

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

Estudo da fosforilação e estrutura de filamentos intermediários em astrócitos permeabilizados com digitonina

Juliana Damm Karl

Orientador
Carlos Alberto Gonçalves

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica

Porto Alegre
2000

ÍNDICE GERAL

I. INTRODUÇÃO	1
I.1. ORGANIZAÇÃO CELULAR DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL (SNC)	11
I.1.1. NEURÔNIOS	12
I.1.2. NEUROGLIA	13
I.1.2.1. Astrócitos	13
I.1.2.2. Oligodendrócitos	15
I.1.2.3. Microglia	15
I.2. PROTEÍNAS MARCADORAS ASTROCÍTICAS	16
I.2.1. GFAP	16
I.2.2. VIMENTINA	18
I.2.3. S100B	18
I.3. FOSFORILAÇÃO DE PROTEÍNAS CEREBRAIS	19
I.3.1. PROTEÍNAS QUINASES	20
I.3.1.1. Proteínas quinases nos astrócitos	22
I.3.2. PROTEÍNAS FOSFATASES	23
I.3.2.1. Proteínas fosfatases em astrócitos	24
I.4. METODOLOGIAS EMPREGADAS NO ESTUDO DA FOSFORILAÇÃO DE PROTEÍNAS CEREBRAIS	24
I.4.1. CÉLULAS INTACTAS	25
I.4.1.1. Fatias cerebrais	26
I.4.1.2. Cultura de astrócitos	26
I.4.2. FRAÇÕES SUBCELULARES (CITOESQUELETO)	27
I.5. MODELO PROPOSTO: PERMEABILIZAÇÃO DE ASTRÓCITOS EM CULTURA COM DIGITONINA	28
I.5.1. ESCOLHA DO MÉTODO DE PERMEABILIZAÇÃO	28
I.5.1.1. Eletroporação	29
I.5.1.2. Toxinas bacterianas	30
I.5.1.3. Detergentes (Digitonina e Saponina)	30
I.5.2. VANTAGENS DO MÉTODO ESCOLHIDO	32
I.5.3. APLICAÇÕES	32
I.5.4. PARÂMETROS CONSIDERADOS NA PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA	32
I.5.5. MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO DA PERMEABILIZAÇÃO CELULAR	33
II. OBJETIVOS	35
III. MATERIAIS E MÉTODOS	37
III.1. CULTURA PRIMÁRIA DE ASTRÓCITOS (DE ACORDO COM GOTTFRIED, 1996)	37
III.1.1. MATERIAIS	37
III.1.2. MÉTODOS	38
III.1.2.1. Preparo das placas com substrato de poli-L-lisina	38
III.1.2.2. Cultura de astrócitos hipocampais	39
III.1.2.3. Obtenção dos hipocampus	39

III.1.2.4.	Dissociação celular mecânica	39
III.1.2.5.	Contagem das células e plaqueamento	40
III.2.	PERMEABILIZAÇÃO DE ASTRÓCITOS EM CULTURA COM DIGITONINA	42
III.2.1.	MATERIAIS	42
III.2.2.	MÉTODOS	43
III.2.2.1.	Permeabilização	43
III.2.2.2.	Avaliação da permeabilização celular por exclusão ao azul de tripan	43
III.3.	FOSFORILAÇÃO DE PROTEÍNAS EM ASTRÓCITOS PERMEABILIZADOS	43
III.3.1.	MATERIAIS	44
III.3.2.	MÉTODOS	44
III.3.2.1.	Marcação das células permeabilizadas com [γ - 32 P]ATP	44
III.3.2.2.	Marcação de células intactas com 32 P-fosfato	45
III.4.	ELETROFORESE UNIDIMENSIONAL	45
III.4.1.	MATERIAIS	45
III.4.2.	MÉTODOS	46
III.4.2.1.	Confecção dos géis	46
III.4.2.2.	Eletroforese	46
III.4.2.3.	Fixação e secagem do gel	46
III.4.2.4.	Exposição autoradiográfica do gel	47
III.4.2.5.	Revelação do filme	47
III.4.2.6.	Exposição do gel para leitura no PhosphorImager	47
III.4.2.7.	Coloração do gel com azul de Comassie	47
III.5.	ELETROTRANSFERÊNCIA E IMUNODETECÇÃO PARA GFAP E VIMENTINA	48
III.5.1.	MATERIAIS	48
III.5.2.	MÉTODOS	48
III.5.2.1.	Eletrotransferência para membrana de nitrocelulose	48
III.5.2.2.	Imunodeteção	49
III.6.	QUANTIFICAÇÃO DE S100B PELO MÉTODO DE ELISA	49
III.6.1.	MATERIAIS	49
III.6.2.	MÉTODOS	50
III.6.2.1.	ELISA para S100B	50
III.7.	IMUNOCITOQUÍMICA PARA GFAP E S100B	50
III.7.1.	MATERIAIS	51
III.7.2.	MÉTODOS	51
III.7.2.1.	Imunocitoquímica	51
III.7.2.2.	Revelação	52

IV. RESULTADOS **54**

IV.1.	CULTURAS	54
IV.2.	PERMEABILIZAÇÃO DE ASTRÓCITOS COM DIGITONINA	56
IV.3.	ESTUDO DO MEIO DE PERMEABILIZAÇÃO	58
IV.4.	EFEITO DO Ca^{2+} E OUTROS CÁTIOS DIVALENTES SOBRE A PERMEABILIZAÇÃO	59
IV.5.	EFEITO DO ATP SOBRE A PERMEABILIZAÇÃO	63
IV.6.	EFEITO DO MEIO DE PERMEABILIZAÇÃO NA FOSFORILAÇÃO DE PROTEÍNAS	65
IV.7.	COMPARAÇÃO ENTRE MARCAÇÃO REDIOATIVA EM ASTRÓCITOS INTACTOS E PERMEABILIZADOS	67
IV.8.	EFEITO DO Ca^{2+} E AMPc SOBRE A FOSFORILAÇÃO DE GFAP E VIMENTINA EM CÉLULAS PERMEABILIZADAS	69
IV.9.	AVALIAÇÃO DA PERDA PROTÉICA DECORRENTE DA PERMEABILIZAÇÃO	71

IV.10.	IMUNOCITOQUÍMICA PARA GFAP	73
IV.11.	IMUNOCITOQUÍMICA PARA S100B	75
V. DISCUSSÃO		76
V.1.	CULTURAS	76
V.2.	ESCOLHA DO MÉTODO DE PERMEABILIZAÇÃO CELULAR	76
V.3.	PADRONIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE PERMEABILIZAÇÃO COM A DIGITONINA	79
V.4.	POR QUE PERMEABILIZAR ASTRÓCITOS?	79
V.5.	O MEIO DE PERMEABILIZAÇÃO	82
V.6.	NUCLEOTÍDIOS VS. PERMEABILIZAÇÃO	85
V.7.	FOSFORILAÇÃO DE PROTEÍNAS EM ASTRÓCITOS PERMEABILIZADOS	86
V.8.	PERDA DE PROTEÍNAS NA PERMEABILIZAÇÃO	88
V.9.	ESTRUTURA DOS FILAMENTOS INTERMEDIÁRIOS EM ASTRÓCITOS PERMEABILIZADOS COM DIGITONIA	89
VI. CONCLUSÕES		90
VI.1.	PERMEABILIZAÇÃO	90
VI.2.	FOSFORILAÇÃO	90
VI.3.	PERDA PROTÉICA	90
VI.4.	IMUNOCITOQUÍMICA	91
VII. CONCLUSÃO GERAL		91
VIII. BIBLIOGRAFIA		92

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura dos filamentos intermediários do tipo III. _____	18
Figura 2. Esquema do procedimento de cultura de astrócitos segundo Gottfried e colaboradores . _____	42
Figura 3 . Representação esquemática da metodologia utilizada neste trabalho. _____	53
Figura 4. Fotografia de uma cultura intacta e uma cultura permeabilizada. _____	55
Figura 5. Efeito da concentração e tempo de incubação com digitonina na percentagem de astrócitos permeabilizados _____	57
Figura 6. Efeito dos diferentes meios na permeabilização de astrócitos em cultura com digitonina. _____	1
Figura 7. Efeito do Ca^{2+} na permeabilização de astrócitos em cultura com digitonina. _____	60
Figura 8. Efeito de cátions divalentes na permeabilização de astrócitos em cultura com digitonina. _____	62
Figura 9 . Efeito do ATP na permeabilização de astrócitos em cultura com digitonina. _____	64
Figura 10. Efeito dos diferentes meios de permeabilização na fosforilação de proteínas em astrócitos em cultura. _____	66
Figura 11. Perfil eletroforético de fosfosfoproteínas em cultura de astrócitos intactos e permeabilizados. _____	68
Figura 12. Efeito de Ca^{2+} e AMPc na fosforilação de proteínas em astrócitos permeabilizados com digitonina. _____	70
Figura 13. Avaliação da perda protéica após a permeabilização. _____	72
Figura 14. Imunocitoquímica para GFAP. _____	74
Figura 15 Imunocitoquímica para S100B. _____	75

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Tamanho do poro e peso molecular das moléculas permeáveis nos diferentes métodos de permeabilização.	29
Tabela 2. Diferença no conteúdo de colesterol em diferentes membranas celulares	31
Tabela 3. Tabela comparativa entre as condições de incubação radioativa mas diferentes metodologias empregadas no estudo da fosforilação de GFAP e vimentina.	87

Resumo

O dinâmico processo de polimerização e despolimerização dos filamentos intermediários de astrócitos é modulado principalmente por fosforilação da proteína ácida fibrilar glial (GFAP). Os sítios de fosforilação da GFAP estão localizados na porção N-terminal, onde atuam proteínas quinases dependentes de AMPc e Ca^{2+} . Este processo vem sendo investigado em fatias cerebrais, culturas de astrócitos, frações citoesqueléticas ou sistemas purificados. Neste trabalho estamos descrevendo uma nova técnica para o estudo do sistema fosforilante da GFAP que consiste na permeabilização de astrócitos em cultura com digitonina, Este modelo permite o acesso aos sítios intracelulares mantendo preservada, ainda que parcialmente, a compartimentalização celular.

As condições de permeabilização foram estabelecidas com base na exclusão ao azul de Tripán. A incubação das células com AMPc e Ca^{2+} promoveram o aumento da fosforilação da GFAP, enquanto imunocitoquímica com anti-GFAP mostrou que em condições basais astrócitos permeabilizados mantêm sua morfologia protoplasmática típica e apresenta a estrutura dos filamentos intermediários preservada. Ao incubar os astrócitos permeabilizados com AMPc estes filamentos aparentemente condensaram formando longos processos.

Estes resultados sugerem que esta técnica tem potencial considerável para o estudo de alterações estruturais nos filamentos gliais em paralelo com a fosforilação de proteínas por permitir o uso de moduladores específicos de proteínas quinases e fosfatases.

Abstract

The assembly and disassembly of intermediate filaments is a dynamic process modulated by phosphorylation of glial fibrillary acidic protein (GFAP). The sites on GFAP are localised at the N-terminal where they are phosphorylated by cAMP-dependent and Ca^{2+} -dependent protein kinases. Phosphorylation of GFAP has been investigated in brain slices, astrocyte cultures, cytoskeletal fractions and purified systems. Here we describe an alternative approach to study GFAP phosphorylation. We show that permeabilization of astrocytes in culture with digitonin allows direct access to the systems phosphorylating GFAP.

Conditions for the permeabilization were established based on the Trypan blue exclusion. Incubation of permeabilized cells with cAMP and Ca^{2+} increased the phosphorylation state of GFAP. Immunocytochemistry with anti-GFAP showed that permeabilized astrocytes retained their typical flat morphology and exhibit well preserved glial filaments. On incubation with cAMP the filaments apparently condensed to form long processes.

The results suggest that this approach has a considerable potential for studying structural changes in glial filaments in parallel to protein phosphorylation in the presence of specific modulators of protein kinases and phosphatases.

Lista de abreviaturas

AMPC	adenosina monofosfato cíclico
ATP	adenosina trifosfato
cADPR	adenosina bifosfato cíclico ribosilado
CMF-BSS	solução salina balanceada-livre de cálcio e magnésio
DAG	diacilglicerol
DMEM	meio de Eagle modificado por Dulbecco (Dulbecco's modified Eagles medium)
DMSO	dimetilsulfóxido
EGTA	ácido etileno glicol bis(aminoetil-éter)-tetra-acético
FI	filamento intermediário
GABA	ácido gama aminobutirico
GFAP	proteína glial fibrilar ácida (glial fibrillary acidic protein)
GK	gluconato de potássio
GMPc	guanosina monofosfato cíclico
GNa	gluconato de sódio
GtK	glutamato de potássio
HEPES	ácido etanosulfônico-2-hidroxietilpiperazina
IP₃	inositol trifosfato
KR	krebs-ringer
LDH	lactato desidrogenase
ME	membrana externa (mitocondrial)
MI	membrana interna (mitocondrial)
MLC	"miosin light chain"- cadeia leve da miosina
MP	membrana plasmática
NMDA	N-metil-D-aspartato
NO	óxido nítrico
NOSi	óxido nítrico sintetase induzida
O-2 A	precursor glial (oligodendrocyte-type2 astrocyte)

PAGE.....eletroforese em gel de poliacrilamida
PIPES.....piperazine-N,N'-bis[ácido 2-etanosulfônico]
PK.....proteína quinase
PP.....proteína fosfatase
Prl.....iodeto de propídio
RE.....retículo endoplasmático
SDS.....dodecil sulfato de sódio
SNC.....sistema nervoso central
SNP.....sistema nervoso periférico
TEMED.....tetrametilenodiamina
TRIS.....tris (hidroximetil) aminometano
UV.....ultravioleta (radiação)

I. INTRODUÇÃO

I.1. Organização Celular do Sistema Nervoso Central (SNC)

A heterogeneidade celular e complexidade funcional que compreende o SNC de vertebrados fascina aqueles que se aventuram a investigá-lo. Busca-se, num ritmo cada vez maior, explicar as bases biológicas de nosso comportamento, sensações, lembranças, aprendizado, assim como aspectos relevantes de desordens e patologias cerebrais.

