrix provides directional cues for neuronal migration during cerebellar development. *Braz J Med Biol Res* **39**:313-20.

PORTERFIELD, S.P.; HENDRICH, C.E. (1993). The role of thyroid hormone in prenatal and neonatal neurological development-current perspectives. *Endocr Rev* **14**:94-106.

PROPERZI, F.; LIN, R.; KWOK, J.; NAIDU, M.; VAN KUPPEVELT, T.H.; TEN DAM, G.B.; CAMARGO, L.M.; RAHA-CHOWDHURY, R.; FURUKAWA, Y.; MIKAMI, T.; SUGAHARA, K.; FAWCETT, J.W. (2008). Heparan sulphate proteoglycans in glia and in the normal and injured CNS: expression of sulphotransferases and changes in sulphation. *Eur J Neurosci* **27**(3):593-604.

RAHAMAN, S.O.; GHOSH, S.; MOHANAKUMAR, K.P.; DAS, S.; SARKAR, P.K. (2001). Hypothyroidism in the developing rat brain is associated with marked oxidative stress and aberrant intraneuronal accumulation of neurofilaments. *Neurosci Res* **40**:273-279.

RAPRAEGER, A.C. (2001). Molecular interactions of syndecans during development. *Semin Cell Dev Biol* **12(2)**:107-16.

RE, D.B.; BOUCRAUT, J.; SAMUEL, D.; BIRMAN, S.; KERKERIAN-LE GOFF, L.; HAD-AISSOUNI L. (2003). Glutamate transport alteration triggers differentiation-state selective oxidative death of cultured astrocytes: a mechanism different from excitotoxicity depending on intracellular GSH contents. *J Neurochem* **85(5)**:1159-70.

RE, D.B.; NAFIA, I.; MELON, C.; SHIMAMOTO, K.; KERKERIAN-LE GOFF, L.; HAD-AISSOUNI, L. (2006). Glutamate leakage from a compartmentalized intracellular metabolic pool and activation of the lipoxygenase pathway mediate oxidative astrocyte death by reversed glutamate transport. *Glia* **54(1)**:47-57.

ROTHSTEIN, J.D.; DYKES-HOBERG, M.; PARDO, C.A.; BRISTOL, L.A.; JIN, L.; KUNCL, R.W.; KANAI, Y.; HEDIGER, M.A.; WANG, Y.; SCHIELKE, J.P.; WELTY, D.F. (1996). Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron* **16(3)**:675-86.

SCHLESSINGER, J.; LAX, I.; LEMMON, M. (1995). Regulation of growth factor activation by proteoglycans: what is the role of the low affinity receptors? *Cell* **83**:357-360.

SCHWARTZ, N.B.; DOMOWICZ, M. (2004). Proteoglycans in brain development. *Glycoconj J* **21(6)**:329-41.

SCHWARZBAUER, J.E.; SECHLER, J.L (1999). Fibronectin fibrillogenesis: a paradigm for extracellular matrix assembly. *Curr Op Cell Biol* **11**:622-627.

SECHLER, J.L; SCHWARZBAUER, J.E. (1998). Control of cell cycle progression by fibronectin matrix architecture. *J Biol Chem* **273(40)**:25533-25536.

STEINDLER, D.A.; LAYWELL, E.D. (2003). Astrocytes as stem cells: Nomenclature, phenotype, and translation. *Glia* **43**:62-69.

STEINFELD, R.; VAN DEN BERGHE, H.; DAVID, G. (1996). Stimulation of fibroblast growth factor receptor-1 occupancy and signaling by cell surface-associated syndecans and glypican. *J Cell Biol* **133**:405-16.

STOFFEL, W.; KÖRNER, R.; WACHTMANN, D.; KELLER, B.U. (2004). Functional analysis of glutamate transporters in excitatory synaptic transmission of GLAST1 and GLAST1/EAAC1 deficient mice. *Brain Res Mol Brain Res* **128(2)**:170-81.

STREULI, C. (1999). Extracellular matrix remodelling and cellular differentiation. *Curr Op Cell Biol* **11**:634-640.

SUTHERLAND, A.E.; SANDERSON, R.D.; MAYES, M.; SEIBERT, M.; CALARCO, P.G.; BERNFIELD, M.; DAMSKY, C.H. (1991). Expression of syndecan, a putative low affinity fibroblast growth factor receptor, in the early mouse embryo. *Development* **113(1)**:339-51.

SUZUKI, K.; IKEGAYA, Y.; MATSUURA, S.; KANAI, Y.; ENDOU, H.; MATSUKI, N. (2001). Transient upregulation of the glial glutamate transporter GLAST in response to fibroblast growth factor, insulin-like growth factor and epidermal growth factor in cultured astrocytes. *J Cell Sci* **114**(20):3717-25.

SUZUKI, T.; ABE, T. (2007). Thyroid hormone transporters in the brain. *Cerebellum*. DOI: 10.1080/14734220701509851.

SWANSON, R.A.; LIU, J.; MILLER, J.W.; ROTHSTEIN, J.D.; FARRELL, K.; STEIN, B.A.; LONGUEMARE, M.C. (1997). Neuronal regulation of glutamate transporter subtype expression in astrocytes. *J Neurosci* **17**(3):932-40.

TANAKA, K.; WATASE, K.; MANABE, T.; YAMADA, K.; WATANABE, M.; TAKAHASHI, K.; IWAMA, H.; NISHIKAWA, T.; ICHIHARA, N.; KIKUCHI, T.; OKUYAMA, S.; KAWASHIMA, N.; HORI, S.; TAKIMOTO, M.; WADA, K. (1997). Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. *Science* **276**(5319):1699-702.

TASCA, C.I.; SANTOS, T.G.; TAVARES, R.G.; BATTASTINI, A.M.O.; ROCHA, J.B.T.; SOUZA, D.O. (2004). Guanine derivatives modulate L-glutamate uptake into rat brain synaptic vesicles. *Neurochem Int* **44**:423-431

TAVARES, R.G.; TASCA, C.I.; SANTOS, C.E.; ALVES, L.B.; PORCIÚNCULA, L.O.; EMANUELLI, T.; SOUZA, D.O. (2002). Quinolinic acid stimulates synaptosomal glutamate release and inhibits glutamate uptake into astrocytes. *Neurochem Int* **40**(7):621-7.

THE EXTRACELLULAR MATRIX. **Laminin**. Disponível em <http://www.med.unibs.it/~marchesi/extracellularmatrix.html>>. Acesso em: 3 abr. 2008.

TOWBIN, H.; STAEBELI, T.; GORDON, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **455**:68-78.

TRENTIN, A.G.; ALVAREZ-SILVA, M.; MOURA NETO, V. (2001). Thyroid hormone induces cerebellar astrocytes and C6 glioma cells to secrete mitogenic growth factors. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **281**:1088-1094.

TRENTIN, A.G.; MENDES DE AGUIAR, C.B.N.; GARCEZ, R.C.; ALVAREZ-SILVA, M. (2003). Thyroid hormone modulates the extracellular matrix organization and expression in cerebellar astrocyte: Effects on astrocyte adhesion. *Glia* **42**:359-369.

TRENTIN, A.G.; MOURA NETO, V. (1995). T₃ affects cerebellar astrocyte proliferation, GFAP and fibronectin organization. *NeuroReport* **6**:293-296.

TRENTIN, A.G.; ROSENTHAL, D.; MOURA NETO, V. (1995). Thyroid hormone and conditioned medium effects on astroglial cells from hypothyroid and normal rat brain: factor secretion, cell differentiation and proliferation. *J Neurosci Res* **41**:409-417.

TSACOPOULOS, M.; MAGISTRETTI, P.J. (1996). Metabolic coupling between glia and neurons. *J Neurosci* **16**(3):877-85.

TURNBULL, J.; POWELL, A.; GUIMOND, S. (2001). Heparan sulfate: decoding a dynamic multifunctional cell regulator. *Trends Cell Biol* **11**:75-82.

UCHIDA, K.; YONEZAWA, M.; NAKAMURA, S.; KOBAYASHI, T.; MACHIDA, T. (2005). Impaired neurogenesis in the growth-retarded mouse is reversed by T₃ treatment. *Neuroreport* **16**:103-106.

VENSTROM, K.A.; REICHARDT, L.F. (1993). Extracellular matrix 2: role of extracellular matrix molecules and their receptors in the nervous system. *FASEB J* **7**:996-1003.

VERNADAKIS, A. (1996). Glia-neuron intercommunications and synaptic plasticity. *Prog Neurobiol* **49**:185-214.

VISSER, T.J. (2006). The elemental importance of sufficient iodine intake: a trace is not enough. *Endocrinol* **147**(5):2095-7.

VISSER, W.E.; FRIESEMA, E.C.; JANSEN, J.; VISSER, T.J. (2007). Thyroid hormone transport by monocarboxylate transporters. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* **21**(2):223-36.

VOLK, R.; SCHWARTZ, J.J.; LI, J.; ROSENBERG, R.D.; SIMONS, M. (1999). The role of syndecan cytoplasmic domain in basic fibroblast growth factor-dependent signal transduction. *J Biol Chem* **274**:24417-24.

WAXMAN, S.G.; BLACK, J.A. (1984). Freeze-fracture ultrastructure of the perinodal astrocyte and associated glial junctions. *Brain Res.* **308**:1 77-87.

WINKLER, S.; STAHL, R.C.; CAREY, D.J.; BANSAL, R. (2002). Syndecan-3 and perlecan are differentially expressed by progenitors and mature oligodendrocytes and accumulate in the extracellular matrix. *J Neurosci Res* **69**(4):477-87.

ZAGRIS, N. (2001). Extracellular matrix in development of the early embryo. *Micron* **32**:427-438.

ZELENAIA, O.; SCHLAG, B.D.; GOCHENAUER, G.E.; GANEL, R.; SONG, W.; BEESLEY, J.S.; GRINSPAN, J.B.; ROTHSTEIN, J.D.; ROBINSON, M.B. (2000). Epidermal growth factor receptor agonists increase expression of glutamate transporter GLT-1 in astrocytes through pathways dependent on phosphatidylinositol 3-kinase and transcription factor NF-kappaB. *Mol Pharmacol* **57**(4):667-78.

ZOPPO, G.J. del; MILNER R. (2006). Integrin-matrix interactions in the cerebral microvasculature. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**(9): 1966-75.

Thyroid Hormone Mediates Syndecan Expression in Rat Neonatal Cerebellum

Cláudia Beatriz Nedel Mendes-de-Aguiar · Bruno Costa-Silva ·
Marcio Alvarez-Silva · Carla Inês Tasca · Andréa Gonçalves Trentin

Received: 27 November 2007 / Accepted: 4 January 2008
© Springer Science+Business Media, LLC 2008

Abstract Thyroid hormone (T_3) plays an essential role in the central nervous system development. Astrocytes mediate many of the T_3 effects in the growth and differentiation of cerebellum. In culture, T_3 induces cerebellar astrocytes to secrete growth factors, mainly FGF_2 , and alters the expression and organization of the extracellular matrix (ECM) proteins, laminin, and fibronectin. In addition, T_3 -treated astrocytes promote neuronal differentiation. In this study, we have investigated whether other ECM molecules, such as syndecans, are involved in T_3 action. Thus, we analyzed the expression of syndecans (1–4) by RT-PCR in astrocyte cultures from cerebellum, cortex, and hippocampus of newborn rats. Our results showed that syndecans (1–4) are expressed in astrocytes of cerebellum and cortex, whereas in hippocampus only syndecans 2 and 4 were detected. Semi-quantitative RT-PCR analysis revealed the reduced expression of syndecans 1, 2, and 4, and increased expression of syndecan 3 in hypothyroid cerebellum, when compared to the euthyroid tissue. Furthermore, we observed a reduced expression of syndecans 2 and 3 in T_3 -treated cerebellar astrocytes, when compared to control cultures. This balance of proteoglycans may be involved in T_3 action mediated by FGF_2 signaling, possibly affecting the formation of the trimeric signaling receptor complex composed by syndecan/ FGF / FGF -receptor (FGFR), which is essential for FGFR dimerization, activation, and subsequent cell signaling.