Os avanços tecnológicos mais recentes tem contribuído muito no sentido de esclarecer estas questões. Todavia, o uso de modelos experimentais para estudar processos neurais tanto em nível celular quanto molecular, ainda nos impõe barreiras entre o que observamos *in vitro* e o que realmente ocorre neste tecido .

Sabe-se que o cérebro é composto por uma diversidade de células neuronais e não-neuronais, estas últimas denominadas glia. Apesar de desempenharem diferentes papéis, é a sua integração harmônica que determina o pleno funcionamento cerebral. Os neurônios, por sua vez, foram durante muito tempo vistos como as unidades “funcionais” e de maior importância do cérebro. Quanto a sua importância não há o que questionar, entretanto, de um século e meio para cá, graças ao trabalho do patologista alemão Rudolf Virchow (1846), as células gliais passaram a ser reconhecidas como elementos morfológicamente distintos dos neurônios, tendo, nos últimos quarenta anos, suas funções elucidadas e sua grande importância reconhecida.

Evidências de que as células gliais desempenham importante papel no funcionamento neuronal suportam a idéia de que a interação neurônio-glia é um elemento fundamental no entendimento da dinâmica do SNC (Corvalan et al., 1990).

1.1.1. Neurônios

De origem ectodérmica, são células capazes de gerar e transmitir sinais elétricos, dividindo esta propriedade somente com células musculares e de algumas glândulas. Isto ocorre devido a passagem de correntes iônicas através de poros na sua membrana, também chamados canais, os quais podem ser permeáveis exclusivamente a cátions como Na^+ , K^+ e Ca^{2+} ou a ânions como Cl^- (Clapham, 1995).

A população neuronal é estabelecida logo após o nascimento do indivíduo, quando então estas células perdem a capacidade mitótica. Quanto a estrutura, o neurônio possui um corpo, também chamado soma, que é o centro metabólico da célula. Dele partem prolongamentos aferentes e eferentes. Os eferentes, uma extensa árvore de finos processos denominados dendritos, são responsáveis pela recepção de sinais elétricos e químicos de outras células. O axônio, longo prolongamento aferente do soma neuronal, é considerado a unidade condutora do neurônio. É através dele que moléculas produzidas no soma migram até o terminal pré-sináptico, local onde ocorre a transmissão do impulso elétrico para a(s) célula(s) adjacente(s).

O sistema nervoso central está organizado no que diz respeito a localização de corpos celulares neuronais e seus prolongamentos, de maneira a determinar a distinção entre uma massa tecidual cinzenta e outra branca, respectivamente.

A massa branca praticamente não contém corpos celulares de neurônios, sendo constituída basicamente por seus prolongamentos, onde há alta concentração de mielina (responsável pela cor branca), e células da glia. Já a massa cinzenta é formada principalmente de somas neuronais, embora também contenha prolongamentos de neurônios e algumas células gliais (Junqueira e Carneiro, 1989). A organização espacial das células no sistema nervoso central determina as funções específicas desempenhadas pelas suas distintas regiões (Kandel, 1985).

1.1.2. Neuroglia

As células da glia apresentam uma grande variedade de formas e desempenham distintas funções, estando em íntima interação com neurônios, tanto no cérebro sadio quanto em disfunções e patologias deste .

A neuroglia pode ser classificada primariamente em três subgrupos: A macroglia, a microglia e as células endoteliais. O primeiro grupo compreende os astrócitos e oligodendrócitos, sendo ambos de origem ectodérmica, enquanto o segundo compreende as células microgliais, cuja origem é mesodérmica. As células endoteliais, também de origem ectodérmica, são responsáveis pelo revestimento dos ventrículos cerebrais e do canal central da corda espinhal (Raine, 1993).

Algumas características são cruciais na diferenciação de células gliais e neuronais. A glia não forma contatos sinápticos como os neurônios e retém a habilidade de se dividir ao longo da vida (Raine, 1993). A membrana plasmática das células gliais difere da neuronal por não ser excitável, ter potencial de repouso mais negativo e maior permeabilidade a íons K^+ (Barres, 1991).

1.1.2.1. Astrócitos

Durante muito tempo a atenção de neurocientistas esteve voltada exclusivamente ao estudo das células neuronais. Neste período, por serem vistos simplesmente como elementos passivos de suporte neuronal, os astrócitos despertavam pouco interesse de pesquisadores. Mas como células que compõem mais de 50% do volume cerebral poderiam ser de tão pouca importância?

Nos últimos 40 anos esta imagem vem sendo fortemente alterada. Muito vem sendo descoberto com relação aos astrócitos, que hoje já se sabe, são as células que apresentem maior diversidade funcional no cérebro, além de uma capacidade altamente dinâmica de alterar seu fenótipo (plasticidade) no decorrer da vida (Shao e McCarthy, 1994).

Assim chamados pelo seu formato estrelar, os astrócitos são conhecidos desde o princípio do século XIX, e podem ser classificados em dois subtipos principais: Os astrócitos fibrosos, que encontram-se principalmente distribuídos na

matéria branca do cérebro e os astrócitos protoplasmáticos, mais numerosos na massa cinzenta onde circundam o corpo neuronal, dendritos e sinapses. Ambos os tipos de astrócitos tem contato com capilares sanguíneos e neurônios sendo que em cultura recebem a classificação de astrócito tipo 2 e 1, respectivamente (Kimelberg e Norenberg, 1989). É observada também, embora em casos raros, a presença de formas intermediárias entre estes dois subtipos, os chamados astrócitos mistos. Eles ocorrem na interface entre a matéria branca e a matéria cinzenta (Privat et al., 1995).

Algumas estruturas do sistema nervoso apresentam formas características de astrócitos, como a glia de Begmann no cerebelo, células de Müller na retina e pituitócitos na glândula pituitária (Shao e McCarthy, 1994). Cabe lembrar, ainda, que todos estes tipos celulares podem ter suas características alteradas após injúria cerebral.

Numerosos estudos têm demonstrado que os astrócitos participam de diversas atividades cerebrais dentre as quais podemos enumerar: (1) As fibras gliais da chamada glia radial que servem como guia de migração neuronal no cérebro em desenvolvimento (Hatten e Mason, 1990; Hunter e Hatten, 1995); (2) astrócitos fornecem fatores tróficos para neurônios antes mesmo destes estabelecerem seus contatos sinápticos (Schwartz e Mishler, 1990); (3) estocam glicogênio, sendo a principal reserva energética do cérebro (Hamprecht e Dringen, 1995; Coles, 1995); (4) tamponam níveis iônicos extracelulares preservando a atividade excitatória neuronal (Walz, 1989; Newman, 1995), (5) participam do metabolismo glutamatérgico, sendo o único tipo celular que contém glutamina sintetase (Kimelberg e Katz, 1985; Kimelberg e Norenberg, 1989); (6) participam da resposta imune cerebral (Giulian et al., 1988; Giulian, 1995) e (7) auxiliam a formação da barreira hemato-encefálica (Wolburg e Risau, 1995).

Outra importante propriedade dos astrócitos é a sua reação após injúrias ao SNC formando uma “cicatriz” nervosa, o que chamamos de astrogliose (Shao e McCarthy, 1994). Este processo pode ser detectado dentro da primeira hora após o trauma, já tendo sido registrado em doenças como na síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS); diversas infecções virais; encefalopatias

espongiformes causadas por prions; doenças inflamatórias desmielinizantes; injúrias traumáticas agudas no cérebro e doenças neurodegenerativas como o mal de Alzheimer. Nestes casos há um aumento no conteúdo da proteína ácida fibrilar glial (GFAP) que compõe os filamentos intermediários destas células (Eng e Ghirnikar, 1994).

1.1.2.2. Oligodendrócitos

Os oligodendrócitos são as células responsáveis pela mielinização dos neurônios no SNC assim com as células de Schwann, no sistema nervoso periférico (SNP).

Rio Hortega em 1928, constatou a presença abundante de oligodendrócitos na matéria branca cerebral e os classificou em três diferentes grupos: (1) Aqueles que encontram-se justapostos aos prolongamentos neuronais e promovem sua mielinização, denominados interfasciculares; (2) aqueles colocados junto ao soma neuronal aos quais chamou perineuronais e (3) os que envolvem vasos sanguíneos a que denominou perivasculares (Szuchet, 1995).

1.1.2.3. Microglia

Com o avanço da microscopia eletrônica foi possível um grande avanço no estudo das células microgliais, as quais são consideradas os macrófagos do cérebro. Estas células são extremamente móveis e chegam a compor de 5 a 20 % do volume cerebral (Streit, 1995).

No SNC adulto a microglia pode assumir três diferentes formas: (1) Ramificada ou de repouso, que está presente no cérebro hígido; (2) ativada ou reativa, que é vista em estados patológicos do cérebro, embora ainda não apresente capacidade fagocitária e (3) fagocitária, cuja função é de eliminar resíduos de células mortas do cérebro (Streit, 1995). A microglia mostra grande sensibilidade ao dano neuronal. Uma vez que isto ocorre, as neurotoxinas liberadas promovem a passagem da microglia de sua forma intermediária para a ativada (Streit, 1996). Esta ação benéfica da microglia, entretanto, é questionada, uma vez que apesar de contribuir para a regeneração neuronal, alguns estudos

evidenciaram que a microglia pode produzir agentes neurotóxicos quando em cultura (Streit, 1993).

1.2. Proteínas marcadoras astrocíticas

1.2.1. GFAP

A GFAP (proteína fibrilar glial ácida), pertencente ao grupo III de filamentos intermediários (FI), tem peso molecular de 47kDa e é marcadora de astrócitos. Estruturalmente as proteínas filamentosas deste tipo apresentam uma cabeça amino-terminal, uma cauda carboxi-terminal, região esta responsável pela ligação entre os monômeros (ambas não helicoidais), e uma porção central, formada por uma extensa α -hélice, cuja sequência de aminoácidos é conservada em relação a outros tipos de proteínas componentes de FI. Diferenças na estrutura destas proteínas são normalmente evidenciadas nos aminoácidos da porção amino-terminal (Alberts et al., 1996).

A polimerização da GFAP consiste inicialmente na pareação de monômeros idênticos formando um dímero, onde os domínios centrais estão alinhados em paralelo. A seguir, dois dímeros são posicionados de maneira anti-paralela, ou seja, de um mesmo lado encontramos um terminal carboxi e um amino formando um tetrâmero. Este posicionamento anula a polaridade existente no dímero e permite a união de diversos tetrâmeros na formação do polímero (Figura 1).

No período pré-natal os filamentos intermediários gliais são formados exclusivamente por vimentina, sendo que após o nascimento a GFAP tem sua expressão iniciada e substitui totalmente a vimentina no animal adulto. Em cultura, entretanto, mesmo que as células provenham de um animal adulto, onde a quantidade de vimentina é muito baixa, esta proteína volta a ser expressa (Gottfried, 1996). A co-expressão de GFAP e vimentina em culturas provenientes de animais jovens ou adultos provavelmente não está relacionada ao estágio de

maturação destes, mas sim a uma reação dos astrócitos ao estresse decorrente da troca de seu ambiente natural (Vernadakis e Kentroti, 1994).

Em nosso grupo de pesquisa foi identificada inicialmente uma proteína de aproximadamente 47kDa, altamente fosforilada em hipocampo a qual foi dado o nome de ppH-47 (Gonçalves et al.,1990; Wofchuk e Rodnight, 1990). Estudos subsequentes mostraram ser esta proteína a GFAP (Gonçalves e Rodnight, 1992), dando bases para uma ampla gama de investigações acerca da minuciosa regulação de seu sistema fosforilante e de seu papel na plasticidade astrocítica (Rodnight et al., 1997; Vinadé et al., 1997; Gottfried et al., 1999).

A fosforilação de sítios específicos de proteínas de FI como a GFAP, regula o equilíbrio dinâmico entre seu estado polimerizado e despolimerizado, desempenhando importante papel na mitose (Rodnight et al., 1997). Outros fatores como a presença ou ausência de determinados cátions, pH, disponibilidade de ATP e força iônica do meio também podem influenciar a polimerização destas proteínas (Eng e Lee, 1995).

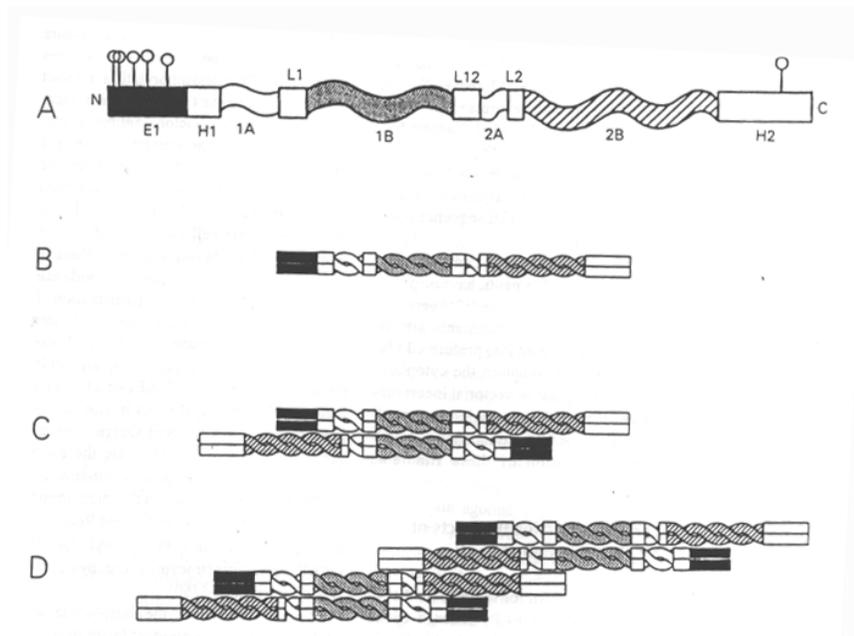


Figura 1. Estrutura dos filamentos intermediários do tipo III. O monômero (A) une-se paralelamente a outro formando um dímero (B). Os dímeros, por sua vez, complexam –se de forma anti-paralela formando um tetâmero (C) e a união destes resulta na formação do filamento. (Rodnight et al., 1997).