Keywords Syndecan · Thyroid hormone · Brain · Astrocyte

C. B. N. Mendes-de-Aguiar · B. Costa-Silva · M. Alvarez-Silva · A. G. Trentin (✉)
Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética, Centro de Ciências Biológicas,
Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário, Trindade 88040-900,
Florianópolis, SC, Brasil
e-mail: atrentin@ccb.ufsc.br

C. I. Tasca
Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina,
Campus Universitário, Trindade 88040-900, Florianópolis, SC, Brasil

C. B. N. Mendes-de-Aguiar · B. Costa-Silva · M. Alvarez-Silva · C. I. Tasca · A. G. Trentin
Programa de Pós-graduação em Neurociências, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de
Santa Catarina, Campus Universitário, Trindade 88040-900, Florianópolis, SC, Brasil

Introduction

Thyroid hormone (triiodothyronine; T_3) is crucial to the development and maturation of the mammalian central nervous system (Anderson 2001). T_3 regulates the axonal and dendritic growth, synapse formation, myelination, cell migration, and proliferation of specific glial and neuronal populations. Consequently, untreated hypothyroidism in humans leads to cretinism, which in its fully developed form is characterized by profound mental retardation, deaf-mutism, and spastic diplegia (Anderson 2001; Gomes et al. 2001; Konig and Moura Neto 2002). Considering its important role in the motor system (Porcionatto 2006), the cerebellum has been considered one of the main targets of the hypothyroidism (Trentin 2006). In previous work, we have reported that T_3 induces the astrocyte secretion of growth factors (GF), which are responsible for astrocyte morphological changes or proliferation (Trentin et al. 2001) and neuronal proliferation (Gomes et al. 1999). Furthermore, we have showed that T_3 induces astrocyte secretion of type 2 fibroblast GF (FGF₂), that autocrinally stimulates astrocyte proliferation, reorganization of extracellular matrix (ECM) proteins, and alterations in cell spreading and adhesion (Trentin et al. 2003). Members of the FGF family play an important role in the proliferation and self-renewal of neural precursor cells, and in the development of different neuronal and glial cell types (Ragsdale and Grove 2001; Vaccarino et al. 1999). FGF₂ stimulates the production of neurons and glial cells affecting cell survival, proliferation, and differentiation (Kilpatrick et al. 1995; Murphy et al. 1990). FGF signaling is regulated by heparan sulfate proteoglycans (HSPGs), which are restricted to the cell surface or found within the ECM of tissues (Bernfield et al. 1999; Ornitz 2000). HSPG plays a key role in the formation and stabilization of FGF:FGFR signaling complexes (Turnbull et al. 2001). HSPGs are required for FGF-stimulated proliferation of brain precursor cells, and are possibly involved in the regulation of early brain development (Ford-Perriss et al. 2003). In this study, we have investigated the expression of syndecans 1–4 in different regions of the developing brain and the effect of T_3 in the production of these molecules during the cerebellar development. The expression of syndecans was also analyzed in astrocyte cultures from cerebellum, cerebral hemispheres, and hippocampus of normal and hypothyroid newborn rats. This analysis was also performed in cultures of T_3 -treated cerebellar astrocytes. Our results suggest that the expression of syndecans is heterogeneous in different brain regions during development and, at least in cerebellum, the syndecan expression is under T_3 regulation.

Methods

Hypothyroid animals were obtained as previously described (Morreale de Escobar et al. 1987). Briefly, Wistar female rats were given 0.02% methimazole (MMI, Sigma) in drinking water, beginning at the tenth day of pregnancy until the newborn rats were utilized (Trentin et al. 1995). The animals were treated according to the ‘Guidelines for the Use of Animals in Neuroscience Research’ of the Society for Neuroscience (USA). Fresh rat brain samples were obtained from cerebellum, cerebral hemispheres, and hippocampus of newborn normal or hypothyroid animals. The tissues were removed and placed in phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4. Total RNA was isolated using the TRIzol[®] reagent (Gibco). Primary cultures of glial cells were prepared from newborn rat cerebellum, cerebral hemispheres, and hippocampus (0–3 days old) as previously described (Trentin et al. 2001). Briefly, the tissue was placed in PBS containing 0.6% glucose, and the meninges

were carefully removed to avoid contamination by fibroblasts. The tissue was manually dissociated by Pasteur pipette and centrifuged for 3 min. The pellet was resuspended in Dulbecco's modified Eagle's medium and nutrient mixture F12 (DMEM-F-12, Gibco) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS; Cultilab). Cells were plated into 25 cm² tissue culture flasks (5 × 10⁶ cells/flask), and incubated at 37°C in a humidified 5% CO₂/95% air atmosphere. The medium was changed 24 h after plating and subsequently every 3 days, until monolayer confluence, at 10–14 days. Astroglial cells were then washed with PBS and treated with 50 nM 3, 3'-5-triiodo-L-thyronine (T₃) for 3 days. The medium was renewed every day except after the third day. The hormone solution was dissolved in DMEM-F12 without FCS. Control cultures were maintained in DMEM-F12 without FCS. Control and hormone-treated cultures were then maintained for 2 days without medium changes and total RNA were isolated using the TRIzol[®] reagent. For RT-PCR reactions, first strand cDNA was synthesized using 5 µg of total RNA in the final volume of 20 µl containing RT-5 X buffer, 0.5 mg/ml oligo-dT as primer, 0.1 M DTT, 40 U/µl RNasin, 10 mM dATP, dGTP, dTTP, and dCTP, 50 mM MgCl₂. Incubation was carried out at 37°C for 1 h, and the reverse transcriptase was inactivated at 95°C for 5 min. PCR co-amplification using cDNA of GAPDH as endogenous control was performed in a final volume of 80 µl containing PCR 10 X buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl), 10 mM dATP, dGTP, dTTP, and dCTP, 50 mM MgCl₂, 2 U Taq polymerase. The specific oligonucleotides primer sequences employed for rat GAPDH and syndecans 1–4 were those previously described (Stringer et al. 1999). The RT-PCR expression analysis was performed on three independent RNA samples. Statistical analysis: The significance of differences was evaluated by means of one-way ANOVA with Newman–Keuls post-test, using the GraphPad InStat program (San Diego, CA, USA).

Results

We observed that syndecans 1–4 are expressed in cerebellum and cerebral hemispheres. However, in hippocampus we only detected syndecans 2 and 4 (Fig. 1). Furthermore, hypothyroid cerebellum presented reduced expression of syndecans 1 (–88%), 2 (–50%), and 4 (–55%), and higher expression of syndecan 3 (+80%), when compared to the

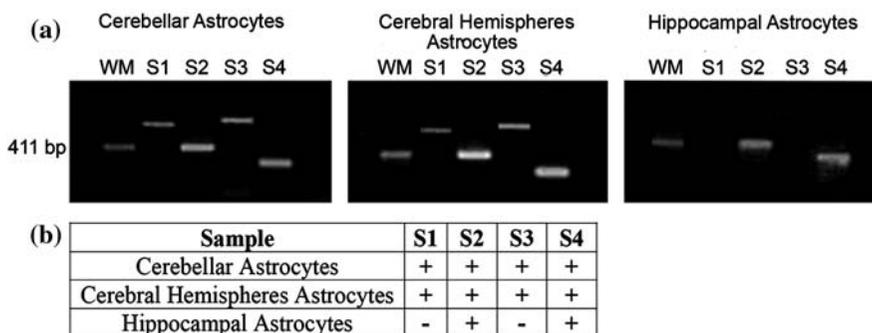


Fig. 1 Syndecan mRNA expression by RT-PCR in astrocyte cultures. (a) Agarose gel electrophoresis. Weight marker (WM) (411 pb); Syndecan 1 (S1); Syndecan 2 (S2); Syndecan 3 (S3); Syndecan 4 (S4). (b) Positive expression of syndecans 1–4. Astrocyte cultures were obtained from euthyroid rat cerebellum, cerebral hemispheres, or hippocampus

euthyroid structure (Fig. 2). In addition, the T_3 -treated cerebellar astrocytes showed a reduced expression of syndecans 2 (–55%) and 3 (–90%), when compared to the euthyroid condition (Fig. 3).

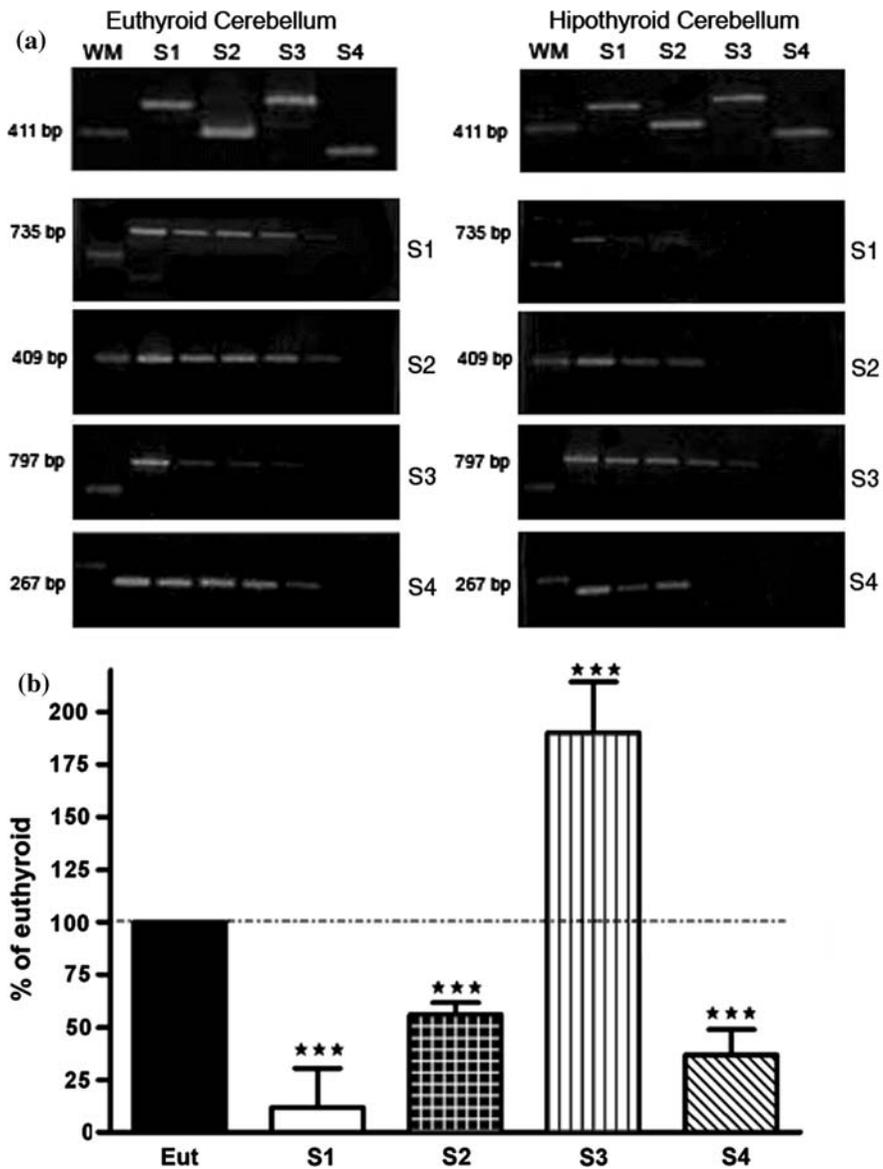
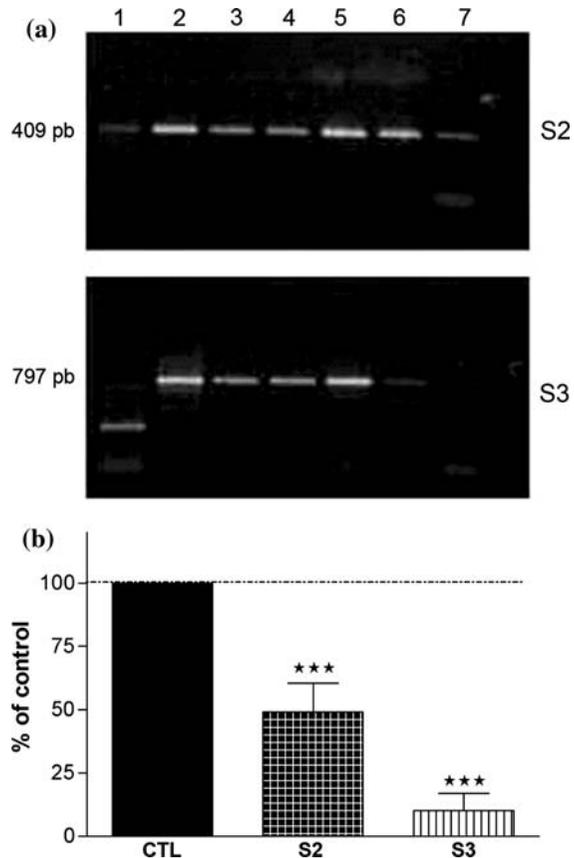


Fig. 2 Semi-quantitative RT-PCR analysis of Syndecan mRNA expression in euthyroid and hypothyroid rat cerebellum. (a) Agarose gel electrophoresis. Weight marker (WM) (411 pb); Syndecan 1 (S1) (735 pb); Syndecan 2 (S2) (409 pb); Syndecan 3 (S3) (797 pb); Syndecan 4 (S4) (267 pb). (b) The values were standardized by GAPDH and are represented as percentage of the euthyroid expression. Results are expressed as the mean \pm SEM. *** $P < 0.001$ by one-way ANOVA with Newman–Keuls post hoc test

Fig. 3 Semi-quantitative RT-PCR analysis of syndecans (2 and 3) mRNA expression in cerebellar astrocytes cultures. **(a)** Agarose gel electrophoresis. Row 1: weight marker (411 bp), rows 2–4: control astrocytes, and rows 5–7: T_3 -treated astrocytes. **(b)** The values were standardized by GAPDH and are represented as percentage of control cultures. Results are expressed as the mean \pm SEM. *** $P < 0.001$ by one-way ANOVA with Newman–Keuls post hoc test



Discussion

The cell–ECM interactions are dynamic and influence important events of development such as cell–cell and cell–matrix adhesion, cell morphology, migration, proliferation, differentiation, and apoptosis (Streuli 1999). In this study, we show that syndecans are heterogeneously expressed in the developing brain, and that T_3 differently affects the expression of these molecules in newborn rat cerebellum. Syndecans 1–4 were detected in cerebral hemisphere and cerebellar astrocytes, while hippocampal astrocytes expressed only syndecans 2 and 4. The absence of syndecan 3 in hippocampal astrocytes may be explained by the previous observation that its expression in the adult hippocampus is concentrated in neuronal cell bodies (Hsueh and Sheng 1999). We have also observed a down-regulation of syndecans 1, 2, and 4, and up-regulation of syndecan 3 in hypothyroid cerebellum, and down-regulation of syndecans 2 and 3 in T_3 -treated cerebellar astrocytes. In previous studies, we have suggested that hypothyroidism alters the expression of cerebroglycan, glypican, and syndecan 3 in cerebral hemispheres and midbrain (Calloni et al. 2001). These effects may contribute to the alterations promoted by T_3 in the neonatal brain. Neural PGs are important in cell–cell and in cell–substratum interactions during neuronal development (Oohira et al. 1994). It was reported that the brain contains 25 or more PGs. Some of them are obtained from the soluble fraction and are supposed to be largely ECM constituents (Oohira et al. 1994). Syndecan 3 is

transiently expressed in perinatal brain and is essential to brain development (Lander 1993). Furthermore, syndecan 2 is important to mediate FGF₂ signaling in glial cells (Fuxe et al. 1994). Despite of numerous studies describing the role of syndecans 1 and 4 mediating FGF₂ signaling (Filla et al. 1998; Horowitz et al. 2002; Steinfeld et al. 1996; Volk et al. 1999), null mutant mice to these molecules were apparently normal, fertile, and without brain defects (Alexander et al. 2000; Echtermeyer et al. 1999). No alteration was perceived in the brains of individual knockouts suggesting that HSPGs may compensate the reduction of each other. Thus, the over-expression of syndecan 3 in hypothyroid cerebellum observed in our experiments could be a compensatory effect for the down-regulation of the other PGs (syndecans 1, 2, and 4). Otherwise, the up-regulation of syndecan 3 may promote the compensatory down-regulation of syndecans 1, 2, and 4. Similarly, the down-regulation of syndecans 2 and 3 in T₃-treated cerebellar astrocytes could be a compensatory effect of the over-expression of some non-analyzed PGs. Since T₃ influences the protein synthesis in brain (Hendrich and Porterfield 1996), we suggest that the observed process may be involved in T₃ action. It is likely that, the differential effects of T₃ on syndecan expression reported here may be related to its well-described role on neuronal migration, differentiation, and maturation.

Acknowledgments This work was supported by the Brazilian funding agencies: CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), CNPq/PRONEX, MCT/INFRA (Ministério da Ciência e Tecnologia), CAPES (Conselho de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), and FAPESC (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Santa Catarina).

References

- Alexander CM et al (2000) Syndecan-1 is required for Wnt-1-induced mammary tumorigenesis in mice. *Nat Genet* 25:329–332
- Anderson GW (2001) Thyroid hormones and the brain. *Front Neuroendocrinol* 22:1–17
- Bernfield M et al (1999) Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Biochem* 68:729–777
- Calloni GW et al (2001) Thyroid hormone deficiency alters extracellular matrix protein expression in rat brain. *Brain Res Dev Brain Res* 126:121–124
- Echtermeyer F et al (1999) Syndecan-4 core protein is sufficient for the assembly of focal adhesions and actin stress fibers. *J Cell Sci* 112(Pt 20):3433–3441
- Filla MS et al (1998) The cell surface proteoglycan syndecan-1 mediates fibroblast growth factor-2 binding and activity. *J Cell Physiol* 174:310–321
- Ford-Perriss M et al (2003) Localisation of specific heparan sulfate proteoglycans during the proliferative phase of brain development. *Dev Dyn* 227:170–184
- Fuxe K et al (1994) On the regional distribution of heparan sulfate proteoglycan immunoreactivity in the rat brain. *Brain Res* 636:131–138
- Gomes FC et al (1999) Cerebellar astrocytes treated by thyroid hormone modulate neuronal proliferation. *Glia* 25:247–255
- Gomes FC et al (2001) Thyroid hormone role in nervous system morphogenesis. *Prog Brain Res* 132:41–50
- Hendrich CE, Porterfield SP (1996) Ribosomal protein synthesis in 16 and 19 day gestation fetuses of hypothyroid mothers. *Proc Soc Exp Biol Med* 213:273–280
- Horowitz A et al (2002) Fibroblast growth factor-specific modulation of cellular response by syndecan-4. *J Cell Biol* 157:715–725
- Hsueh YP, Sheng M (1999) Regulated expression and subcellular localization of syndecan heparan sulfate proteoglycans and the syndecan-binding protein CASK/LIN-2 during rat brain development. *J Neurosci* 19:7415–7425
- Kilpatrick TJ et al (1995) The regulation of neural precursor cells within the mammalian brain. *Mol Cell Neurosci* 6:2–15
- Konig S, Moura Neto V (2002) Thyroid hormone actions on neural cells. *Cell Mol Neurobiol* 22:517–544
- Lander AD (1993) Proteoglycans in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 3:716–723

- Morreale de Escobar G et al (1987) Fetal and maternal thyroid hormones. *Horm Res* 26:12–27
- Murphy M et al (1990) Fibroblast growth factor stimulates the proliferation and differentiation of neural precursor cells in vitro. *J Neurosci Res* 25:463–475
- Oohira A et al (1994) Developmentally regulated expression of a brain specific species of chondroitin sulfate proteoglycan, neurocan, identified with a monoclonal antibody IG2 in the rat cerebrum. *Neuroscience* 60:145–157
- Ornitz DM (2000) FGFs, heparan sulfate and FGFRs: complex interactions essential for development. *Bioessays* 22:108–112
- Porcionatto MA (2006) The extracellular matrix provides directional cues for neuronal migration during cerebellar development. *Braz J Med Biol Res* 39:313–320
- Ragsdale CW, Grove EA (2001) Patterning the mammalian cerebral cortex. *Curr Opin Neurobiol* 11:50–58
- Steinfeld R et al (1996) Stimulation of fibroblast growth factor receptor-1 occupancy and signaling by cell surface-associated syndecans and glypican. *J Cell Biol* 133:405–416
- Streuli C (1999) Extracellular matrix remodelling and cellular differentiation. *Curr Opin Cell Biol* 11:634–640
- Stringer SE et al (1999) Heparin is a unique marker of progenitors in the glial cell lineage. *J Biol Chem* 274:25455–25460
- Trentin AG (2006) Thyroid hormone and astrocyte morphogenesis. *J Endocrinol* 189:189–197
- Trentin AG et al (1995) Thyroid hormone and conditioned medium effects on astroglial cells from hypothyroid and normal rat brain: factor secretion, cell differentiation, and proliferation. *J Neurosci Res* 41:409–417
- Trentin AG et al (2001) Thyroid hormone induces cerebellar astrocytes and C6 glioma cells to secrete mitogenic growth factors. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281:E1088–E1094
- Trentin AG et al (2003) Thyroid hormone modulates the extracellular matrix organization and expression in cerebellar astrocyte: effects on astrocyte adhesion. *Glia* 42:359–369
- Turnbull J et al (2001) Heparan sulfate: decoding a dynamic multifunctional cell regulator. *Trends Cell Biol* 11:75–82
- Vaccarino FM et al (1999) Fibroblast growth factor signaling regulates growth and morphogenesis at multiple steps during brain development. *Curr Top Dev Biol* 46:179–200
- Volk R et al (1999) The role of syndecan cytoplasmic domain in basic fibroblast growth factor-dependent signal transduction. *J Biol Chem* 274:24417–24424

Your article (21755) from "Journal of Neuroscience Research" is available for download

=====

Journal of Neuroscience Research Published by John Wiley & Sons, Inc.

Dear Author,

Your article page proofs for Journal of Neuroscience Research are ready for review. John Wiley & Sons has made this article available to you online for faster, more efficient editing. Please follow the instructions below and you will be able to access a PDF version of your article as well as relevant accompanying paperwork.

First, make sure you have a copy of Adobe Acrobat Reader software to read these files. This is free software and is available for user downloading at <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep.html>.

Open your web browser, and enter the following web address:
<http://kwglobal.co.in/jw/retrieval.aspx>

You will be prompted to log in, and asked for a password. Your login name will be your email address, and your password will be ----

Example:

Login: your e-mail address

Password: ----

The site contains one file, containing:

- Author Instructions Checklist
- Adobe Acrobat Users - NOTES tool sheet
- Reprint Order form
- A copy of your page proofs for your article

Print out this file, and fill out the forms by hand. (If you do not wish to order reprints, please mark a "0" on the reprint order form.) Read your page proofs carefully and:

- indicate changes or corrections in the margin of the page proofs
- answer all queries (footnotes A,B,C, etc.) on the last page of the PDF proof
- proofread any tables and equations carefully
- check your figure legends for accuracy

Within 48 hours, please return via fax or express mail all materials to the address given below. This will include:

- 1) Page proofs with corrections
- 2) Reprint Order form

Return to:

Jeremy Hargrove
Production Editor
John Wiley & Sons, Inc.
111 River Street, Hoboken, NJ 07030

Phone: 201-748-5966
Fax: 201-748-6052
Email: JHargrov@wiley.com

Technical problems? If you experience technical problems downloading your file or any other problem with the website listed above, please contact Birender/Sundeeep (e-mail: wileysupport@kwglobal.com, phone: +91 (44) 42058888 ext. 310).

Questions regarding your article? Please don't hesitate to contact me with any questions about the article itself, or if you have trouble interpreting any of the questions listed at the end of your file. **REMEMBER TO INCLUDE YOUR ARTICLE NO. (21755) WITH ALL CORRESPONDENCE.** This will help both of us address your query most efficiently.

As this e-proofing system was designed to make the publishing process easier for everyone, we welcome any and all feedback. Thanks for participating in our e-proofing system!

This e-proof is to be used only for the purpose of returning corrections to the publisher.