I.2.2. Vimentina

Outra proteína de FI do tipo III, a vimentina, co-existe com a GFAP em animais imaturos, astrócitos em processo de gliose reativa ou na glia radial, demonstrando sua importância na construção da arquitetura astrogliar (Inagaki et al., 1994).

Além de astrócitos outras células expressam vimentina, dentre as quais podemos citar os fibroblastos, algumas células musculares, microglia e mesmo neurônios jovens. Células de diferentes origens embrionárias podem expressar esta proteína quando cultivadas in vitro (Eng e Lee, 1995).

O modo pelo qual se dá a polimerização da vimentina é semelhante ao da GFAP, estando ela também sujeita a uma regulação minuciosa dependente de uma diversidade de fatores intra e extracelulares.

I.2.3. S100B

A S100B é uma proteína neurotrófica produzida pelos astrócitos a qual compartilha com as demais proteínas da família S100 a propriedade de ligar Ca^{2+} . Ela tem o importante papel de mediar de sinais de Ca^{2+} no crescimento, diferenciação e mobilidade celular (Scotto et al., 1998).

A S100B pode ser encontrada no citoplasma, associada à membrana plasmática ou outras membranas intracelulares e ao citoesqueleto, o que sugere a seu envolvimento em diversos processos celulares (Sorci et al., 1998). Tem sido descrito seu envolvimento em processos neuropatológicos como por exemplo, no mal de Alzheimer, onde encontra-se superexpressa em locais específicos atingidos pela doença. Também está comprovada a sua participação na indução

do processo de morte celular programada (apoptose) em astrócitos via ativação da óxido nítrico sintetase induzida (NOSi) e consequente aumento nos níveis de óxido nítrico (NO) (Hu et al., 1996; Hu et al., 1997).

Alguns estudos *in vitro* mostraram que a S100B modula o estado de polimerização de microtúbulos e FI do tipo III (GFAP e vimentina, por exemplo) uma vez que encontra-se ligada a estas estruturas com distribuição diferenciada dentro da célula (Sorci et al., 1988). Em nosso laboratório foi mostrado que a S100B atua na regulação do sistema fosforilante da GFAP, pois uma vez presente no meio de incubação da fração citoesquelética obtida do hipocampo de ratos jovens, reduz a fosforilação desta proteína (Ziegler et al., 1997).

1.3. Fosforilação de proteínas cerebrais

De fundamental importância no funcionamento celular a fosforilação de proteínas é um processo pelo qual sinais extracelulares, tanto no SNC quanto nos demais tecidos, produzem seus efeitos biológicos, num processo que chamamos transdução de sinal (Nestler e Greengard, 1993).

Apesar da existência de uma diversidade de mecanismos reguladores da atividade protéica por alterações covalentes tais como ribosilação, acilação, carboximetilação, glicosilação, nenhum é tão amplamente empregado nos processos biológicos quanto a fosforilação. Neste processo proteínas alvo (substrato protéico) recebem um grupo fosfato proveniente da molécula de ATP (fosfato γ) na hidroxila de resíduos específicos de aminoácidos, através da ação de uma proteína quinase (PK). Para esta reação é necessária a presença de Mg^{2+} . Uma vez fosforilado, o substrato protéico tem sua carga líquida alterada, sofrendo uma modificação conformacional que se reflete na sua atividade. O processo inverso, ou seja, a remoção do fosfato do substrato protéico por hidrólise, é catalisado por proteínas fosfatases (Hunter, 1995).

O alto grau de fosforilação de proteínas observado no cérebro ocorre devido a grande concentração de quinases e seus substratos neste órgão (Nestler e Greengard, 1993). Atividades como o controle da liberação de neurotransmissores, a função de receptores celulares e canais iônicos são

exemplos de processos cerebrais regulados por fosforilação (Narin e Shenolikar, 1992). Além disto, está bem descrita a ação da fosforilação de proteínas na potenciação e depressão de longa duração (LTP e LTD, respectivamente) e na expressão gênica (Churn et al., 1994).

1.3.1. Proteínas Quinases

Os processos celulares são controlados por complexas redes inter-reguladas por proteínas quinases e fosfatases. O grande número de genes para quinases presente no genoma de organismos eucariotos (mais de 2000 conhecidos) reflete a importância destas proteínas na regulação das atividades celulares (Hunter, 1995).

Proteínas quinases diferem em sua distribuição celular e subcelular, especificidade por substratos e regulação por mensageiros celulares (Nestler e Greengard, 1993). Podem ser classificadas em serina/treonina quinases, as quais fosforilam substratos protéicos em resíduos de serina e treonina como o próprio nome já diz, ou tirosina quinases que fosforilam resíduos de tirosina de proteínas específicas. Cerca de 95% da fosforilação protéica ocorre em resíduos de serina, de 3 a 4% de treonina e uma pequena porção (1%) em tirosina.

Existem três mecanismos básicos descritos para a atuação das quinases: (1) Via primeiros mensageiros, que compreendem neurotransmissores, hormônios e fatores de crescimento estimulando diretamente a atividade destas proteínas (em alguns casos a luz pode agir como primeiro mensageiro). (2) Via segundos mensageiros, onde primeiros mensageiros atuam indiretamente sobre quinases por promover ativação de enzimas como adenilatociclase, guanilatociclase, fosfolipase C e fosfolipase A2 aumentando o nível dos segundos mensageiros produzidos por estas (AMPc, GMPc, Ca^{2+} e IP_3 e ácido araquidônico, respectivamente). (3) Por autofosforilação: Neste caso um estímulo promove a autofosforilação da quinase em sua subunidade regulatória, aumentando a atividade e tornando-a independente de segundo mensageiro (Nestler e Greengard, 1993). O mecanismo via ação de segundos mensageiros parece ser o mais comum (Walaas e Greengard, 1991).

As principais quinases atuantes no cérebro são:

Proteína quinase dependente de AMPc (PKA): Produto da ação da adenilato ciclase sobre o ATP, o AMPc é mediador intracelular de diversos sinais provenientes de fora da célula e o faz via estimulação de uma proteína quinase. Descoberta por Krebs em 1968 (em músculo esquelético), hoje sabe-se que a PKA está presente em abundância no tecido cerebral (Nestler e Greengard, 1989). Esta holoenzima possui duas subunidades catalíticas e duas regulatórias formando um tetrâmero o qual unido encontra-se inativo. Uma vez ocorrendo a ligação de AMPc na subunidade regulatória, a proteína sofre dissociação e expõe o sítio catalítico ficando apta a realizar sua atividade (Nestler e Greengard, 1993).

Proteína quinase dependente de GMPc (PKG): O cerebelo é a estrutura cerebral onde há maior concentração de GMPc e da proteína quinase ativada por ele. Assim como para AMPc e PKA, sabe-se que é através da PKG que o GMPc exerce a maioria de suas atividades celulares (Nestler e Greengard, 1984). A PKG é composta por 4 subunidades idênticas, cada qual com seu sítio regulatório e catalítico. O GMPc ativa a holoenzima pela sua ligação no sítio regulatório, entretanto, esta ativação não depende da dissociação da molécula, somente de uma alteração conformacional. A reversão para a forma inativa é catalisada pela fosfodiesterase dependente de nucleotídeo (Corbin et al., 1986).

Proteínas quinases dependentes de Ca^{2+} : O Ca^{2+} é um importante segundo mensageiro intracelular atuando em diversos processos biológicos, sendo que muitas vezes é necessária a ligação com determinadas proteínas (proteínas ligantes de Ca^{2+}) para execução de seu papel (Nestler e Greengard, 1984). As quinases dependentes de Ca^{2+} são um grupo de proteínas composto por múltiplas isoformas e estão basicamente divididas em duas subclasses: Uma delas é ativada por Ca^{2+} em conjunção com calmodulina, uma proteína ligante de Ca^{2+} (PKCaM), e está presente no cérebro em pelo menos cinco isoformas, cada qual com distintas funções. Assim como a PKG, a PKCaM contém um domínio regulatório que quando inibido permanece ligado ao domínio catalítico e o mantém inativo. Com a ligação de Ca^{2+} e calmodulina a molécula, entretanto, há uma alteração conformacional e o quadro de inibição é revertido.

A outra classe de proteínas quinases dependentes de Ca^{2+} é a que depende também de fosfolipídios como diacilglicerol e fosfatidilserina para realizar suas atividades biológicas (PKC). Estão descritas pelo menos sete isoformas desta proteína no SNC que diferem em sua distribuição e propriedades regulatórias. Estruturalmente, são polipeptídios de 80kDa contendo uma subunidade catalítica e uma regulatória que na forma inativa cobre e inibe a subunidade catalítica, assim como no exemplo anterior. Esta inibição é revertida quando Ca^{2+} e/ou fosfolipídios ligam-se ao domínio regulatório (Nestler e Greengard, 1993). A PKC possui uma ampla distribuição no cérebro e está relacionada às numerosas funções moduladas por Ca^{2+} nos neurônios e células gliais.

A maioria das quinases podem de autofosforilar e este processo está associado com um aumento de sua atividade e/ou independência de segundos mensageiros.

1.3.1.1. Proteínas quinases nos astrócitos

Em astrócitos em cultura foi evidenciada a presença de quinases como PKA, PKC e PKCaM (Harrison e Mobley, 1992). Estas células expressam uma variedade de receptores que, ligados a adenilatociclase via proteína G, regulam os níveis de AMPc. Experimentos usando um análogo deste segundo mensageiro (o dibutilil AMPc), mostraram alterações em propriedades biológicas do astrócito como a fosforilação da GFAP e vimentina (McCarthy et al., 1985). A alteração morfológica dos astrócitos mediada por AMPc ocorre também na rede de actina, onde a cadeia leve da miosina (MLC) é desfosforilada em consequência da fosforilação e inativação da quinase que atua nesta proteína (Padmanabhan e Shelanski, 1998).

Em cultura de astrócitos foi mostrada a modulação da fosforilação da GFAP por esteres de forbol, evidenciando a participação da PKC neste evento (Harrison e Mobley, 1989). Em fatias de hipocampo de ratos jovens, entretanto, foi verificado que a fosforilação da GFAP é inibida em presença de Ca^{2+} , enquanto em adultos

este processo mostrou-se dependente de Ca^{2+} , sugerindo uma alteração neste sistema durante o desenvolvimento do animal (Wofchuk e Rodnight, 1995).

Tsujimura e colaboradores (1994) mostraram que PKCaM do tipo II (PKCaM II) e cdc2 quinase promoveram o aumento da fosforilação da GFAP em diferentes resíduos de serina e treonina, sendo que somente quando mediada por PKCaM II a fosforilação induziu a despolimerização do filamento.

1.3.2. Proteínas Fosfatases

Os processos celulares regulados por fosforilação de proteínas são altamente dinâmicos, devendo ser rapidamente reversíveis: neste caso o processo de reversão da fosforilação é catalizado por proteínas fosfatases. O grau de fosforilação de um substrato é determinado pela atividade relativa de quinases e fosfatases sobre ele (Nestler e Greengard, 1984).

Em relação ao que se conhece a respeito de proteínas quinases, muito pouco é sabido a respeito de fosfatases. Isto se deve em grande parte a tendência geral da pesquisa biológica em investigar os eventos de “ativação”, deixando de lado os de “inativação”. Soma-se a isto, ainda, a dificuldade no desenvolvimento de técnicas para o estudo de proteínas fosfatases (Nestler e Greengard, 1993).

Assim como para as quinases, as fosfatases também recebem sua classificação de acordo com o aminoácido que fosforilam, ou seja, serina/treonina fosfatases ou tirosina fosfatases. O cérebro contém pelo menos quatro tipos de serina/treonina fosfatases (PP1, PP2A, PP2B e PP2C), que diferem em propriedades físico-químicas, distribuição, especificidade por substrato e regulação por mensageiros celulares (Narin e Shenolikar, 1992).

Fosfatases podem ser ativadas diretamente pela ligação de segundos mensageiros, assim como as quinases. A proteína fosfatase 2B (PP2B ou calcineurina) sofre este tipo de regulação sendo ativada por Ca^{2+} (Narin e Shenolikar, 1992). De maneira alternativa, uma fosfatase pode ser regulada indiretamente por segundos mensageiros através de um grupo de proteínas moduladoras chamadas *inibidores*. Neste caso, o segundo mensageiro ativa uma proteína quinase, esta fosforila o inibidor que por sua vez regula a atividade da

fosfatase. Este é o caso da proteína fosfatase 1(PP1). Algumas fosfatases que tem sua atividade diretamente reguladas por fosforilação. É o caso da proteína fosfatase 2A (PP2A), que quando fosforilada por uma tirosina quinase torna-se inativa (Nestler e Greengard, 1993).

Praticamente todas as principais proteínas fosfatases descritas até hoje, assim como os inibidores protéicos, já tiveram suas atividades descritas no cérebro. Está bem descrita, em neurônios, a ação da fosfatases na regulação da canais de Ca^{2+} e K^+ (PP2B), canais dependentes de ligantes (tirosina fosfatase) e no crescimento axonal (tirosina fosfatase) (Narin e Shenolikar, 1992). Ainda em neurônios foi evidenciada a ação de fosfatases na regulação da transmissão sináptica e em aspectos de sua plasticidade (esta última também descrita em astrócitos).

Numa visão geral, PP1 e PP2A são responsáveis pela maioria dos processos de desfosforilação protéica, enquanto PP2B e PP2C , embora muito importantes, contribuem numa menor proporção no SNC (Dunkley et al., 1996).