Sincerely,

Jeremy Hargrove
Production Editor
John Wiley & Sons, Inc.
111 River Street, Hoboken, NJ 07030

Phone: 201-748-5966
Fax: 201-748-6052
Email: JHargrov@wiley.com



WILEY

Publishers Since 1807

111 RIVER STREET, HOBOKEN, NJ 07030

JOURNAL OF NEUROSCIENCE RESEARCH PRODUCTION

*****IMMEDIATE RESPONSE REQUIRED*****

Please follow these instructions to avoid delay of publication.

READ PROOFS CAREFULLY

This will be your only chance to review these proofs.

Please note that the volume and page numbers shown on the proofs are for position only.

ANSWER ALL QUERIES ON PROOFS (Queries for you to answer are attached as the last page of your proof.)

Mark all corrections directly on the proofs. Note that excessive author alterations may ultimately result in delay of publication and extra costs may be charged to you.

CHECK FIGURES AND TABLES CAREFULLY

Check size, numbering, and orientation of figures.

All images in the PDF are downsampled (reduced to lower resolution and file size) to facilitate Internet delivery. These images will appear at higher resolution and sharpness in the printed article.

COMPLETE REPRINT ORDER FORM

Fill out the attached reprint order form. It is important to return the form even if you are not ordering reprints. Reprints will be shipped 4-6 weeks after your article appears in print.

ADDITIONAL COPIES

If you wish to purchase additional copies of the journal in which your article appears, please contact Kim Lloyd at (201) 748-8839, fax (201) 748-6021, or E-mail at klloyd@wiley.com

**RETURN WITHIN 48 HOURS OF RECEIPT VIA FAX TO
201-748-6052
or direct questions to:**

Jeremy Hargrove, Production Editor

Journal of Neuroscience Research

Phone: 201-748-5966

Refer to journal acronym (JNR) and article production number

Softproofing for advanced Adobe Acrobat Users – NOTES tool

NOTE: ADOBE READER FROM THE INTERNET DOES NOT CONTAIN THE NOTES TOOL USED IN THIS PROCEDURE.

Acrobat annotation tools can be very useful for indicating changes to the PDF proof of your article. By using Acrobat annotation tools, a full digital pathway can be maintained for your page proofs.

The NOTES annotation tool can be used with either Adobe Acrobat 6.0 or Adobe Acrobat 7.0. Other annotation tools are also available in Acrobat 6.0, but this instruction sheet will concentrate on how to use the NOTES tool. Acrobat Reader, the free Internet download software from Adobe, DOES NOT contain the NOTES tool. In order to softproof using the NOTES tool you must have the full software suite Adobe Acrobat Exchange 6.0 or Adobe Acrobat 7.0 installed on your computer.

Steps for Softproofing using Adobe Acrobat NOTES tool:

1. Open the PDF page proof of your article using either Adobe Acrobat Exchange 6.0 or Adobe Acrobat 7.0. Proof your article on-screen or print a copy for markup of changes.
2. Go to Edit/Preferences/Commenting (in Acrobat 6.0) or Edit/Preferences/Commenting (in Acrobat 7.0) check “Always use login name for author name” option. Also, set the font size at 9 or 10 point.
3. When you have decided on the corrections to your article, select the NOTES tool from the Acrobat toolbox (Acrobat 6.0) and click to display note text to be changed, or Comments/Add Note (in Acrobat 7.0).
4. Enter your corrections into the NOTES text box window. Be sure to clearly indicate where the correction is to be placed and what text it will effect. If necessary to avoid confusion, you can use your TEXT SELECTION tool to copy the text to be corrected and paste it into the NOTES text box window. At this point, you can type the corrections directly into the NOTES text box window. **DO NOT correct the text by typing directly on the PDF page.**
5. Go through your entire article using the NOTES tool as described in Step 4.
6. When you have completed the corrections to your article, go to Document/Export Comments (in Acrobat 6.0) or Comments/Export Comments (in Acrobat 7.0). Save your NOTES file to a place on your harddrive where you can easily locate it. **Name your NOTES file with the article number assigned to your article in the original softproofing e-mail message.**
7. **When closing your article PDF be sure NOT to save changes to original file.**
8. To make changes to a NOTES file you have exported, simply re-open the original PDF proof file, go to Document/Import Comments and import the NOTES file you saved. Make changes and reexport NOTES file keeping the same file name.
9. When complete, attach your NOTES file to a reply e-mail message. Be sure to include your name, the date, and the title of the journal your article will be printed in.



REPRINT BILLING DEPARTMENT 111 RIVER STREET HOBOKEN, NJ 07030

PHONE: (201) 748-8789; FAX: (201) 748-6326

E-MAIL: reprints@wiley.com

PREPUBLICATION REPRINT ORDER FORM

Please complete this form even if you are not ordering reprints. This form **MUST** be returned with your corrected proofs and original manuscript. Your reprints will be shipped approximately 4 weeks after publication. Reprints ordered after printing will be substantially more expensive.

JOURNAL Journal of Neuroscience Research VOLUME _____ ISSUE _____

TITLE OF MANUSCRIPT _____

MS. NO. JNR- _____ NO. OF AUTHOR(S) _____
PAGES

No. of Pages	100 Reprints	200 Reprints	300 Reprints	400 Reprints	500 Reprints
	\$	\$	\$	\$	\$
1-4	336	501	694	890	1052
5-8	469	703	987	1251	1477
9-12	594	923	1234	1565	1850
13-16	714	1156	1527	1901	2273
17-20	794	1340	1775	2212	2648
21-24	911	1529	2031	2536	3037
25-28	1004	1707	2267	2828	3388
29-32	1108	1894	2515	3135	3755
33-36	1219	2092	2773	3456	4143
37-40	1329	2290	3033	3776	4528

**REPRINTS ARE ONLY AVAILABLE IN LOTS OF 100. IF YOU WISH TO ORDER MORE THAN 500 REPRINTS, PLEASE CONTACT OUR REPRINTS DEPARTMENT AT (201) 748-8789 FOR A PRICE QUOTE.

Please send me _____ reprints of the above article at \$ _____

Please add appropriate State and Local Tax (Tax Exempt No. _____) \$ _____
for United States orders only.

Please add 5% Postage and Handling \$ _____

TOTAL AMOUNT OF ORDER** \$ _____

***International orders must be paid in currency and drawn on a U.S. bank*

Please check one: Check enclosed Bill me Credit Card
If credit card order, charge to: American Express Visa MasterCard

Credit Card No _____ Signature _____ Exp. Date _____

BILL TO: Name _____ **SHIP TO:** (Please, no P.O. Box numbers) Name _____
Institution _____ Institution _____
Address _____ Address _____

Purchase Order No. _____ Phone _____ Fax _____
E-mail _____

Thyroid Hormone Increases Astrocytic Glutamate Uptake and Protects Astrocytes and Neurons Against Glutamate Toxicity

Cláudia Beatriz Nedel Mendes-de-Aguiar,^{1,2} Ricardo Alchini,¹ Helena Decker,^{2,3} Marcio Alvarez-Silva,^{1,2} Carla Inês Tasca,^{2,3} and Andréa Gonçalves Trentin^{1,2*}

¹Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário, Trindade, Florianópolis, SC, Brasil

²Programa de Pós-graduação em Neurociências, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário, Trindade, Florianópolis, SC, Brasil

³Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário, Trindade, Florianópolis, SC, Brasil

Thyroid hormone (T_3) regulates the growth and differentiation of rat cerebellar astrocytes. Previously, we have demonstrated that these effects are due, at least in part, to the increased expression of extracellular matrix molecules and growth factors, such as fibroblast growth factor-2. T_3 also modulates neuronal development in an astrocyte-mediated manner. In the mammalian central nervous system, excitatory neurotransmission is mediated mainly by glutamate. However, excessive stimulation of glutamate receptors can lead to excitotoxicity and cell death. Astrocytic glutamate transporters, GLT-1 and GLAST, play an essential role in the clearance of the neuronal-released glutamate from the extracellular space and are essential for maintaining physiological extracellular glutamate levels in the brain. In the present study, we showed that T_3 significantly increased glutamate uptake by cerebellar astrocytes compared with control cultures. Inhibitors of glutamate uptake, such as L-PDC and DL-TBOA, abolished glutamate uptake on control or T_3 -treated astrocytes. T_3 treatment of astrocytes increased both mRNA levels and protein expression of GLAST and GLT-1, although no significant changes on the distribution of these transporters were observed. The gliotoxic effect of glutamate on cultured cerebellar astrocytes was abolished by T_3 treatment of astrocytes. In addition, the neuronal viability against glutamate challenge was enhanced on T_3 -treated astrocytes, showing a putative neuroprotective effect of T_3 . In conclusion, our results showed that T_3 regulates extracellular glutamate levels by modulating the astrocytic glutamate transporters. This represents an important mechanism mediated by T_3 on the improvement of astrocytic microenvironment in order to promote neuronal development and neuroprotection. © 2008 Wiley-Liss, Inc.

Key words: T_3 ; astrocytes; neuronal survival; GLAST; GLT-1

The thyroid hormone (T_3) is essential for the development and maturation of the mammalian central nervous system (CNS). T_3 regulates the axonal and

dendritic growth, synapse formation, myelination, cell migration, and proliferation of specific glial and neuronal populations (for review see Trentin, 2006). T_3 deficiency during the fetal and neonatal periods leads to abnormal establishment of these processes resulting in profound mental retardation, deaf-mutism, and spastic diplegia, known in humans as cretinism (Konig and Moura Neto, 2002). Nevertheless, the cellular and molecular mechanisms involved in this syndrome are not well understood.

It is well established that astrocytes play an important role during CNS development, modulating neuronal differentiation and guiding neuronal migration and axon growth (Fields and Stevens-Graham, 2002). These cells produce most of the extracellular matrix (ECM) components of the CNS, such as fibronectin and laminin (Liesi et al., 1986, 1995). Furthermore, astrocytes control the neuronal metabolism and activity, regulating the glucose supply, the extracellular ion and neurotransmitter levels, participating in blood–brain barrier, secreting neuroactive substances and contributing for synapse formation and synaptic transmission (Newman, 2003).

Astrocytes also have a crucial role in glutamate clearance, keeping extracellular glutamate levels at physi-

Contract grant sponsor: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); Contract grant sponsor: CNPq/PRONEX, Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT)/INFRA; Contract grant sponsor: Conselho de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES); Contract grant sponsor: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Santa Catarina (FAPESC).

*Correspondence to: Profa. Dra. Andréa Gonçalves Trentin, Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil 88040-900. E-mail: atrentin@ccb.ufsc.br

Received 26 November 2007; Revised 10 March 2008; Accepted 12 March 2008

Published online 00 Month 2008 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/jnr.21755

2 Mendes-de-Aguiar et al.

ological concentrations and thus avoiding excessive stimulation of neuronal glutamate receptors, which can lead to excitotoxicity and neuronal death (Danbolt, 2001). The high-affinity sodium-dependent astrocytic glutamate transporters GLAST and GLT-1 are directly related to the maintenance of the physiological glutamate levels and neuroprotective effects (Guillet et al., 2005).

Studies using cell culture approaches have demonstrated that T_3 promotes morphological changes and biochemical differentiation in astrocytes from cerebral hemispheres of newborn rats without affecting cell proliferation (Trentin et al., 1995). However, T_3 stimulates both cerebellar astrocyte and neuronal proliferation mediated by the secretion of growth factors, such as fibroblast growth factor-2 (FGF2) and epithelial growth factor (EGF; Gomes et al., 1999; Trentin et al., 2001, 2003). T_3 also alters the expression and organization of the glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the ECM molecules such as fibronectin and laminin in cerebellar astrocytes (Trentin and Moura Neto, 1995; Lima et al., 1997). In addition, T_3 promotes neuronal differentiation and survival mediated by the astrocytic production and reorganization of ECM molecules (Trentin et al., 2001, 2003; Martinez and Gomes, 2002; for review see Trentin, 2006).

Here we studied an additional role of T_3 in the CNS: regulating glutamate uptake by cerebellar astrocytes. We show that this effect is mediated through increasing the expression of astrocytic glutamate transporters GLAST and GLT-1 and that T_3 treatment also prevents the gliotoxic effect of glutamate. Our results revealed an increased neuronal viability against glutamate toxicity when neurons were cocultured on T_3 -treated astrocytes, showing a putative neuroprotective effect.