1.3.2.1. Proteínas fosfatases em astrócitos

Foi visto em fração citoesquelética de hipocampo de ratos jovens que os sítios de fosforilação da GFAP são desfosforilados por intermédio da PP1 (Vinadé e Rodnight, 1996). Esta ação mostrou-se dependente de Ca^{2+} uma vez que em sua presença a fosforilação da GFAP foi inibida (Wofchuk e Rodnight, 1995). Vinadé e colaboradores (1997) mostraram que astrócitos em cultura expressam a fosfatase Ca^{2+} -dependente calcineurina e sua inibição pelo imunossupressor FK506 aumentou a fosforilação da GFAP.

1.4. Metodologias empregadas no estudo da fosforilação de proteínas cerebrais

A dificuldade de se estudar processos cerebrais no órgão intacto tem estimulado o desenvolvimento de técnicas que, mantendo íntegras as

propriedades fisiológicas do tecido, permitem o acesso direto às células. Isto, entretanto, é um grande desafio para os neurocientistas.

Pesquisas no sentido de desvendar a função dos filamentos intermediários das células gliais e o papel da fosforilação das proteínas que os compõem no exercício destas funções, vem avançando muito ultimamente e, da mesma forma, se fez necessário o desenvolvimento de técnicas que permitam tais investigações.

Apesar de vários aspectos do funcionamento do sistema fosforilante de GFAP e vimentina já serem conhecidos, ainda permanecem muitas dúvidas a respeito dos mecanismos que correlacionam o funcionamento destas proteínas com fenômenos de plasticidade neural.

Na intenção de encontrar modelos experimentais que facilitem o acesso às células de interesse e conservem a situação fisiológica cerebral, aparecem as preparações reduzidas. Exemplos delas são a cultura de astrócitos e/ou neurônios, fatias cerebrais e preparações sinaptossomais. Sua vantagem é permitir a manipulação do meio extracelular, principalmente no que diz respeito a íons e metabólitos, o que não é possível no tecido intacto devido a presença da barreira hemato-encefálica. Além disto, viabiliza o estudo de funções celulares específicas e a localização de determinadas moléculas como receptores e enzimas (Lipton,1985). Entretanto, estas preparações provocam alterações no metabolismo basal e por vezes na morfologia celular, devendo ser consideradas na análise dos resultados.

Técnicas como o uso de fatias cerebrais, cultura de astrócitos e frações citoesqueléticas vem sendo empregadas em nosso laboratório para o estudo da fosforilação de proteínas cerebrais e tem nos permitido dar passos importantes nesta área. Entretanto, como qualquer modelo biológico, apresentam limitações, as quais nos levaram a elaborar uma técnica mais adequada aos nossos propósitos abordada a seguir.

1.4.1. Células intactas

O trabalho com células intactas permite o estudo de processos de fosforilação e desfosforilação uma vez que estas operam em condições normais,

tendo simplesmente sido retiradas de seu tecido original, seja na forma de fatias, seja na forma dissociada (culturas). No caso do cultivo celular, deve-se levar em conta a alteração metabólica, mesmo que temporária, resultante do estresse sofrido por estas células na transferência de seu ambiente original para a placa de cultura.

1.4.1.1. Fatias cerebrais

Nesta preparação obtém-se fatias de tamanho e espessura variáveis da estrutura cerebral de interesse. O ponto chave desta metodologia é a preservação da “citoarquitetura” cerebral, ou seja, de seu arranjo e variabilidade celular, que embora com perda de células periféricas, permanece em perfeita interação metabólica. (Lipton, 1985). Trata-se de uma pequena porção da estrutura, a qual pode ser diretamente manipulada.

Todavia, por conter diversos tipos celulares, o uso de fatias cerebrais dificulta a análise de processos específicos de um grupo em particular. Neste caso, metodologias como a cultura celular podem ser empregadas. Além disto, o fato destas células estarem intactas inviabiliza o acesso ao seu meio interno, conseqüentemente, sua manipulação.

1.4.1.2. Cultura de astrócitos

A técnica de cultura de astrócitos surgiu na década de 70 em função da dificuldade de se realizar estudos em células gliais in vivo, ao contrário de neurônios que até então, com as técnicas disponíveis (eletrofisiologia, lesões seletivas e rastreamento histoquímico de neurotransmissores), eram amplamente estudados (Levison e McCarthy, 1982). A cultura de células mostrou-se extremamente útil no estudo do desenvolvimento e função glial, uma vez que a heterogeneidade celular inerente ao SNC não permitia o estudo destas células isoladamente.

A obtenção de um tipo celular isolado permite a avaliação de uma série de parâmetros particulares a este. Como exemplos disto podemos citar: (1) Atividade intracelular: Replicação e transcrição de DNA, síntese protéica, metabolismo

energético e metabolismo de drogas; (2) Fluxo intracelular de hormônios, metabólitos, RNA, íons, movimentação de vesículas e transdução de sinal (fosforilação de proteínas); (3) Interações moleculares: Nutrição, infecção, carcinogênese, ação de drogas e interação ligante-receptor; (4) Interações célula-célula: Indução embrionária, cinética de população celular, adesões celulares e invasão; (5) Produção e secreção de substâncias (exocitose) e (6) aspectos genéticos como análise e manipulação de genes, transformação e immortalização celular (Freshney, 1994).

A cultura primária de astrócitos é um modelo que permite o isolamento de um tipo celular através de ferramentas como a variação da composição do meio de cultura e tempo de cultivo. Esta técnica possibilita a obtenção de uma cultura com aproximadamente 95% de astrócitos na qual temos a importante vantagem da manipulação do meio extracelular. Neste caso, para estudar a fosforilação protéica, usa-se P^{32} -fosfato o qual pode ser captado pela célula intacta.

Por outro lado, com este método não é possível controlar precisamente os níveis iônicos intracelulares, nem mesmo introduzir inibidores peptídicos específicos de proteínas quinases e fosfatases, os quais são produzidos a partir de seu domínio auto-inibitório. Inibidores permeáveis à membrana plasmática normalmente têm outros alvos além das proteínas quinases.

1.4.2. Frações subcelulares (citoesqueleto)

Através destas preparações pode se estudar cada organela isolada dos demais componentes intracelulares (Arnaiz e Iraldi, 1985). Para análise dos sistemas fosforilantes deve ser fornecido ATP marcado radioativamente ao tecido lisado pois este, em função de ter perdido as mitocôndrias, não é capaz de sintetizar o ATP a partir de $[^{32}P]$ fosfato.

Neste sentido, a metodologia permite o estudo de proteínas quinases, fosfatases e substratos protéicos isoladamente com o emprego de condições ótimas para esta interação, assim como viabilizando o uso de ativadores e inibidores específicos muitas vezes impermeáveis (Dunkley et al., 1996).

A fração citoesquelética obtida pela incubação das células ou tecido com triton X-100 possui, além dos filamentos intermediários, proteínas associadas e eles como quinases e fosfatases. Neste caso, também pode ser adicionado ao sistema enzimas purificadas. Porém, nestas condições a compartimentalização celular, tão importante para processos como transdução de sinal, é perdida assim como a associação de algumas quinases e fosfatases com seu(s) substrato(s) e a proporção fisiológica entre eles.

1.5. Modelo proposto: Permeabilização de astrócitos em cultura com digitonina

Valendo-se das vantagens que a cultura de astrócitos nos oferece para o estudo da fosforilação de proteínas em uma população celular específica, a permeabilização destas com digitonina permite ampliar estudos realizados neste campo até agora, sendo um método particularmente vantajoso em investigações relativas às proteínas insolúveis do citoesqueleto e associadas a ele.

Abrindo poros na membrana plasmática, torna-se possível a introdução de moléculas como nucleotídeos, enzimas, imunoglobulinas e drogas que normalmente não atravessam esta barreira, assim como a manipulação mensageiros intracelulares como o Ca^{2+} (Schulz, 1990). Tendo em vista a possibilidade de controlar o grau de permeabilização provocado, como é o caso da digitonina, e os componentes do meio de permeabilização, pode-se assegurar que a célula, apesar de “aberta”, permanece funcional.

1.5.1. Escolha do método de permeabilização

O ideal de uma técnica de permeabilização celular é possibilitar a incorporação de substâncias á célula sem destruir sua integridade e comprometer seu funcionamento. Buscando este fim, existem diversos métodos descritos na literatura, cada qual com características e aplicações específicas.

Dentre eles os mais utilizados são a eleteroporação, o tratamento das células com detergentes não iônicos como digitonina e saponina e a incubação com toxinas bacterianas (α -toxina e estreptolisina O). São utilizados também, mas

com menor frequência, o choque osmótico, congelamento rápido, tratamento com o vírus Sendai, ATP, quelantes de Ca^{2+} como EGTA e EDTA e ainda a perfuração mecânica com o uso de uma micropipeta. Esta última é empregada normalmente na técnica de “patch-clamp” para medições de condutância elétrica da membrana da célula, mas neste caso serve para introduzir substâncias na célula (Schulz, 1990). Um resumo de aspectos relevantes dos principais métodos de permeabilização celular, como diâmetro do poro formado e moléculas permeáveis às células são descritos na tabela 1.

MÉTODOS	Diâmetro do poro (nm)	Tipo de molécula permeável	kDa
Eletroporação	Variável	Íons, nucleotídeos	Variável
Digitonina (10 $\mu\text{g/ml}$)	8-10	Enzimas	até 200
Saponina (45 $\mu\text{g/ml}$)	8-10	Enzimas	até 200
α -Toxina (20-50 $\mu\text{g/ml}$)	2-3	Íons, nucleotídeos	até 1
Estreptolisina O (0,1-1 $\mu\text{g/ml}$)	>15	Enzimas, IgG	>200

Tabela 1. Tamanho do poro e peso molecular das moléculas permeáveis nos diferentes métodos de permeabilização (Schulz, 1990).

1.5.1.1. Eletroporação

Também conhecida como eletropermeabilização ou rompimento elétrico celular, consiste na aplicação de pulsos elétricos curtos e intensos que promovem a formação de poros temporários na membrana plasmática. É normalmente aplicada em estudos de exocitose e do acoplamento estímulo-resposta de fármacos (Smolen e Sandborg, 1990; Orłowski e Mir, 1993).

A diferença de potencial aplicada sobre as células é dependente de fatores como o seu raio e a intensidade do pulso elétrico. Deve-se ter pleno controle da condutância do fluido extracelular, citoplasma e membrana plasmática além do

conhecimento das dimensões celulares, para uma correta avaliação do resultado obtido. Os poros resultantes desta descarga elétrica são de tamanho e distribuição variáveis ao redor da célula (Schulz, 1990).

1.5.1.2. Toxinas bacterianas

Duas proteínas com capacidade de formar poros na membrana celular, a α -toxina e estreptolisina O, produzidas por *Estafilococcus aureus* e estreptococcus β -hemolítico respectivamente, tem produzido bons resultados no estudo de processos excitatórios em células cromafins, células pancreáticas, em insulinomas e no estudo da contração em células de musculo liso (Schulz, 1990; Stecher, 1992). Este método também vem sendo aplicado no estudo da liberação de neurotransmissores em sinaptossomos (Dekker et al., 1991).

O tamanho dos poros formados por estas toxinas varia de acordo com a concentração utilizada e é descrito que os poros formados por α -toxina são 10 vezes menores que os de estreptolisina O (Bhakdi et al.,1993). A estreptolisina O tem seu mecanismo de ação bem descrito: é uma citolisina que age ligando-se ao colesterol da membrana (Fawcett et al., 1998) assim como a digitonina o faz. Esta metodologia, no entanto, requer cuidados especiais, uma vez que as toxinas bacterianas podem provocar alterações no metabolismo celular e o consequente comprometimento dos resultados obtidos.

1.5.1.3. Detergentes (Digitonina e Saponina)

A permeabilização celular com agentes químicos consiste no uso de detergentes não iônicos como a digitonina e saponina, ambos glicosídeos de origem vegetal, que agem por interação com o colesterol e outros β hidroxisteróis da membrana plasmática formando poros de tamanho e distribuição homogêneos, que permitem a passagem de moléculas de até 200kDa (Tabela 1). Este método não provoca danos às membranas intracelulares, como de mitocôndrias e retículo endoplasmático, visto que são pobres ou desprovidas de colesterol. Pode-se especular inclusive, que a diferença no conteúdo de colesterol de membranas de um tipo celular para outro (Tabela 2) seja responsável pela necessidade de se

empregar distintas concentrações de digitonina para a obtenção de um mesmo nível de permeabilização. Um exemplo disto são as células cromafins da medula adrenal de boi, que em cultura atingem 75% de permeabilização com 15 μ M de digitonina por 5 minutos (Gonçalves et al., 1997), enquanto astrócitos de hipocampo de ratos necessitam de 30 μ M por 10 minutos para um mesmo resultado (Karl et al., in press).

Composição aproximada de colesterol em diferentes membranas celulares (porcentagem dos lipídios totais em peso)						
Tipo de membrana	M.P. de fígado	M.P. de eritrócito	Mielina	Mitocondria (M. I. e M.E.)	R.E.	<i>E.* Coli</i>
colesterol	17	23	22	3	6	0

Tabela 2. Diferença no conteúdo de colesterol em diferentes membranas celulares (adaptado de Alberts et al., 1997). M.P.= membrana plasmática; M.I.= membrana interna; M.E.= membrana externa; R.E.= retículo endoplasmático; **Escherichia Coli*.

O mecanismo de ação de ambos detergentes, referido anteriormente, é o mesmo, embora a digitonina apareça como opção na maioria dos trabalhos. Está descrito na literatura, entretanto, que a saponina pode ter alguma ação permeabilizante na membrana do retículo endoplasmático (Schulz, 1990).

Através de imagens de microscopia eletrônica foi possível verificar que os complexos digitonina-colesterol apresentam um arranjo micelar na forma de um anel rígido que atravessa a membrana plasmática de um lado a outro.

A quantidade de poros formados varia de acordo com a concentração do detergente utilizada e o tempo de exposição. A taxa de permeabilização pode ser avaliada pelo ensaio de exclusão ao azul de Tripal, enquanto a integridade celular pode ser avaliada pela perda do conteúdo de LDH.

A escolha da digitonina baseou-se no tamanho dos poros produzido, na simplicidade do procedimento e no custo do processo.

1.5.2. Vantagens do método escolhido

O método de permeabilização de astrócitos com digitonina é particularmente vantajoso para o estudo da função de proteínas citoesqueléticas como GFAP e vimentina, podendo ser perfeitamente aplicado ensaios de fosforilação protéica com o uso de [γ - 32 P]ATP. Consiste num modelo intermediário entre o uso de frações citoesqueléticas e células intactas, onde, rompendo a barreira formada pela membrana plasmática é possível o acesso aos sítios intracelulares preservando, ainda que parcialmente, as interações fisiológicas entre proteínas quinases, proteínas fosfatases e seus substratos.

1.5.3. Aplicações

A fosforilação de proteínas tem sido estudada em outros grupos de células neurais permeabilizadas com digitonina. É o caso da fosforilação da tirosina hidroxilase em cultura de células cromafins da medula adrenal (Gonçalves et al., 1997), envolvida em aspectos relevantes do processo de síntese e secreção de catecolaminas (Dunn e Holz, 1983; Poccote et al., 1985; Morgan et al., 1993; Morita et al., 1997).

Em astrócitos esta metodologia vem sendo aplicada com sucesso na investigação de estoques intracelulares de Ca^{2+} (Nadal et al., 1996; Müller et al., 1997) e metabólitos celulares (Huang et al., 1995; Siushansian e Wilson, 1995), além da hidrólise de fosfoinositídeos (Robertson et al., 1990; Kitanaka et al., 1991).

1.5.4. Parâmetros considerados na padronização da técnica

A literatura mostra que a eficiência da digitonina como agente permeabilizante varia de acordo com o tipo celular pois depende, em parte, da concentração de colesterol da membrana (Schulz, 1990). Assim, sua utilização deve ser adaptada a esta variável assim como os demais componentes do meio de permeabilização. Nós verificamos, em trabalho prévio, que o grau de permeabilização celular obtido em astrócitos foi proporcional a concentração de digitonina e o tempo de exposição das células a este detergente (Karl, 1997).

Sabe-se que alguns cátions como por exemplo o Ca^{2+} podem modular a permeabilidade da membrana plasmática (Bashford et al., 1988) estando relacionado a um efeito estabilizador desta (Inoue et al., 1992). Provavelmente este efeito de Ca^{2+} se dê pela sua interação com proteínas que ligam também fosfolipídios, neste caso as chamadas anexinas. Estas promovem o movimento de vesículas do complexo de Golgi em direção a membrana plasmática fazendo uma espécie de reforço contra agentes permeabilizantes (Rzigalinski et al., 1997). Por outro lado, foi observado que a presença de ATP no meio de incubação de tipos celulares como fibroblastos e células de Langerhans promove um aumento na permeabilidade de sua membrana (Arav e Friedberg, 1985; Girolomoni et al., 1993).

A necessidade de se encontrar o meio de permeabilização ideal para cada tipo celular em termos de composição iônica, requer o teste de várias combinações de componentes. O meio também deve ser adaptado ao tipo de método de permeabilização utilizado (Kao, 1988). Um meio rico em cloreto tem sido utilizado em ensaios de fosforilação de proteínas em sinaptossomos permeabilizados com estreptolisina-O (Lee e Holz, 1986; Dekker et al., 1991) e células não neuronais permeabilizadas com digitonina (Naor et al., 1989; Eichholtz et al., 1990; Takuma e Ichida, 1994), embora não tenha se mostrado apropriado para estudos de exocitose em células eletropermeabilizadas (Knight and Baker, 1982).

Na maioria dos estudos envolvendo permeabilização celular, o glutamato tem sido utilizado como ânion predominante (Wilson e Kirshner, 1983).

1.5.5. Métodos para avaliação da permeabilização celular

Na maioria dos trabalhos envolvendo permeabilização celular esta é medida por exclusão ao azul de tripan. Trata-se de um corante específico de núcleos, impermeável à membrana de células intactas, que neste caso cora somente núcleos de células permeabilizadas, permitindo que sejam contados. É

uma técnica simples que fornece resultados com alta reprodutibilidade sendo também de baixo custo.

Outro método para marcação de núcleos de células permeabilizadas é a captação de iodeto de propídio (Prl). Assim como o azul de tripan, o PrI é excluído de células com a membrana plasmática intacta e captado rapidamente por células com a membrana danificada (ou permeabilizada) marcando o núcleo em vermelho fluorescente (Rzizgalinski et al., 1997). É um método bastante preciso, porém requer recursos tais como um microscópio com fluorescência, uma filmadora ou câmera fotográfica e um "software" apropriado para análise do resultado. Muitas vezes estes fatores podem inviabilizar seu uso.

Tendo em vista que a permeabilização celular está associada a perda de conteúdo citoplasmático podemos analisá-la por dosagem de lactato desidrogenase (LDH). Neste caso encontram-se valores que devem ser relacionados ao conteúdo detectado em células intactas (100%) para se ter o resultado correto. Amplamente difundido como método de avaliação de viabilidade celular, este teste encontra-se comercialmente na forma de kit, devendo ser adaptado ao tipo de amostra em estudo (Karl, 1997).

Pelo mesmo princípio da dosagem de LDH, talvez a perda de outras proteínas citoplasmáticas possa servir como medida de permeabilização celular. No astrócito, por exemplo, existe a possibilidade de se quantificar S100B, comparando a diferença encontrada em células intactas e permeabilizadas.

Outro método para avaliação de permeabilização celular descrito na literatura consiste na medida da luz emitida pelas células que sofreram ação de agentes membranolíticos. Este método é baseado na expressão do gene da luciferase que deve ser clonado nas células de interesse a fim de torná-las bioluminescentes. A intensidade de luz que atravessa a membrana das células indica alterações na sua permeabilidade. O funcionamento desta técnica, entretanto, em células procarióticas e eucarióticas, depende do método de permeabilização empregado (Virta et al., 1995).

II. Objetivos

O sistema fosforilante das proteínas de filamentos intermediários de astrócitos é composto por proteínas quinases e fosfatases, muitas já bem descritas, as quais tem sua função regulada por uma ampla variedade de fatores dentre os quais podemos citar sinais extracelulares (hormônios, fatores de crescimento) e segundos mensageiros (Ca^{2+} e AMPc). Alterações neste sistema resultam em modificações na estrutura e função do astrócito.

Vários aspectos deste complexo sistema já são conhecidos e isto foi possível devido ao uso de técnicas como fatias cerebrais (Wofchuk e Rodnight, 1995; Rodnight et al.,1997), cultura de astrócitos (Gottfried et al, 1999) e frações citoesqueléticas (Vinadé et al, 1997; Ziegler et al., 1998), descritas anteriormente. Entretanto, estas metodologias apresentam limitações no que diz respeito a impossibilidade de manipulação das reações intracelulares ou, se isto vem a ocorrer, a destruição da compartimentalização celular. Ambas situações comprometem a análise dos resultados obtidos.

Visando aprofundar os conhecimentos sobre a fosforilação de GFAP e vimentina, o objetivo principal deste trabalho foi o desenvolvimento de um modelo experimental que nos permitisse ganhar acesso ao meio intracelular, mantendo as células funcionais principalmente no que diz respeito a integração dos componentes do sistema fosforilante de proteínas citoesqueléticas. Este modelo consiste na permeabilização de astrócitos em cultura com digitonina.

A partir deste objetivo central dividimos o trabalho em uma série de objetivos específicos listados a seguir:

- 1) Padronizar a concentração de digitonina e o tempo de incubação dos astrócitos com este detergente, a fim de obtermos uma adequada permeabilização;
- 2) Estudar o efeito de meios de diferentes naturezas iônicas (Glutamato de potássio, gluconato de potássio; gluconato de sódio, NaCl e KCl) sobre a permeabilização celular e fosforilação de proteínas nestas células a fim de eleger o mais apropriado;
- 3) Avaliar o efeito do Ca^{2+} e outros cátions divalentes sobre a permeabilização de astrócitos com digitonina;
- 4) Avaliar o efeito de ATP sobre a permeabilização de astrócitos com digitonina;
- 5) Determinar a concentração de ATP adequada para o ensaio de fosforilação protéica;
- 6) Caracterizar a fosforilação de GFAP e vimentina em astrócitos permeabilizados e incubados com $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ em diversas concentrações de Ca^{2+} e AMPc (10^{-7} a 10^{-3});
- 7) Avaliar a perda de proteínas como S100B, GFAP e vimentina, além de proteína total em astrócitos permeabilizados com digitonina;
- 8) Investigar por imunocitoquímica a organização dos filamentos intermediários em células permeabilizadas em condições basais e incubadas com Ca^{2+} ou AMPc;
- 9) Investigar , também por imunocitoquímica, a distribuição de S100B no astrócito intacto e permeabilizado.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

III.1. Cultura primária de astrócitos (de acordo com Gottfried, 1996)

III.1.1. Materiais

Animais: Eram utilizados ratos Wistar de 1 ou 2 dias pós natal (P1 ou P2) obtidos no ratário do Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS.

Reagentes especiais e materiais utilizados: DMEM, HEPES, poli-L-lisina, placas “multiwell” de 24 poços (2cm² de diâmetro por poço), tubos cônicos de centrifuga (15ml), filtros descartáveis, membrana de ester de celulose Millipore (poros de 0,22µm de diâmetro), câmara de Neubauer, pipetas automáticas Finnpipette (P5-40, P40-200, P200-1000) e pipetador Pipet-aid provenientes da Sigma; gamicina da Shering-Plough; fungizona e glicose da GibcoBRL; soro fetal bovino (SFB) da Cultilab; NaHCO₃ e demais sais utilizados da Merck. Filtros, seringas, pipetas Pasteur, pipetas graduadas, placas de Petry e tubos de ensaio eram lavados em Extran alcalino (Merck). A vidraria, bem como gaze e ponteiras eram esterilizados por autoclavagem a 121°C em 1atm por 40 minutos, enquanto os filtros, por serem plásticos, somente por 20 minutos. A vidraria estéril era mantida em estufa a 50°C até o momento do uso. O material cirúrgico necessário era tesoura, microtesoura, pinça e bisturi, esterilizados previamente em álcool 70% com iodo.

Soluções utilizadas:

DMEM (meio de cultura de Eagle modificado por Dulbecco): Consiste numa mistura de sais inorgânicos, vitaminas e aminoácidos, glicose e vermelho de fenol. Adicionamos gamicina 0,032% (v/v), fungizona 1% (v/v) e os tampões HEPES (8,39mM) e NaHCO₃ (23,8mM) em água desionizada MilliQ. Para complementar o meio com fatores tróficos, hormônios e outros componentes essenciais às células era adicionado soro fetal bovino numa concentração final de 10%. O pH era ajustado em 7,6 com NaOH ou HCl.

CMF-BSS (solução salina tamponada livre de cálcio e magnésio): É composta de NaCl (136,9mM); KCl (5,36mM); Na₂HPO₄ (0,27mM); KH₂PO₄ (1,1mM); glicose (6,1mM) e vermelho de fenol (0,00025%). O pH era ajustado em 7,4 com NaOH 0,1N ou HCl 0,1N. A solução era feita com água desionizada MilliQ. A ausência de Ca²⁺ e Mg²⁺ facilita a dissociação mecânica das células pois estes cátions são necessários para estabilização de várias moléculas de adesão celular (Takeichi, 1988; Kemler et al, 1989).

III.1.2. Métodos

III.1.2.1. Preparo das placas com substrato de poli-L-lisina

Inicialmente era preparada uma solução de poli-L-lisina 15µg/ml, aliquotada em tubos Eppendorf (400µl cada) e estocada a -20°C. A cada preparo de placas uma alíquota desta solução era diluída 10x em água desionizada e filtrada para recipientes previamente esterilizados. Em cada poço eram adicionados 250µl da solução de poli-L-lisina numa concentração final de 3µg/ml. A solução permanecia na placa de 40 a 60 minutos para que houvesse a adesão do substrato. Decorrido este tempo os poços eram lavados com água desionizada, também esterilizada previamente, a fim de remover totalmente a poli-L-lisina não aderida. Os poços eram mantidos secos até o momento de semear as células e as placas permaneciam fechadas dentro da estufa de CO₂ para prevenir possíveis contaminações. O preparo das placas era realizado normalmente entre 24 e 48 horas antes de se fazer a cultura e sempre na câmara de fluxo laminar.

O uso da poli-L-lisina favorece a adesão dos astrócitos na placa de cultura por interagir mais intensamente com moléculas da matriz extracelular do que o

poliestireno diretamente. Quase todos os tipos de células aderem em poliaminoácidos (poli-L-lisina; poli-L-ornitina), mas nem todos crescem adequadamente (Banker et al, 1982).

III.1.2.2. Cultura de astrócitos hipocampais

O fluxo de ar e a lâmpada de ultravioleta (U.V.) eram ligados 30 minutos antes de darmos início a preparo da cultura. Neste momento todo material a ser utilizado era colocado sob a luz U.V. para garantir sua esterilização.

III.1.2.3. Obtenção dos hipocampos

Para obtenção de 6 a 8 placas de cultura era necessária uma ninhada de 8 a 10 ratos. Estes animais eram sacrificados por decapitação fora do fluxo e as cabeças imediatamente colocadas em placa de Petry contendo CMF-BSS. A partir daí todo trabalho passava a ser realizado na câmara de fluxo laminar.

Os cérebros eram cuidadosamente removidos com auxílio de tesouras e pinças cirúrgicas e colocados em uma segunda placa de Petry onde, ainda em presença de CMF-BSS, eram retirados os hipocampos (Robertson et al. 1989). As meninges eram removidas destas estruturas para evitar a contaminação da cultura por fibroblastos. Os hipocampos eram partidos ao meio com uso de bisturi e transferidos para um tubo cônico de centrifuga fazendo-se uso de uma pipeta Pasteur de vidro (Figura 2).