MATERIALS AND METHODS

Cell Cultures

Primary cultures of astrocytes were prepared from cerebella obtained from newborn (0–3-day-old) Wistar rats as previously described (Trentin et al., 2003). Briefly, astrocytes were plated into 25-cm² tissue culture flasks (5×10^6 cells/flask) or into 24-well culture plates (3.5×10^5 cells) and grown to confluence (10–14 days) in the presence of Dulbecco's modified Eagle's medium and nutrient mixture F12 (DMEM-F12; Invitrogen, Carlsbad, CA) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS; CultiLab). The cultures were incubated at 37°C in a humidified 5% CO₂ and 95% atmosphere.

Neurons were prepared from cerebella of newborn rats, as described previously by Gomes et al. (1999). Briefly, cells were dissociated from the tissue and plated on control or T_3 -treated astrocyte monolayers (0.5×10^5 cells/well). Cocultures were maintained for 24 hr at 37°C in a humidified 5% CO₂ and 95% atmosphere.

Cell Culture Treatment

Astrocyte treatment was performed as described previously (Trentin et al., 2003). Astroglial cells were treated with 50 nM 3,3',5 triiodo-L-thyronine (T_3 ; Sigma, St. Louis, MO)

dissolved in DMEM-F12 without fetal calf serum (FCS) for 3 days with daily medium changes, except after the third day. Control cultures were maintained in DMEM-F12 without FCS. Cultures were then maintained for additional 2 days without medium changes, and subsequently the experiments or cocultures were performed. For the cocultures, the astrocyte conditioned medium was replaced by fresh DMEM-F12 to avoid an effect of T_3 or T_3 -induced growth factors directly on neurons. Neurons were then plated, and L-glutamate (50, 100, or 200 μ M) was added to the culture medium 3 hr after neuronal plating. Cocultures were maintained for 24 hr at 37°C in a humidified 5% CO₂-95% atmosphere.

MTT Assay

At the fifth day of treatment, L-glutamate (1 or 10 mM) was added to the medium of both control and T_3 -treated astrocyte cultures. After 24 hr, the astrocytic viability was estimated by MTT assay, which is based on the ability of live cells to reduce MTT to formazan, a product suitable for optical density measurement (Cole, 1986; Trentin et al., 2001; Mendes de Aguiar et al., 2002).

Sytox Green Nucleic Acid Staining

L-glutamate (10 mM) was added in the medium of both control and T_3 -treated astrocyte monolayers at the fifth day of treatment and maintained for additional 24 hr. Cultures were then washed with HEPES buffer (5 mM HEPES; 125 mM NaCl; 5.5 mM KCl; 1.0 mM MgCl₂·6H₂O; 1.8 mM CaCl₂·2H₂O), pH 7.4, and incubated during 10 minutes with Sytox green nucleic acid stain (Molecular Probes, Eugene, OR) according to the manufacturer's instructions. Cells were then washed with PBS and fixed as described above. The total cell nuclei were stained with Hoescht (Sigma). The proportion of Sytox green-positive cells was accessed in relation to the total number of cells. The cultures were mounted on glyceraldheyde and examined under an epifluorescent microscope (Olympus).

Immunocytochemistry

The immunoreactions were performed as described previously (Trentin et al., 2003). Astrocyte monolayers or astrocyte–neuron cocultures were fixed with 4% paraformaldehyde during 30 min. GLAST and GLT-1 analysis was performed by using the polyclonal guinea pig anti-rat GLAST (1:4,000, 4°C, overnight; Chemicon, Temecula, CA) or GLT-1 (1:2,000, 4°C, overnight; Chemicon) antibodies, both followed by an anti-guinea pig horseradish peroxidase (HRP) secondary antibody (1:1,000, 37°C, 1 hr; Chemicon). The reaction was revealed by tyramide signal amplification (TSA; Perkin-Elmer, Norwalk, CT), according to the manufacturer's instructions and examined under an epifluorescent microscope (Olympus).

For neuronal staining, the cocultures were fixed as described above and permeabilized with 0.2% Triton X-100. Cells were then incubated with mouse anti- β -tubulin III monoclonal antibody (1:400, 4°C, overnight; Promega, Madison, WI), followed by goat anti-mouse HRP secondary antibody (1:400, 37°C, 1 hr; Dako, Carpinteria, CA). The reac-

tion was revealed by VIP Vector staining kit (Vector, Burlingame, CA) according to the manufacturer's instructions. Neurons were identified by brightfield microscopy (Olympus).

Glutamate Uptake

The experiments of glutamate uptake were performed as described by Tavares et al. (2002). Cultures were preincubated with Hanks' balanced salt solution (HBSS) containing 1.29 mM CaCl₂, 136.9 mM NaCl, 5.36 mM KCl, 0.65 mM MgSO₄, 0.27 mM Na₂HPO₄, 1.1 mM KH₂PO₄, 5 mM Hepes, and 2 mM glucose (pH 7.2) during 15 min. After that, 0.33 μCi/ml of L-[³H]glutamate (GE Healthcare) with unlabeled L-glutamate (to achieve a final glutamate concentrations range from 1 μM to 100 μM) was added. The reaction was interrupted after 7 min of incubation at 35°C by two washes in ice-cold HBSS, immediately followed by cell lysis (0.1 N NaOH/0.01% SDS, 15 min). Aliquots were taken for liquid scintillation counting and for Lowry's protein assay (Lowry et al., 1951) with bovine serum albumin (BSA) as standard. The kinetic parameters obtained with concentration-dependent curves of glutamate uptake, maximum velocity of uptake (V_{max}), and the Michaelis-Menten constant (K_M), were calculated through Lineweaver-Burk analysis (Tavares et al., 2002; Tasca et al., 2004). Inhibition of the glutamate uptake was achieved by adding the astrocytic glutamate transporters inhibitors, L-trans-2,4-pyrrolidine dicarboxylate (L-PDC) or DL-threo-β-benzyloxyspartate (DL-TBOA; 50 μM), 15 min before the addition of the L-[³H]glutamate, and the experiments were performed as described above.

Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction

Total RNA from control and T₃-treated astrocytes were isolated using the Trizol reagent (Gibco, Grand Island, NY). For RT-PCRs, first-strand cDNA was synthesized by using 5 μg total RNA in the final volume of 20 μl containing RT 5× buffer; 0.5 mg/ml oligo-dT as primer; 0.1 M DTT; 40 U/μl RNAsin; 10 mM dATP, dGTP, dTTP, and dCTP; and 50 mM MgCl₂. Incubation was carried out at 37°C for 1 hr, and the reverse transcriptase was inactivated at 95°C for 5 min. PCR coamplification using cDNA of GAPDH as endogenous control was performed in a final volume of 80 μl containing PCR 10× buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl), 10 mM dATP, dGTP, dTTP and dCTP, 50 mM MgCl₂, 2U Taq polymerase. The specific oligonucleotides primer sequences employed for rat GAPDH, GLAST, and GLT-1 were the following: GAPDH, TTA CTC CTT GGA GGC CAT GTA GG (sense), TAA AGG GCA TCC TGG GCT ACA CT (antisense); 40 cycles, annealing 57°C; GLAST, ATG CCT TTG TGC TAC TCA CC (sense), GTG TTT CGT TGG CTG ATG (antisense); 38 cycles, annealing 55°C; GLT-1, CTC ACT GAC TGT GTT TGG TG (sense), GAG GTG CCA CCA GAA CTT TC (antisense); 45 cycles, annealing 54°C.

Polyacrylamide Gel Electrophoresis and Western Blot

PAGE was performed according to Decker et al. (2007). Astrocytic monolayers were scrapped from the culture flasks in buffer contained 10 mM Tris, 150 mM NaCl, 2 mM

EDTA, and 2 mM β-mercaptoethanol, at 4°C. Proteins were quantified by Bradford's method (Bradford, 1977). Fifty micrograms protein per sample was loaded in each lane and separated by 10% SDS-PAGE according to Laemmli (1970) and transferred to nitrocellulose membranes (0.45-μm pore size; Gibco) in Tris-glycine buffer (25 mM Tris/HCl, pH 7.0; 192 mM glycine) containing 20% methanol. Equivalent protein amount in all samples was verified by densitometric analysis of the 68-kDa band in the nitrocellulose sheet, as performed previously by Decker and colleagues (2007). Immunodetection was carried out as previously described by Calloni et al. (2001). The membranes were blocked with skimmed milk (1 hr), washed in TBS containing Tween-20 (TBS-T), and incubated overnight with guinea pig anti-rat GLAST (1:10,000) or GLT1 (1:8,000) antibodies (Chemicon). After extensive washing in TBS-T, nitrocellulose membranes were incubated for 1 hr at room temperature with the anti-guinea pig HRP secondary antibody (1:10,000; Sigma). The immunodetection was performed using the chemiluminescence (ECL) Western blot protocol kit (Amersham Life Science, Arlington Heights, IL). The immunodetected protein bands were analyzed by densitometry (Scion Image Software, National Institutes of Health), and the intensity of signals was represented as arbitrary densitometric units.

Statistical Analysis

The significance of differences was evaluated by means of one-way ANOVA with the Newmann-Keuls posttest, using the GraphPad InStat program.

RESULTS

T₃ Treatment Enhances L-[³H]Glutamate Uptake in Astrocytes

Because astrocytes have a crucial role in the clearance of extracellular glutamate, we evaluated whether T₃ affects the astrocytic glutamate transport activity by analyzing the L-[³H]glutamate uptake into control and T₃-treated astrocytic cultures. The concentration-dependent curves of glutamate (25 μM to 100 μM) showed that T₃-treated astrocytes display a significant increase in glutamate uptake compared with control cells (Fig. 1A). Saturation of uptake was observed from 100 to 200 μM (data not shown). The kinetic analysis showed that T₃-treated astrocytes presented higher maximum velocity of uptake (V_{max}) and similar Michaelis-Menten constant (K_M) values in relation to control cultures: V_{max} = 6.54 ± 1.08 and 2.65 ± 0.96 nmol/mg protein/min and K_M = 39.06 ± 5.9 and 36.53 ± 4.8 μM, respectively.

The addition of 50 μM L-PDC, a potent substrate inhibitor of glutamate transport with poor affinity for glutamate receptors (Bridges et al., 1999), inhibited in a similar manner L-[³H]glutamate uptake into both control and T₃-treated astrocytes (86.90% ± 4.60% and 82.40% ± 6.30% of inhibition, respectively). DL-TBOA (50 μM), a blocker of glutamate transporters (Anderson et al., 2001), presented similar values of glutamate uptake inhibition (87.00% ± 8.90% in control astrocytes and

F1

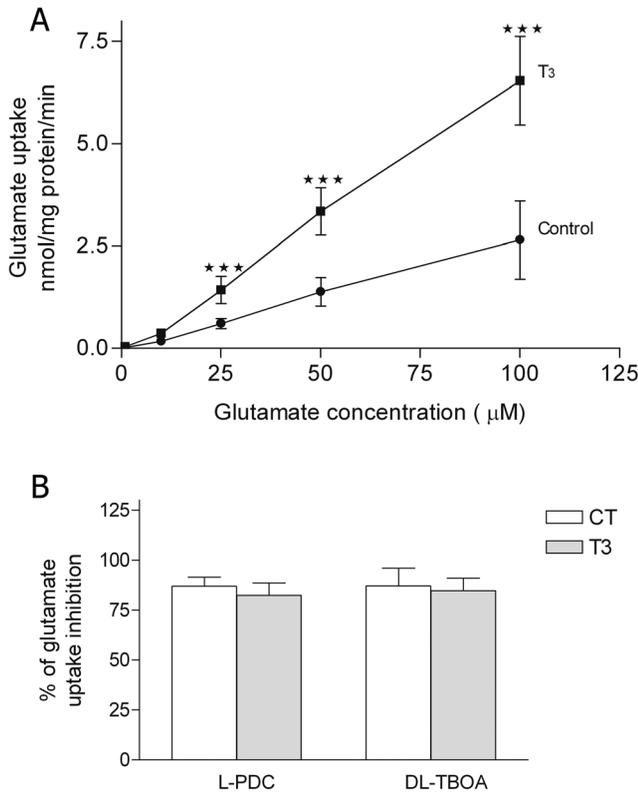


Fig. 1. **A:** T₃ increases Na⁺-dependent L-[³H]glutamate uptake in astrocytes. Cells were treated with T₃ (50 nM) or maintained under control (CT) conditions as described in Materials and Methods. Glutamate (1–100 μM) uptake was assessed after 7 min of incubation. Data are expressed as nmol/mg protein/min of L-[³H]glutamate uptake. Results represent the mean ± SE of three independent experiments carried out in duplicate. ***P < 0.001 vs. control in the same glutamate concentration by ANOVA, followed by Newman-Keuls's test. **B:** Glutamate uptake inhibition promoted by 50 μM L-trans-2,4-pyrrolidine dicarboxylate (L-PDC) or DL-threo-β-benzoyloxyaspartate (DL-TBOA) in control and T₃-treated astrocytes. Results represent the means ± SE of percentage of glutamate uptake inhibition of three independent experiments carried out in duplicate.

84.63% ± 6.40% in T₃-treated cells; Fig. 1B). In summation, these results demonstrate that T₃ treatment significantly increased the concentration-dependent glutamate transport activity without altering the binding properties of the transporters, suggesting that this effect could be accompanied by an increase in the protein level of glutamate transport.

T₃-Induced GLAST and GLT-1 Expression

Immunocytochemical analysis showed that GLAST and GLT-1 were distributed throughout the cells in both control and T₃-treated astrocytes, without an apparent alteration in their organization (Fig. 2A–F). We next investigated a possible up-regulation of GLAST and GLT-1 expression by analyzing the mRNA and protein levels in control and T₃-treated astrocytes. RT-PCR

assay suggested that T₃ treatment induced an increase in both GLAST and GLT-1 mRNA levels in 95% and 49%, respectively (Fig. 3A). Because translation can be inhibited by several mechanisms, we verified the protein expression of these glutamate transporters. Similarly, Western blot analysis showed that T₃ treatment significantly increased the protein levels of both GLAST and GLT-1 (in 86% and 31%, respectively; Fig. 3B–D). However, short periods of T₃-stimulation (3 hr) did not significantly alter the levels of GLAST mRNA (6% ± 1.5% of increase in relation to control cells).

T₃ Protects Astrocytes From Glutamate Toxicity

High extracellular glutamate concentrations induce swelling and death of cortical astrocytes in cultures (Chen et al., 2000). To examine whether T₃ could promote cerebellar astrocyte protection against glutamate, we treated both control and T₃-treated astrocytes with gliotoxic concentrations of glutamate. MTT assay showed that L-glutamate at the concentration of 10 mM (but not at 1 mM) significantly reduced the viability of control cells (Fig. 4A). On the other hand, the addition of L-glutamate at each tested concentration did not alter cell viability of T₃-treated astrocytes. In addition, the proportion of dead cells was analyzed by incubation with Sytox green (Fig. 4B). L-glutamate treatment (10 mM) induced a significant astrocytic loss in control cultures but did not promote significant cell death in T₃-treated astrocytes, demonstrating that T₃ treatment increases astrocyte survival and protects against glutamate-induced cell death. These data are in accordance with our previous results, in which T₃ improves the microenvironment for astrocytes and consequently for neurons (Trentin et al., 2003).

T₃-Treated Astrocytes Improve Neuron Viability to Glutamate Toxicity

In previous studies, we have demonstrated that T₃ improves neuronal development mediated by the astrocytic production of ECM proteins and growth factors such as FGF2 (Trentin et al., 2003). Because this effect is accompanied by increased neuronal viability, we hypothesized that T₃-treated astrocytes could also promote neuroprotection against glutamate challenge. To address this question, neurons were cocultured on control or T₃-treated astrocytes and then exposed to an excitotoxic insult with glutamate (50, 100, or 200 μM; Fig. 5A–H). Neurons cocultured on T₃-treated astrocytes remained viable in a higher proportion than control astrocytes after glutamate challenge, although the neuronal number was progressively reduced because of the increased glutamate concentration (Fig. 5D). Interestingly, even at the higher neurotoxic glutamate concentration of 200 μM, the number of neurons cultured on T₃-treated astrocytes was twofold higher than that observed in control cultures (Fig. 6). These results show that T₃ increases the neuronal viability against glutamate

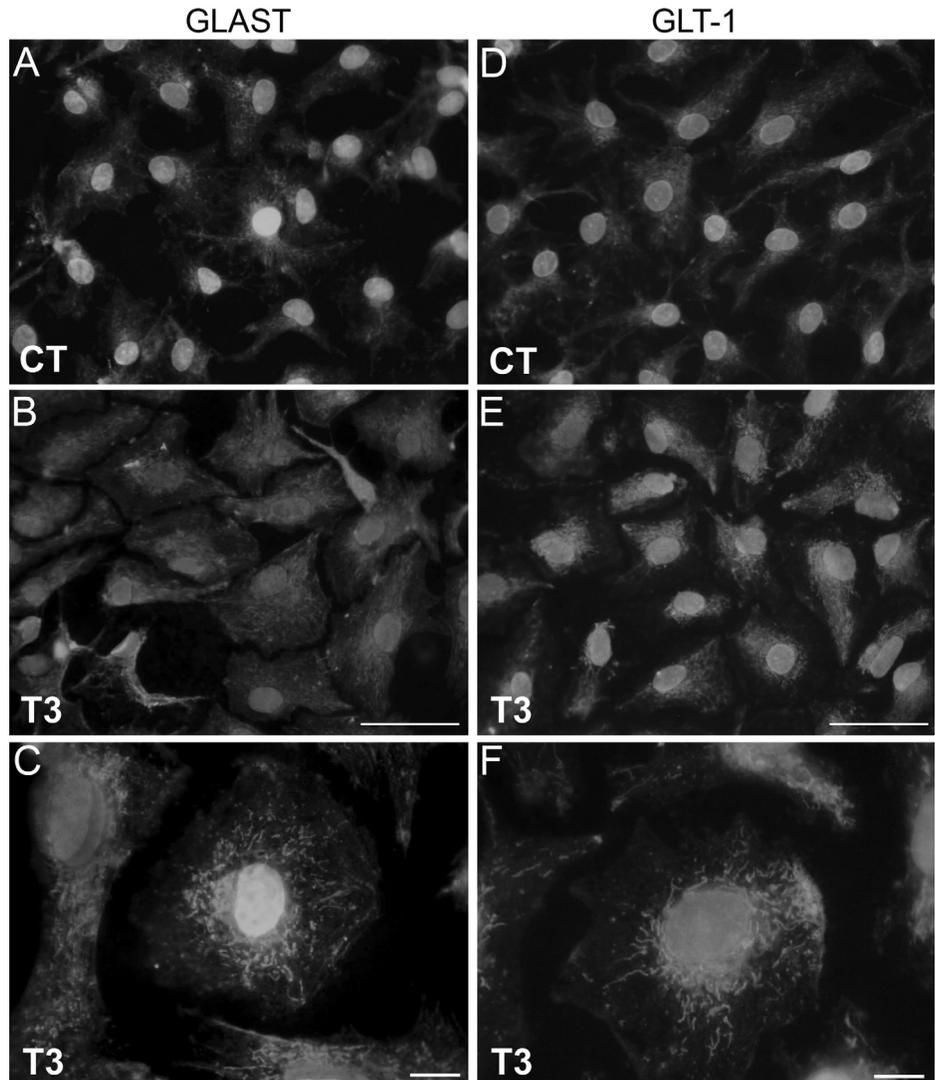


Fig. 2. GLAST (A–C) and GLT-1 (D–F) distribution in control (A,D) and T₃-treated (50 nM; B,C,E,F) astrocytes. Immunofluorescence for GLAST and GLT-1 were performed as described in Materials and Methods. Cell nuclei were stained with Hoescht. Representative pictures of three independent experiments. Scale bars = 50 μm in B (applies to A,B); 10 μm in C,F; 50 μm in E (applies to D,E). [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www.interscience.wiley.com.]

challenge mediated by astrocytes, suggesting its possible additional role in neuroprotection.

DISCUSSION

Thyroid hormone (T₃) has been demonstrated to regulate several aspects of astrocyte differentiation and maturation, including the production of extracellular matrix proteins and growth factors. T₃ induces cerebellar astrocytes to secrete growth factors, mainly FGF2, and increases the expression and reorganization of laminin and fibronectin, producing a high-quality substrate for neuronal differentiation and survival (Trentin et al., 2003). Indeed, an indirect mechanism of thyroid hormone mediated by astrocytes on neuronal development has been proposed (for review see Trentin, 2006). In spite of the well-documented direct role of T₃ in neuronal cells for normal brain development and metabolism, the precise physiological function of this hormone on astrocytes has not been fully elucidated. Here, we

showed at first hand that glutamate uptake is regulated by T₃ in cultured cerebellar astrocytes from newborn rats. The increased activity of astrocytic glutamate transporters induced by T₃ treatment of astrocytes was greatly reduced by adding glutamate transporter inhibitors. Our results demonstrated that T₃ treatment increases mRNA and protein levels of both astrocytic glutamate transporters GLAST and GLT-1. T₃-treated astrocytes were more resistant to glutamate challenge than control cells. In addition, neuronal viability against glutamate toxicity was increased in cocultures on T₃-treated astrocytes.

Glutamate is the main excitatory neurotransmitter in the mammalian CNS, but excessive activation of glutamate receptors can cause excitotoxicity (Meldrum, 2000; Danbolt, 2001). The removal of L-glutamate from the extracellular compartment occurs mainly through the activity of two high-affinity, sodium-dependent astrocytic glutamate transporters, GLT-1 and GLAST (Rothstein et al., 1996). Antisense nucleotides and target gene disruption showed that GLAST and GLT-1 maintain

6 Mendes-de-Aguiar et al.

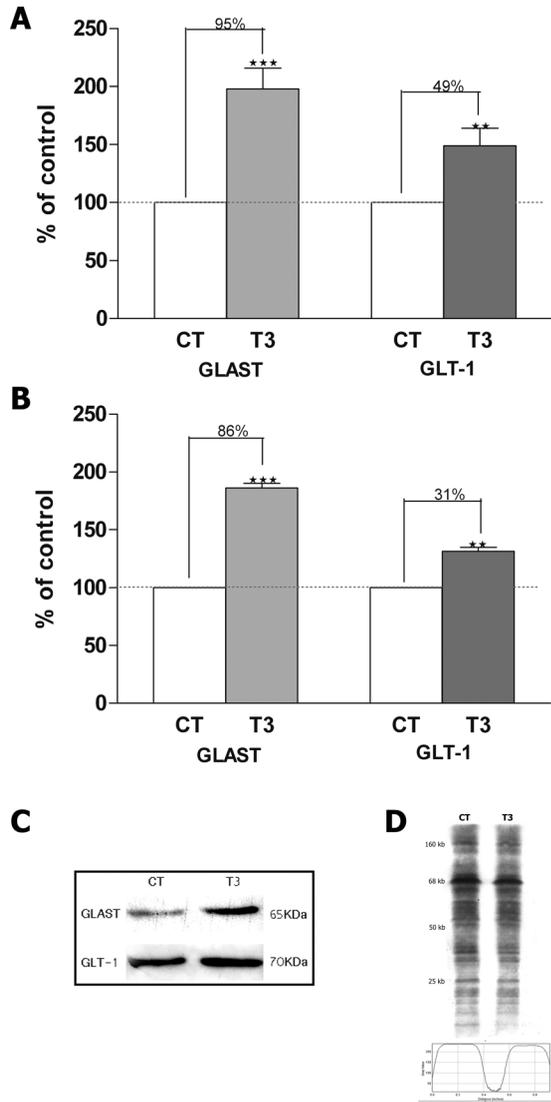


Fig. 3. T₃ effects on astrocytic glutamate transporters expression. **A:** Semiquantitative RT-PCR analysis of GLAST and GLT-1 mRNA expression in T₃-treated (50 nM) astrocytes and in control cells. The values were standardized by GAPDH and are represented as means ± SE of percentage of the controls of three independent experiments. **B:** Quantitative analysis of GLAST and GLT-1 immunodetected bands, expressed as percentage of the controls (considered as 100%). **C:** Western blot analysis of GLAST and GLT-1 protein expression in control and T₃-treated (50 nM) astrocyte cultures. **D:** To confirm the proteins extracts loading in the slab gel, densitometric analysis of a 68-kDa band in all samples was performed. ***P* < 0.05, ****P* < 0.001 vs. controls by ANOVA followed by Newman-Keuls's test.