III.1.2.4. Dissociação celular mecânica

Com pipetas Pasteur de vidro eram realizados movimentos leves de sucção do líquido mantendo a ponta da pipeta encostada no fundo do tubo por 10x. O tubo ficava em descanso por 5 minutos para haver a sedimentação do material ainda não dissociado. Decorrido este tempo o sobrenadante era transferido para outro tubo de centrifuga vazio e o sedimento era resuspenso em mais CMF-BSS. Repetia-se o procedimento de dissociação e ao final de mais 5 minutos este segundo sobrenadante era unido ao primeiro. Estas amostras eram centrifugadas por 10 minutos a 1000x g (fora da câmara de fluxo laminar) sendo o sobrenadante resultante desprezado e o sedimento contendo as células resuspenso em meio de cultura (DMEM) contendo 10% de SFB.

III.1.2.5. Contagem das células e plaqueamento

As células eram contadas em câmara de Neubauer e a partir do valor encontrado era calculado o volume de suspensão a ser semeado para a densidade final de 2×10^5 células por poço. Em cada poço era colocado um volume adicional de meio de cultura.

As placas eram colocadas na estufa sendo mantidas em atmosfera úmida, a 37°C e com 5% de CO_2 (condições mantidas durante todo o desenvolvimento da cultura). Após 4 horas era realizada uma primeira troca do meio de cultura. A finalidade desta troca seria remover grumos e restos celulares não aderidos uma vez que sua presença poderia tornar o meio tóxico para a cultura em desenvolvimento. Cabe lembrar que a natureza das células cultivadas e o tipo de experimento a ser realizado com elas deve ser levado em consideração na hora da escolha do meio de cultivo. Cada tipo celular tem necessidades nutricionais específicas, sendo muitas vezes necessário o uso de suplementos específicos em concentração conhecida para um pleno desenvolvimento destas, o que não se faz possível com soro fetal bovino (Butler, 1991).

Sucessivas trocas de meio eram realizadas a cada 4 dias onde, com a simples agitação da placa, eram removidas células que normalmente ficam aderidas sobre os astrócitos (neurônios, microglia e oligodendrócitos), além de renovados os nutrientes para as células.

O desenvolvimento das culturas era acompanhado diariamente por observações no microscópio. Na densidade normalmente semeada por nós a cultura tornava-se confluenta já no final da segunda semana de cultivo, quando também praticamente não era mais detectada a presença de neurônios (Vinadé et al. 1997). A ausência de neurônios nesta fase deve-se principalmente ao fato de que estes tendem a ficar sobre a monocamada de astrócitos, e assim como células microgliais, são removidos nas sucessivas trocas de meio.

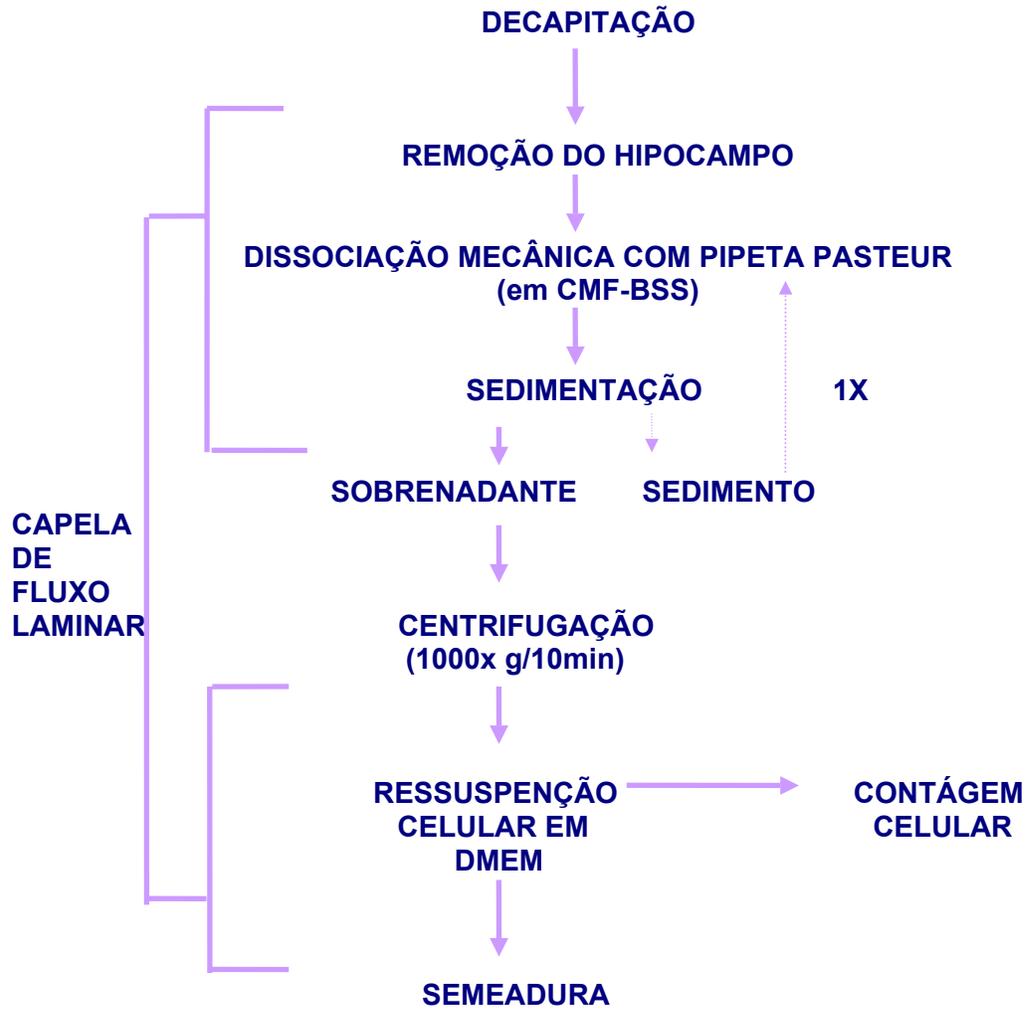


Figura 2. Esquema do procedimento de cultura de astrócitos segundo Gottfried e colaboradores (1999).

III.2. Permeabilização de astrócitos em cultura com digitonina

III.2.1. Materiais

Culturas: Foram utilizadas culturas de astrócitos com idade entre 15 e 25 dias.

Materiais utilizados: A digitonina com alto grau de pureza era proveniente da Calbiochem; EGTA, HEPES, PIPES, ATP, AMPc, azul de Tripán, vermelho de fenol, glutamato de potássio, gluconato de potássio e gluconato de sódio eram obtidos da Sigma; glicose da GibcoBRL. DMSO e sais como KCl, NaCl, MgSO₄ e CaCl₂ eram adquiridos da Merck. Placa com aquecimento para manter a temperatura das culturas a 37°C durante o procedimento de permeabilização, uma vez que este era realizado fora da estufa. A vidraria consistia simplesmente de copos de Beker, pipetas pasteur (podiam ser de plástico) e frascos para a estocagem dos meios.

Soluções utilizadas:

Krebs-Ringer: NaCl 124mM; KCl 4mM; MgSO₄ 1,3mM; CaCl₂ 1mM; glicose 1,2mM, Na-HEPES25mM (pH 7,4) e vermelho de fenol 0,04%.

Meio de permeabilização: Digitonina 15 ou 30µM; glutamato de potássio 140mM; EGTA 1mM; MgCl₂ 1mM; glicose 6mM e Na-PIPES 20mM (pH 7,00). Em alguns experimentos o glutamato de potássio era substituído, na mesma concentração, por gluconato de potássio, gluconato de sódio, NaCl ou KCl. Quando Ca²⁺ era utilizado, a concentração de CaCl₂ necessária era calculada pelo programa MaxChelator. Nos experimentos em que os cátions divalentes Ni²⁺,

Cd²⁺, Mn²⁺ e Ba²⁺ eram utilizados, seus sais de cloreto eram adicionados para atingir uma concentração final de 1mM.

Meio de incubação: Semelhante ao meio de permeabilização mas sem digitonina.

Solução de azul de tripan: 1,2% de azul de tripan em NaCl 140mM.

III.2.2. Métodos

III.2.2.1. Permeabilização

As culturas eram lavadas duas vezes com Krebs-Ringer para remoção total do meio de cultura e mantidas sobre uma placa aquecida. A seguir era adicionado as culturas 250µl de meio de permeabilização por 10 minutos.

III.2.2.2. Avaliação da permeabilização celular por exclusão ao azul de tripan

O grau de permeabilização do astrócitos era determinado por marcação das células com azul de tripan. Esta técnica é amplamente empregada em estudos onde se faz necessária a avaliação da integridade celular, pois por não atravessar a membrana plasmática intacta, o azul de tripan marca somente o núcleo de células lisadas ou perfuradas (Xu et al., 1999; Fuse et al., 1998; Iwata et al., 1997).

Após a etapa de permeabilização as células recebiam 250µl de um meio de composição semelhante ao anterior mas desprovido de digitonina (meio de incubação). Neste meio era adicionado 50µl azul de tripan 1,2% atingindo uma concentração final de 0,24%. Decorridos 2, 10 ou 20 minutos (de acordo com o experimento) este meio era removido e as células contadas em microscópio de contraste de fase. Dois campos de cem células eram contados em cada poço.

III.3. Fosforilação de proteínas em astrócitos permeabilizados

III.3.1. Materiais

Reagentes especiais: [γ - 32 P]ATP era fornecido pela ICN. PIPES, vermelho de fenol, EGTA, ATP, AMPc, dodecil sulfato de sódio (SDS) e Tris(hidroximetil)aminometano (Tris) eram obtidos da Sigma, glicose da GibcoBRL e demais sais utilizados eram da Merck.

Soluções utilizadas:

Solução de incubação: EGTA 1mM; MgCl₂ 1mM; glicose 6mM; K-PIPES 20mM (pH 7,00), vermelho de fenol 0,04%, glutamato de potássio 140mM (em alguns experimentos este último era substituído por gluconato de potássio, gluconato de sódio, KCl ou NaCl) e [γ - 32 P]ATP (10 μ Ci/poço). ATP frio (não radioativo) foi adicionado em alguns experimentos em concentrações finais de 10 e 50 μ M.

Solução de lise (ou solução de amostra): SDS 4%; mercaptoetanol 5%; EDTA 2mM e Tris-HCl 50mM (pH 6,8).

III.3.2. Métodos

III.3.2.1. Marcação das células permeabilizadas com [γ - 32 P]ATP

Depois de permeabilizados por 10 minutos com 30 μ M de digitonina os astrócitos eram incubados durante mais 10 minutos (ou outros tempos como indicado nos resultados) com solução de incubação onde era adicionado 10 μ Ci de [γ - 32 P]ATP por amostra (40 μ Ci/ml) a 37°C. Desta forma era possível introduzir o nucleotídeo radioativamente marcado nas células promovendo a marcação das fosfoproteínas. Nesta fase eram adicionadas diferentes concentrações de Ca²⁺ ou AMPc. Passados os 10 minutos de incubação este meio era substituído por 110 μ l de solução de lise para análise eletroforética. Os poços eram raspados e as amostras transferidas para tubos Eppendorf. Antes de colocadas no freezer (-20°C) as amostras eram fervidas por 2 minutos para garantir a solubilização protéica.

III.3.2.2. Marcação de células intactas com ³²P-fosfato

O meio de cultura era inicialmente removido dos poços os quais eram lavados duas vezes com 300µl de meio Krebs Ringer (KR). A seguir era feita uma pré-incubação das culturas com 500µl de meio KR por 30 minutos a 30°C com a finalidade de aumentar a atividade específica do ³²P-fosfato.

Após a remoção do meio de pré-incubação eram adicionados, em cada poço, 250µl de KR contendo de 3-5µCi de ³²P-fosfato e seguia-se uma incubação de 60 minutos a 30°C.

Ao final da incubação com ³²P-fosfato, o meio era removido e adicionados 110µl de solução de lise para análise eletroforética. Os poços eram raspados e as amostras transferidas para tubos Eppendorf. Antes de colocadas no freezer (-20°C) as amostras eram fervidas por 2 minutos para garantir a solubilização protéica.

III.4. Eletroforese unidimensional (de acordo com Gower e Rodnight, 1982):

III.4.1. Materiais

Reagentes especiais: Acrilamida, bis-acrilamida, persulfato de amônio, mercaptoetanol, azul de bromofenol, agarose, tetrametiletlenodiamina (TEMED), dodecil sulfato de sódio (SDS) e Tris(hidroximetil)aminometano (Tris) eram procedentes da Sigma. Metanol, ácido acético, glicerol, H₃PO₄, NaOH e HCl da Merck e demais reagentes, todos P.A., eram provenientes da Reagen.

Demais materiais: Eram utilizados filmes de Raio-X (X-Omat) e reagentes para revelação da Kodak. Cubas de eletroforese eram obtidas da Sigma. Foram utilizadas também placas intensificadoras Cronex da DuPont, placas de Eucatex e papel celofane.

Equipamentos: PhosphorImager (Ciclone da Parckard)

Solução de glicerol: 40% de glicerol; 5% de mercaptoetanol; Tris-HCl 50mM (pH 6,8) e azul de bromofenol.

Gel de separação (10%): 10% da mistura acrilamida/bis-acrilamida (39/1), tampão tris-HCl 370mM(pH 8,0), 7,5% de glicerol e 0,1% de SDS. Para a polimerização do gel era adicionado à mistura TEMED e persulfato de amônio nas concentrações de 0,06% e 0,045%, respectivamente.

Gel de entrada (4,5%): 4,5% da mistura acrilamida/bis-acrilamida (39/1); tampão Tris-HCl 123mM(pH6,8); 0,1% de SDS; 0,05% de TEMED e 0,1% de persulfato de amônio.

Tampão superior: Tris 25mM (pH 8,8); glicina 190mM e 0,1% de SDS.