low extracellular concentrations of glutamate, thereby protecting neurons against excitotoxicity in vivo and modulating glutamate transmission (Rothstein et al., 1996; Tanaka et al., 1997; Watase et al., 1998). This transport is also necessary for providing intracellular glutamate, which supports essential metabolic pathways such as energy production and synthesis of glutathione, a

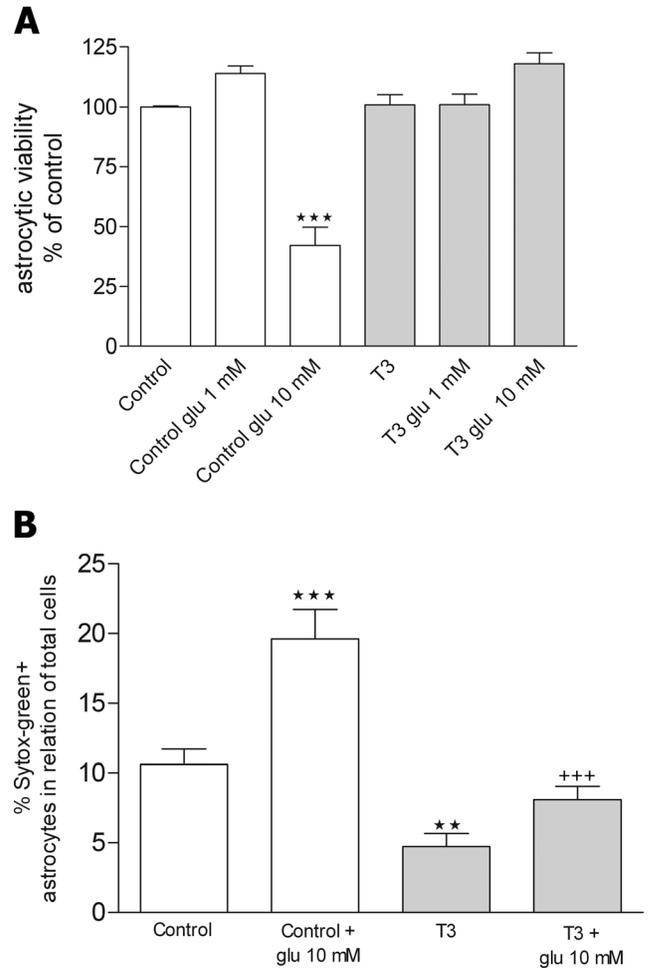


Fig. 4. T₃ protects astrocytes against glutamate challenge. **A:** Control or T₃-treated (50 nM) astrocyte viability was accessed by MTT assay after 24 hr of incubation with glutamate (1 or 10 mM). Data are expressed as percentage of control and represent the means ± SE of three independent experiments performed in quadruplicate. ****P* < 0.001 vs. all other conditions by ANOVA followed by Newman-Keuls's test. **B:** Astrocyte cell death was evaluated by Sytox green incorporation 24 hr after incubation with glutamate (10 mM) as described in Materials and Methods. Sytox green-positive cells were counted in at least eight random fields per culture from three independent experiments performed in duplicate. Results are expressed as means ± SE. ***P* < 0.05, ****P* < 0.001 vs. control; †††*P* < 0.001 vs. control + glu 10 mM by ANOVA, followed by Newman-Keuls's test.

tripeptide with crucial antioxidant functions in the CNS (Danbolt, 2001; Re et al., 2003). There is increasing evidence that the perturbation of glutamatergic transmission by a decrease or loss of glutamate transporter activity or expression can be regarded as a major cause for a number of neurological disorders, being crucial for distinct neurodegenerative diseases (Danbolt, 2001). Although neuron degeneration and death are the ultimate consequences of the pathological process, it is now widely accepted that alterations in the function of

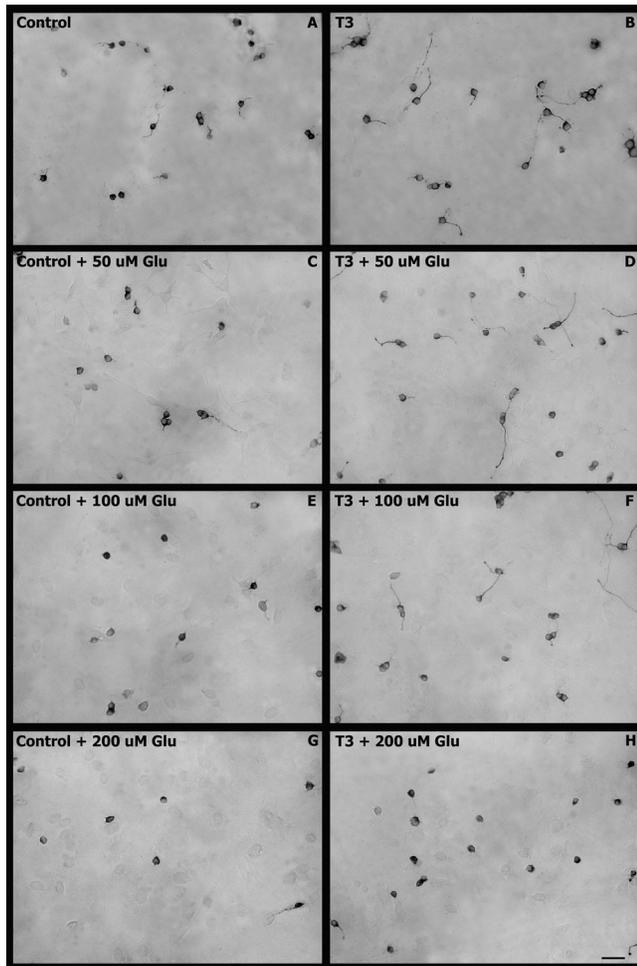


Fig. 5. T₃-treated astrocytes promote neuron survival after a glutamate challenge. Glutamate (50, 100, or 200 μM) was added 3 hr after neuronal plating, and the cocultures were maintained for 24 hr. **A–H:** Neurons were identified by immunocytochemistry using anti-β-tubulin III antibody as described in Materials and Methods. Neurons were plated on control astrocytes (A,C,E,G) or T₃-treated (50 nM) astrocytes (B,D,F,H). Scale bar = 50 μm.

surrounding glial cells are key features in the progression of these disorders.

Chen et al. (2000) have demonstrated that stimulation of astrocytes with L-glutamate results in cell swelling triggered by oxidative stress, which causes cellular damage to astrocytes. Astrocyte death may also occur via an oxidative toxicity linked to depletion of a compartmentalized intracellular pool of glutamate specifically fed by glutamate uptake, essential for maintaining astrocytic glutathione levels (Re et al., 2006). In spite of some controversial reports on the exact mechanism of glutamate-induced astrocytic toxicity, glutathione depletion seems to be involved. Considering that glutamate transporters are also the main carriers of cysteine uptake into astrocytes (Aoyama et al., 2006), modulation of glutamate transporter activity is a key factor in astrocytic as

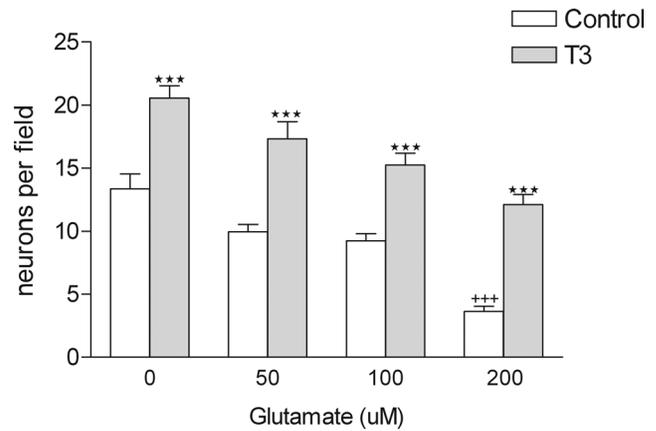


Fig. 6. Graphic representation of the neuron number on cocultures with T₃-treated (50 nM) or control astrocytes after a glutamate challenge (50, 100, or 200 μM). The number of neurons was accessed by counting at least eight fields in each culture condition of three independent experiments. Results are expressed as means ± SE and were analyzed by ANOVA, followed by Newman-Keuls's test. ****P* < 0.001 vs. the control for each glutamate concentration; †††*P* < 0.001 vs. all other controls.

well as neuronal survival. On the other hand, hypothyroidism was found to be associated with a marked oxidative stress related to an aberrant accumulation of neurofilament in hypothyroid neurons and to a decline in the activity of glutamate cysteine ligase, the rate-limiting enzyme for the biosynthesis of glutathione (Rahaman et al., 2001). Dasgupta et al. (2007) have demonstrated that the treatment of astrocytes with thyroid hormones increases the biosynthesis of glutathione by up-regulating glutamate cysteine ligase. Accordingly, in our experiments, we verified that T₃ protects cerebellar astrocytes against glutamate, which is accompanied by increased expression and activity of glutamate transporters. Therefore, astrocytic protection induced by T₃ could be related to an improved glutamate and cysteine uptake or up-regulation of glutathione synthesis, or both, thus increasing the antioxidant defenses in astrocytes.

It has been suggested that the expression of the glial glutamate transporters is differently regulated during development (Furuta et al., 1997). Recently, estrogen has been demonstrated to increase the mRNA and protein levels of GLAST and GLT-1 in astrocytes cultured from neonatal mouse midbrain (Pawlak et al., 2005). Furthermore, in the present work, we demonstrate that T₃ treatment enhances the astrocyte production of GLAST and GLT-1 and promotes an increase in glutamate uptake, resulting in both astrocyte and neuronal resistance to glutamate toxicity. Although the immunocytochemistry assay was not sufficient to confirm the subcellular localization of GLAST and GLT-1 in the time analyzed, the demonstration of an increased glutamate uptake induced by T₃ suggests a functional localization of these transporters in the astrocytic plasmatic membranes. Moreover, T₃ treatment induced increased glutamate transporters activity without altering the K_M values,

which is consistent with the same inhibition profile observed in T_3 -treated or control cultures, showing that no binding properties of the transporters were altered.

It has been recently demonstrated that acute administration of T_3 (at concentrations of 10, 50, or 100 μM) protects hippocampal neurons from glutamate toxicity through a rapid nongenomic regulation (Losi et al., 2007). Nevertheless, in our experiments we observed alterations in mRNA levels of GLAST and GLT-1, so we suggest that the thyroid hormone effect in the expression of astrocytic glutamate transporters could be through a genomic mechanism, although the nongenomic regulation cannot be excluded. In addition, in the cocultures experiments, the astrocyte conditioned medium was replaced by fresh DMEM-F12 before neuronal plating, avoiding an eventual direct effect of T_3 or T_3 -induced astrocytic growth factors on neuronal survival. Therefore, the increased neuronal viability observed on T_3 -treated astrocyte monolayers (Fig. 6) could be due to the reduced extracellular glutamate concentration promoted by the improved astrocytic glutamate uptake. Moreover, T_3 has been shown to act via a cyclic AMP-dependent signaling pathway (Gomes et al., 1999; Martinez and Gomes, 2005; Sukocheva and Carpenter, 2006), and, given that GLT-1 and GLAST expression and function are regulated by cyclic AMP (Swanson et al., 1997), this might be a putative alternative pathway of T_3 -induced increased astrocytic glutamate uptake.

The expression of glutamate transporters may also be regulated in astrocytes by growth factors. EGF has been shown to induce GLT-1 expression in immature astrocytes through phosphatidylinositol 3-kinase and transcription factor nuclear factor- κB (NF- κB) pathways (Zelenaia et al., 2000). EGF, FGF, and insulin-like growth factor (IGF) enhance glutamate transport activity and the expression of GLAST mRNA and protein in neonatal rat astrocytes in culture (Suzuki et al., 2001). Moreover, we and other authors have demonstrated that T_3 induces cerebellar astrocytes to secrete a combination of growth factors, including FGF2 (Trentin et al., 2001) and EGF (Gomes et al., 1999), that act autocrinally, influencing different aspects of astrocyte and neuronal differentiation and function (Trentin, 2006). In addition, in the present work, T_3 treatment for short periods did not significantly increase the levels of GLAST mRNA, indicating that the T_3 effects in regulating the expression of astrocytic glutamate transporters could be indirect and mediated by the secretion of growth factors, such as FGF2 and EGF.

In this paper, we report for the first time that T_3 promotes up-regulation of the astrocytic glutamate transporters GLAST and GLT-1, resulting in increased glutamate uptake and therefore increased astrocytic and neuronal viability against glutamate toxicity (Fig. 7). This effect of T_3 may be mediated by the secretion of growth factors, such as FGF2 or EGF. Insofar as the regulation of the extracellular glutamate levels represents an important mechanism in neuroprotection, we propose a new role for T_3 in the improvement of astrocytic microenvi-

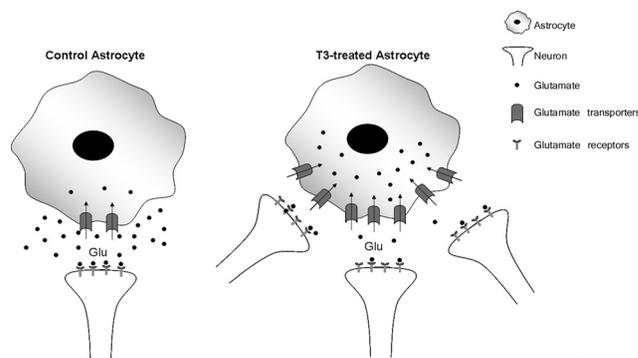


Fig. 7. Model for the thyroid hormone effect on neuroprotection mediated by astrocytes. Thyroid hormone increases the synthesis of the glutamate transporters GLAST and GLT-1 in cerebellar astrocytes, resulting in enhanced glutamate uptake by these cells and consequently promoting neuronal survival.

ronment in order to promote neuronal development and protection.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Prof. Vivaldo Moura Neto for constant encouragement. We also thank Tharine Dal-Cim for assistance with Western blot analysis and Tiago Góss dos Santos for discussions.

REFERENCES

- Anderson CM, Bridges JR, Chamberlin RA, Shimamoto K, Yasuda-Kamatani Y, Swanson RA. 2001. Differing effects of substrate and nonsubstrate transport inhibitors on glutamate uptake reversal. *J Neurochem* 79:1207–1216.
- Aoyama K, Suh SW, Hamby AM, Liu J, Chan WY, Chen Y, Swanson RA. 2006. Neuronal glutathione deficiency and age-dependent neurodegeneration in the EAAC1 deficient mouse. *Nat Neurosci* 9:119–126.
- Bradford MM. 1977. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254.
- Bridges RJ, Kavanaugh MP, Chamberlin AR. 1999. A pharmacological review of competitive inhibitors and substrates of high-affinity, sodium-dependent glutamate transport in the central nervous system. *Curr Pharm Des* 5:363–379.
- Calloni GW, Alvarez-Silva M, Vituri C, Trentin AG. 2001. Thyroid hormone deficiency alters extracellular matrix protein expression in rat brain. *Brain Res Dev Brain Res* 126:121–124.
- Chen CJ, Liao SL, Kuo JS. 2000. Gliotoxic action of glutamate on cultured astrocytes. *J Neurochem* 75:1557–1565.
- Cole SP. 1986. Rapid chemosensitivity testing of human lung tumor cells using the MTT assay. *Cancer Chemother Pharmacol* 17:259–263.
- Danbolt NC. 2001. Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* 65:1–105.
- Dasgupta A, Das S, Sarkar PK. 2007. Thyroid hormone promotes glutathione synthesis in astrocytes by up regulation of glutamate cysteine ligase through differential stimulation of its catalytic and modulator subunit mRNAs. *Free Radic Biol Med* 42:617–626.
- Decker H, Francisco SS, Mendes de Aguiar CBN, Romão LF, Boeck CR, Trentin AG, Moura Neto V, Tascia CI. 2007. Guanine derivatives modulate extracellular matrix proteins organization and improve neuron-astrocyte co-culture. *J Neurosci Res* (in print).
- Fields RD, Stevens-Graham B. 2002. Neuroscience—new insights into neuron-glia communication. *Science* 298:556–562.

F7

T₃ Increases Astrocytic Glutamate Uptake 9

- Furuta A, Rothstein JD, Martin LJ. 1997. Glutamate transporter protein subtypes are expressed differentially during rat CNS development. *J Neurosci* 17:8363–8375.
- Gomes FCS, Maia CG, Menezes JRL, Moura Neto V. 1999. Cerebellar astrocytes treated by thyroid hormone induce neuronal proliferation. *Glia* 25:247–255.
- Guillet BA, Velly LJ, Canolle B, Masmajeun FM, Nicoullon AL, Pisano P. 2005. Differential regulation by protein kinases of activity and cell surface expression of glutamate transporters in neuron-enriched cultures. *Neurochem Int* 46:337–346.
- Konig S, Moura Neto V. 2002. Thyroid hormone actions on neural cells. *Cell Mol Neurobiol* 22:517–544.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685.
- Liesi P, Kirkwood T, Vaheri A. 1986. Fibronectin is expressed by astrocytes cultured from embryonic and early postnatal rat brain. *Exp Cell Res* 163:175–185.
- Liesi P, Hager G, Dodt HU, Seppala I, Zieglansberger W. 1995. Domain-specific antibodies against the B2 chain of laminin inhibit neuronal migration in the neonatal rat cerebellum. *J Neurosci Res* 40:199–206.
- Lima FRS, Trentin AG, Rosenthal D, Chagas C, Moura Neto V. 1997. Thyroid hormone induces protein secretion and morphological changes in astrocytic cells with an increase in expression of glial fibrillary acid protein. *J Endocrinol* 154:167–175.
- Losi G, Garzon, G, Puia G. 2007. Nongenomic regulation of glutamatergic neurotransmission in hippocampus by thyroid hormones. *Neuroscience* doi: 10.1016.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265–275.
- Martinez R, Gomes FCA. 2002. Neuritogenesis induced by thyroid hormone-treated astrocytes is mediated by epidermal growth factor/mitogen-activated protein kinase-phosphatidylinositol 3-kinase pathways and involves modulation of extracellular matrix proteins. *J Biol Chem* 277:49311–49318.
- Martinez R, Gomes FCA. 2005. Proliferation of cerebellar neurons induced by astrocytes treated with thyroid hormone is mediated by a cooperation between cell contact and soluble factors and involves the epidermal growth factor–protein kinase A pathway. *J Neurosci Res* 80:341–349.
- Meldrum BS. 2000. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *J Nutr* 130:1007S–1015S.
- Mendes de Aguiar CB, Garcez RC, Alvarez-Silva M, Trentin AG. 2002. Undersulfation of proteoglycans and proteins alter C6 glioma cells proliferation, adhesion and extracellular matrix organization. *Int J Dev Neurosci* 20:563–571.
- Newman EA. 2003. New roles for astrocytes: regulation of synaptic transmission. *Trends Neurosci* 26:536–542.
- Pawlak J, Brito V, Küppers E, Beyer C. 2005. Regulation of glutamate transporter GLAST and GLT-1 expression in astrocytes by estrogen. *Brain Res Mol Brain Res* 138:1–7.
- Rahaman SO, Ghosh S, Mohanakumar KP, Das S, Sarkar PK. 2001. Hypothyroidism in the developing rat brain is associated with marked oxidative stress and aberrant intraneuronal accumulation of neurofilaments. *Neurosci Res* 40:273–279.
- Re DB, Boucraut J, Samuel D, Birman S, Kerkerian-Le Goff L, Had-Aissoune L. 2003. Glutamate transport alteration triggers differentiation-state selective oxidative death of cultured astrocytes: a mechanism different from excitotoxicity depending on intracellular GSH contents. *J Neurochem* 85:1159–1170.
- Re DB, Nafia I, Melon C, Shimamoto K, Kerkerian-Le Goff L, Had-Aissoune L. 2006. Glutamate leakage from a compartmentalized intracellular metabolic pool and activation of the lipoxygenase pathway mediate oxidative astrocyte death by reversed glutamate transport. *Glia* 54:47–57.
- Rothstein JD, Dykes-Hoberg M, Pardo CA, Bristol LA, Jin L, Kuncl RW, Kanai Y, Hediger MA, Wang Y, Schielke JP, Welty DF. 1996. Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron* 16:675–686.
- Sukocheva, Carpenter. 2006. Anti-apoptotic effects of 3,5,3'-tri-iodo-thyronine in mouse hepatocytes. *J Endocrinol* 191:447.
- Suzuki K, Ikegaya Y, Matsuura S, Kanai Y, Endou H, Matsuki N. 2001. Transient up-regulation of the glial glutamate transporter GLAST in response to fibroblast growth factor, insulin-like growth factor and epidermal growth factor in cultured astrocytes. *J Cell Sci* 114:3717–3725.
- Swanson RA, Liu J, Miller JW, Rothstein JD, Farrell K, Stein BA, Longuemare MC. 1997. Neuronal regulation of glutamate transporter subtype expression in astrocytes. *J Neurosci* 17:932–940.
- Tanaka K, Watase K, Manabe T, Yamada K, Watanabe M, Takahashi K, Iwama H, Nishikawa T, Ichihara N, Kikuchi T, Okuyama S, Kawashima N, Hori S, Takimoto M, Wada K. 1997. Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. *Science* 276:1699–1702.
- Tasca CI, Santos TG, Tavares RG, Battastini AMO, Rocha JBT, Souza DO. 2004. Guanine derivatives modulate L-glutamate uptake into rat brain synaptic vesicles. *Neurochem Int* 44:423–431.
- Tavares RG, Tasca CI, Santos CES, Alves LB, Porciúncula LO, Emanuelli T, Souza DO. 2002. Quinolinic acid stimulates synaptosomal glutamate release and inhibits glutamate uptake into astrocytes. *Neurochem Int* 40:621–627.
- Trentin AG. 2006. Thyroid hormone and astrocyte morphogenesis. *J Endocrinol* 189:189–197.
- Trentin AG, Moura Neto V. 1995. T₃ affects cerebellar astrocyte proliferation, GFAP and fibronectin organization. *Neuroreport* 6:293–296.
- Trentin AG, Rosenthal D, Moura Neto V. 1995. Thyroid hormone and conditioned medium effects on astroglial cells from hypothyroid and normal rat brain: factor secretion, cell differentiation and proliferation. *J Neurosci Res* 41:409–417.
- Trentin AG, Alvarez-Silva M, Moura Neto V. 2001. The thyroid hormone induces cerebellar astrocytes and C6 glioma cells to secrete mitogenic growth factors. *Am J Physiol* 281:E1088–E1094.
- Trentin AG, Mendes de Aguiar CBN, Garcez RC, Alvarez-Silva M. 2003. Thyroid hormone modulates the extracellular matrix organization and expression in cerebellar astrocyte: effects on astrocyte adhesion. *Glia* 42:359–369.
- Watase K, Hashimoto K, Kano M, Yamada K, Watanabe M, Inoue Y, Okuyama S, Sakagawa T, Ogawa S, Kawashima N, Hori S, Takimoto M, Wada K, Tanaka K. 1998. Motor discoordination and increased susceptibility to cerebellar injury in GLAST mutant mice. *Eur J Neurosci* 10:976–988.
- Zelenaia O, Schlag BD, Gochenauer GE, Ganel R, Song W, Beesley JS, Grinspan JB, Rothstein JD, Robinson MB. 2000. Epidermal growth factor receptor agonists increase expression of glutamate transporter GLT-1 in astrocytes through pathways dependent on phosphatidylinositol 3-kinase and transcription factor NF-kappaB. *Mol Pharmacol* 57:667–678.

AQ1