Tampão inferior: Tris-HCl 50mM (pH 8,0).

Solução fixadora: 53% de metanol e 7% de ácido acético.

Solução de secagem: 50% de metanol e 1% de glicerol.

III.4.2. Métodos

III.4.2.1. Confeção dos géis

Cada gel era montado entre duas placas de vidro e tinham em média 16cm de largura, 14cm de comprimento e 1mm de espessura. Após a polimerização do gel de separação, o que ocorria em aproximadamente 30 minutos, era colocado sobre ele o gel de entrada.

III.4.2.2. Eletroforese

As amostras em solução de lise eram descongeladas e cada uma recebia 25µl da solução de glicerol. Em cada poço era aplicado 30µl de amostra. A corrida eletroforética era realizada em alta voltagem na câmara fria: -4°C. A voltagem máxima era fixada em 220V e a corrente inicial era de 20mA/placa.

III.4.2.3. Fixação e secagem do gel

Uma vez concluída a corrida eletroforética, o gel era retirado da placa de vidro sendo descartado o gel de entrada. O gel de separação era colocado, então, em 100ml de solução fixadora permanecendo assim por 2 horas ou até mesmo "overnight". A solução fixadora era substituída por uma solução de secagem onde o gel era mantido por mais 2 horas e então era seco.

O procedimento de secagem consistia em colocar o gel entre duas folhas de papel celofane sobre uma placa de vidro (Juang et al., 1984). A solução de

secagem era removida e o processo era acelerado pelo aquecimento dos géis com lâmpadas de raios infravermelhos.

III.4.2.4. Exposição autoradiográfica do gel

Depois de seco o gel era exposto a um filme autoradiográfico (13x18cm) com uma placa intensificadora e permanecia por 24-72 horas no freezer a -70°C .

III.4.2.5. Revelação do filme

Este procedimento era realizado de acordo com as indicações da Kodak. Estes filmes eram lidos em um Scanner e quantificados pelo "software" Optiquant.

III.4.2.6. Exposição do gel para leitura no PhosphorImager

O PhosphorImager era utilizado como alternativa para obtenção de resultados mais rápidos ou quando a incorporação de ^{32}P nas proteínas era muito baixa e requeria dias de exposição pelo método descrito acima.

Este procedimento consistia em expor o gel a uma placa intensificadora específica do PhosphorImager. Esta exposição já garantia uma boa visualização do resultado requerendo apenas 1/5 do tempo necessário de exposição pelo método dos filmes autoradiográficos. Os resultados eram armazenados e analisados pelo programa de quantificação de manchas também chamado Phosphoimager. Este screen era lido pelo Cyclone do PhosphorImager e os resultados poderiam ser quantificados diretamente neste programa.

III.4.2.7. Coloração do gel com azul de Comassie

Ao final da corrida eletroforética o gel poderia ser corado com azul de Comassie (Sigma). Neste caso o gel era colocado numa solução contendo este corante (0,15% em solução fixadora, descrita na metodologia de eletroforese) durante pelo menos 1 hora e depois era lavado de 3 a 4 vezes, somente em solução fixadora, a fim de remover o excesso de corante.

III.5. Eletrotransferência e imunodeteção para GFAP e vimentina

III.5.1. Materiais

Reagentes especiais: Tris, SDS, glicina, Tween-20 e anticorpos policlonais para GFAP e vimentina e anti-IgG (anti-"rabbit") conjugado a biotina eram provenientes da Sigma. Peroxidase conjugada a estreptavidina e kit para reação com luminol (ECL) eram da Amersham.

Demais materiais: Membrana de nitrocelulose 0,45 μ m da Bio-Rad, papel filtro Watman n^o3 e filme X-Omat da Kodak.

Equipamento: "Semidry-Electroblotter" era proveniente da Bio-Rad.

Soluções utilizadas:

Tris-glicina-SDS: Tris 25mM; glicina 192mM e SDS 0,1% (pH 7,5).

Solução Bjerrum: Tris 4,8mM; glicina 39mM e metanol 20% (Heegard e Bjerrum, 1988).

"Milk-TBS": Tris 500mM; NaCl 20mM; pH 7,5 (TBS) e 5% de leite em pó desnatado.

T-TBS: TBS, sendo acrescentado 0,05% de Tween-20.

III.5.2. Métodos

III.5.2.1. Eletrotransferência para membrana de nitrocelulose

O gel seco e autoradiografado era recortado em medidas suficientes para abranger as bandas de GFAP e vimentina que se desejava transferir para nitrocelulose. Este gel era reidratado durante 45 a 60 minutos em solução de tris-glicina-SDS. O papel celofane já podia ser removido nos primeiros 15 minutos de reidratação.

Feito isto, o gel era lavado durante 1 minuto em solução Bjerrum. Era, então, colocado sobre a nitrocelulose entre folhas de papel filtro embebidas desta mesma solução, formando um sanduíche entre o cátodo e o ânodo do aparelho de eletrotransferência. A voltagem máxima era fixada em 15V e a amperagem em 1,2mA/cm² para 50 a 60 minutos de transferência. Ao final do tempo, a

nitrocelulose era fixada em solução contendo 40% de metanol e 10% de ácido acético.

III.5.2.2. Imunodeteccção

Para iniciar a imunodeteccção para GFAP ou vimentina a membrana de nitrocelulose era bloqueada por imersão em solução M-TBS durante pelo menos duas horas sob agitação. Feito o bloqueio, a membrana era lavada duas vezes com T-TBS (5 minutos cada) e incubada com M-TBS contendo o anticorpo anti-GFAP ou anti-vimentina (1:500 e 1:200, respectivamente) por 1 ou 2 horas. A membrana era novamente lavada com T-TBS conforme descrito anteriormente e incubada com o segundo anticorpo biotilado (1:400 em M-TBS) durante 1 hora. Depois de lavada com T-TBS, a nitrocelulose era incubada com peroxidase conjugada a estreptavidina (1:3000 em M-TBS) por 1 hora e novamente lavada com T-TBS.

A etapa seguinte era a reacção com luminol: A membrana era imersa durante 1 minuto numa solução contendo os reagentes 1 e 2 do luminol (1:1), tinha o excesso dos reagentes removido e a membrana era colocada sobre uma placa de Eucatex coberto com um filme plástico. Imediatamente após a membrana era colocada em contato com um filme de raio-X por aproximadamente 40 segundos. As bandas da GFAP e vimentina eram passadas para o computador através de “scanner” e analisadas pelo programa do Optiquant.

III.6. Quantificação de S100B pelo método de ELISA

III.6.1. Materiais

Reagentes especiais e materiais utilizados: Anticorpo monoclonal para S100 β (clone SH-B1), Fast OPD (O-Fenilenodiamina), albumina de soro bovino (BSA), tampão barbital, tampão carbonato, Tris e Tween-20 eram obtidos da Sigma. Fenilmetilsulfonil-fluoreto (PMSF) da Calbiochem. Anticorpo policlonal anti-S100 β conjugado a peroxidase era procedente da DAKO. Placas de poliestireno para ELISA da Labsystems. Demais sais utilizados e HCl eram da Merck.

Soluções utilizadas:

TBS: Tris 500mM; NaCl 20mM (pH 7,5) (era adicionado a este meio EGTA 1mM e PMSF 1mM).

PBS: $K_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ 0,1M; KH_2PO_4 0,1M e NaCl 50mM (pH 7,4).

Solução de lavagem: 0,05% de Tween-20 e 0,1% albumina (BSA) em PBS.

III.6.2. Métodos

III.6.2.1. ELISA para S100B

Este procedimento era realizado conforme descrito por Green et al. (1997).

Inicialmente, placas para ELISA eram incubadas “overnight” com anticorpo para S100B (9,5µg/ml) diluído em tampão carbonato. Os poços eram, então, lavados (solução de lavagem) e bloqueados com albumina (BSA) 1% em PBS durante 30 minutos e estavam prontos para receber as amostras.

Células intactas e permeabilizadas com digitonina eram raspadas e homogenizadas em 250µl de TBS. Uma alíquota desta amostra era diluída 50x em PBS. Eram retirados 50µl da amostra diluída e adicionados mais 50µl de tampão barbital os quais eram aplicados na placa de ELISA pré tratada com anticorpo para S100B. Esta incubação tinha duração de 3 horas e ocorria a uma temperatura de 37°C. Decorrido o tempo os poços eram lavados e recebiam um segundo anticorpo conjugado a peroxidase (1:1000) por mais 1 hora. Após serem lavados novamente, era adicionado mais 100µl de um substrato da peroxidase (Fast OPD) e a placa permanecia no escuro por 30 minutos. O produto desta reação tinha cor e a absorbancia deste era medida num comprimento de onda de 450nm num leitor de placas de ELISA. A curva padrão para S100B por este método era linear entre 0.1 e 4 ng/ml.

III.7. Imunocitoquímica para GFAP e S100B

III.7.1. Materiais

Reagentes especiais e materiais utilizados: Triton X-100, anticorpo monoclonal para S100 β , DAB (diaminobenzidina) e BSA (albumina de soro bovino) eram adquiridos da Sigma. Anticorpo policlonal para GFAP (anti-"rabbit") era proveniente da DAKO e anti-IgG ("rabbit" e "mouse") conjugado a peroxidase eram da Amersham. Paraformaldeído era obtido da Reagen e H₂O₂ da Synth.

III.7.2. Métodos

III.7.2.1. Imunocitoquímica

Após permeabilizadas ou não as células eram fixadas com 500 μ l de paraformaldeído 4% durante 15 a 30 minutos, quando eram ,então, lavadas duas vezes com 500 μ l de PBS. Nesta fase as células já encontravam-se fixadas e podiam ser guardadas na geladeira até o momento do uso. Para isto os poços deveriam conter pelo menos 300 μ l de PBS.

Dando continuidade ao processo, as células eram lavadas duas vezes com 500 μ l PBS contendo 0,2% de Triton X-100 (5 minutos cada) para remover restos de membranas e organelas solúveis neste detergente. A seguir era bloqueada a atividade da peroxidase endógena com H₂O₂ 0,5% em 300 μ l de H₂O durante 15 minutos na ausência de luz. As células eram lavadas mais quatro vezes com 500 μ l PBS contendo 0,2% de Triton X-100 e então eram incubadas por 30 a 60 minutos com 300 μ l de PBS contendo 5% de albumina, em temperatura ambiente, para bloquear a superfície de reação. O passo seguinte era a incubação com o primeiro anticorpo (anti-GFAP ou anti-S100B).

Era colocado 200 μ l de anticorpo diluído em PBS (1:200 em ambos os casos) por poço e incubava-se "overnight" a temperatura ambiente. No dia seguinte os poços eram lavados uma vez com 500 μ l de PBS contendo Triton X-100 (0,2%) e mais três vezes com o mesmo volume de PBS. A incubação com o segundo anticorpo era o passo seguinte, onde, também na proporção 1:200 (em PBS), o anti-IgG (anti-"mouse" e anti-"rabbit", no caso da S100B e da GFAP,

respectivamente), conjugado a peroxidase era adicionado aos poços. Decorridas mais duas horas (sempre a temperatura ambiente) os poços eram lavados novamente com uma vez com 500µl de PBS contendo Triton X-100 (0,2%) e mais três vezes com o mesmo volume de PBS podendo-se partir para a revelação da imunocitoquímica.

III.7.2.2. Revelação

DAB 0,05% era preparado em PBS. As células eram incubadas por 10 minutos com 170µl da solução de DAB e posteriormente, mais 10 minutos, no escuro, com 170µl da solução contendo 0,3% de H₂O₂.

Os poços eram lavados com água e mantidos em PBS. Toda solução de DAB bem como o material sujo com ela, em função de seu poder tóxico, era desprezado num frasco contendo clorofina dentro da capela de exaustão.

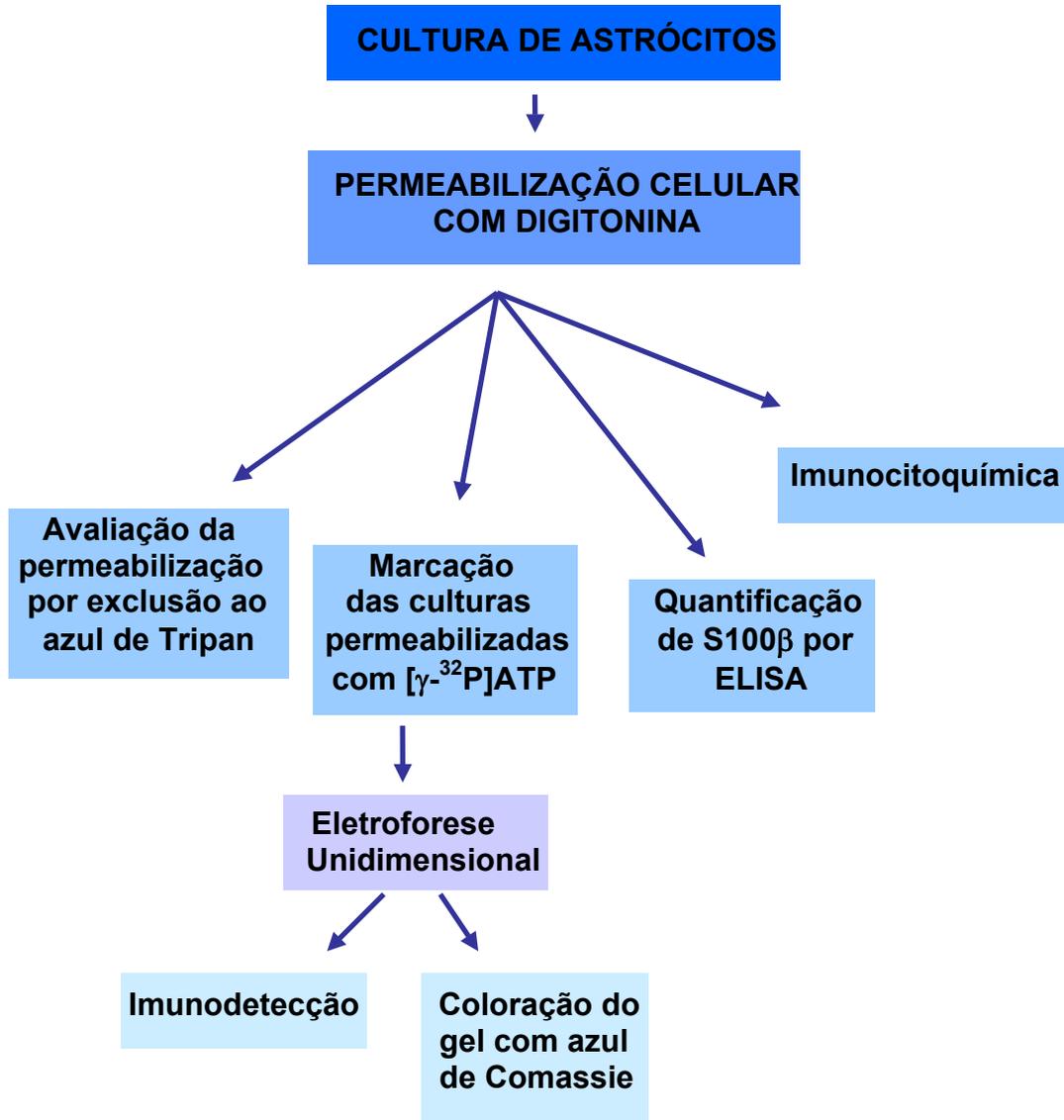


Figura 3 . Representação esquemática da metodologia utilizada neste trabalho.

IV. Resultados

IV.1. Culturas

Na figura 4 são apresentadas fotografias obtidas em microscópio de contraste de fase das culturas com 20 dias de idade. Em 4B é mostrada uma cultura controle onde utilizamos meio glutamato de potássio (GtK) sem digitonina e após 20 minutos adicionamos azul de Tripán. Vemos que praticamente não existem núcleos corados, indicando que o meio utilizado não provoca lise celular e nosso resultado de permeabilização deve-se somente a ação da digitonina. Ainda nesta figura demonstramos que o índice de morte celular nas nossas culturas é muito baixo (menos de 1%).

A figura 4A foi obtida de uma cultura permeabilizada com digitonina e corada com azul de Tripán. Os núcleos azuis correspondem às células que tiveram sua membrana permeabilizada enquanto os não corados correspondem às células intactas. Nesta preparação tivemos cerca de 80% dos astrócitos permeabilizados.

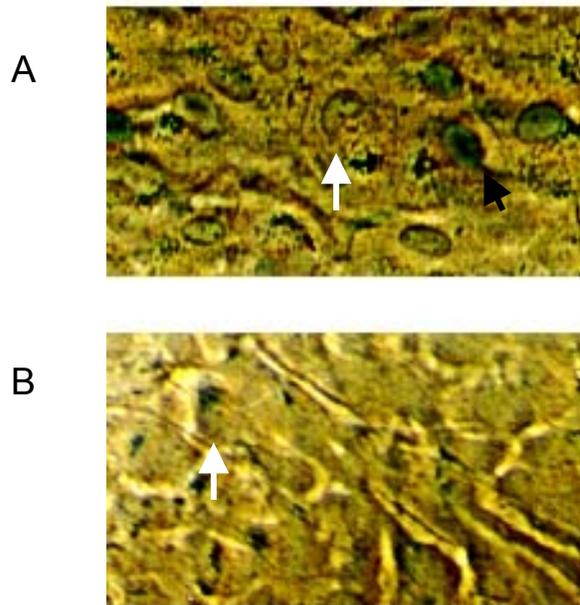


Figura 4 Fotografia de uma cultura intacta e uma cultura permeabilizada. Cultura permeabilizada com 30 μ M de digitonina por 10 minutos **(A)** e cultura intacta **(B)** foram incubadas com azul de Tripán por 3 minutos. A seta preta indica o núcleo de uma célula permeabilizada **(A)** e as setas brancas indicam núcleos de células intactas**(A e B)**.

IV.2. Permeabilização de astrócitos com digitonina

Num primeiro momento, nosso trabalho esteve voltado a padronização de condições ideais para a permeabilização de astrócitos em cultura com digitonina e fosforilação de proteínas nestas células.

Estudos prévios realizados em nosso laboratório serviram como referência para este trabalho (Karl, 1997). Nestes, através da exclusão ao azul de tripan e perda de LDH (lactato desidrogenase) pelas células, foi verificado que o grau de permeabilização celular provocado pela digitonina é crescente conforme aumento de sua concentração e tempo de incubação, sendo que 80% dos astrócitos eram permeabilizados com 30 μ M de digitonina por 10 minutos. Levando em consideração estes resultados, bem como a perda de somente 30% do conteúdo citoplasmático de LDH nestas condições, optamos por adotá-las como referência no desenvolvimento de nosso trabalho.

A figura 5 representa experimentos realizados que confirmam dados previamente referidos. As células neste caso foram permeabilizadas em meio rico em glutamato de potássio (vide materiais e métodos) contendo 15 ou 30 μ M de digitonina durante 5, 10 ou 20 minutos e posteriormente coradas com azul de tripan para contagem dos núcleos. Comparando os resultados verificamos a reprodutibilidade da técnica e constatou-se que uma completa permeabilização não foi obtida nem mesmo com 30 μ M de digitonina por 20 minutos.

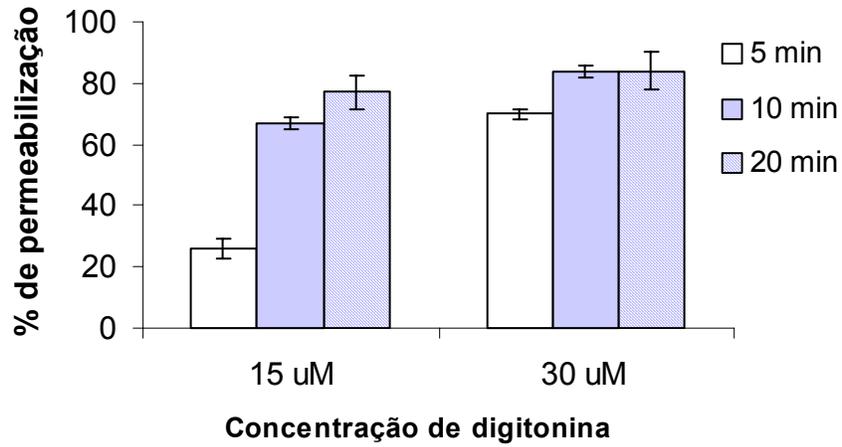


Figura 5. Efeito da concentração e tempo de incubação com digitonina na percentagem de astrócitos permeabilizados. O grau de permeabilização foi estimado por exclusão ao azul de tripan. Cada barra representa (\pm EP) de 6 a 8 observações.

IV.3. Estudo do meio de permeabilização

Investigamos o efeito de diferentes meios sobre a permeabilização de astrócitos com digitonina por exclusão ao azul de Tripán (Figura 6). Neste caso as células foram permeabilizadas nas condições previamente estabelecidas, ou seja, 30 μ M de digitonina por 10 minutos, em meios contendo gluconato de potássio (GK), gluconato de sódio (GNa), glutamato de potássio (GtK), KCl e NaCl, sempre na concentração de 140mM. A porcentagem de células permeabilizadas no meio glutamato de potássio (80 \pm 2,5) foi a mesma observada em KCl (79 \pm 2,9) e gluconato de potássio (80 \pm 3,0). Os meios em que o cátion predominante foi o Na⁺, da mesma forma não causaram diferenças na porcentagem de células permeabilizadas. Estes dados mostram que a natureza iônica do meio não interfere na ação da digitonina sobre a membrana plasmática estando de acordo com dados anteriormente obtidos em células cromafins (C.A. Gonçalves e P. Dunkley, dados não publicados).

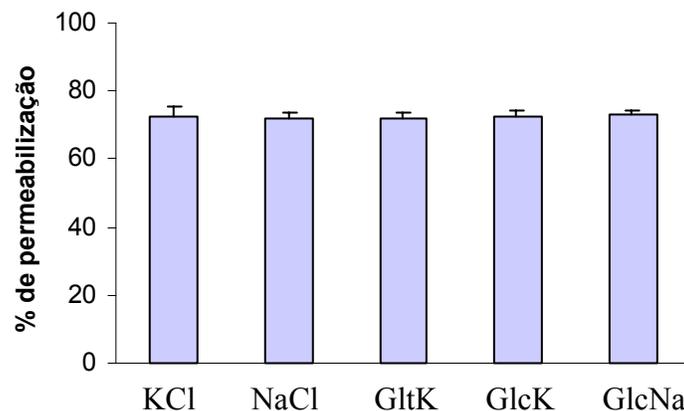


Figura 6 Efeito dos diferentes meios na permeabilização de astrócitos em cultura com digitonina. Foram utilizados meios contendo glutamato de potássio (GtK), gluconato de potássio (GK), gluconato de sódio (GNa), KCl e NaCl, todos na concentração de 140mM. A porcentagem de permeabilização foi estimada por exclusão ao azul de tripan. Cada barra representa (\pm EP) de 5 observações.

IV.4. Efeito do Ca^{2+} e outros cátions divalentes sobre a permeabilização

Estudos realizados através de difração de raio X mostraram que o Ca^{2+} exerce um efeito estabilizador na estrutura de bicamadas lipídicas artificiais (Inoue et al., 1992; Shinitzky, 1994), assim como também demonstrado em membranas de vários tipos celulares como eritrócitos (Tsuda et al. 1987) e linhagem humana de células megacarioblásticas (Schootemeijer et al. 1994).

Partindo da idéia de que Ca^{2+} e outros cátions divalentes podem interferir na estrutura da membrana plasmática, conseqüentemente na sua permeabilização, decidimos avaliar seus efeitos neste processo.

Dividimos os experimentos em duas etapas. Numa delas colocávamos o cátion em estudo já durante o processo de permeabilização, ou seja, no meio contendo a digitonina, deixando-a agir por 10 minutos e avaliávamos a permeabilização por exclusão ao azul de tripan. Nestes experimentos pôde-se ter idéia da “interferência” dos cátions na ação da digitonina (Ca^{2+} na figura 7A e outros cátions divalentes na 8A). Em outro momento, os astrócitos eram permeabilizados na ausência dos cátions e posteriormente incubados com meio de composição semelhante mas sem digitonina e com um dos cátions, durante 2, 10 ou 20 minutos (Figuras 7B e 8B). Através deste tipo de experimento poderíamos ver o efeito dos cátions em células já permeabilizadas, bem como o possível efeito era tempo-dependente.

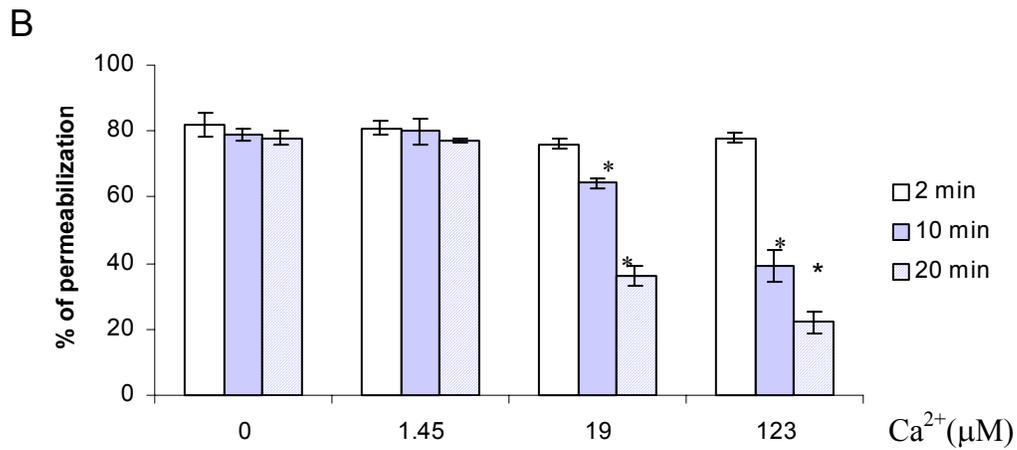
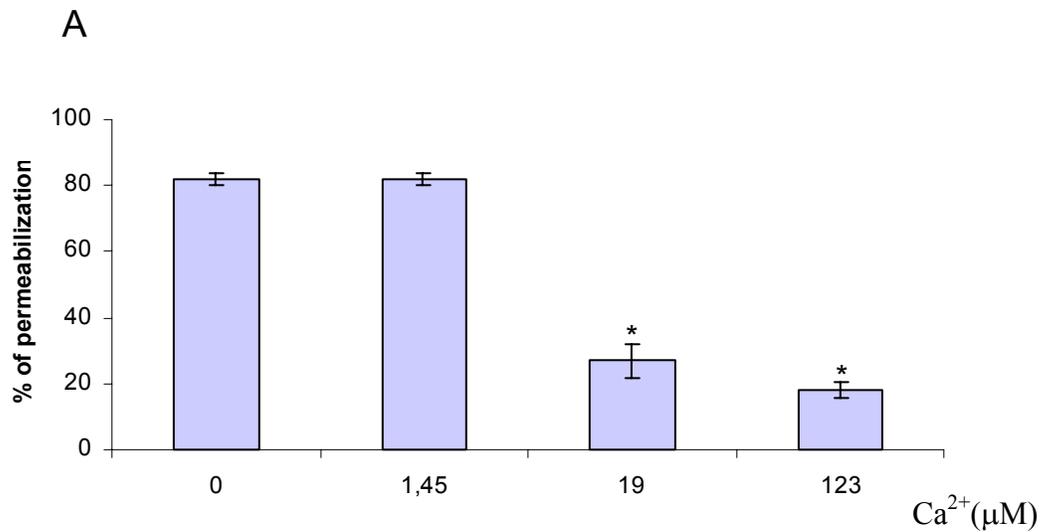


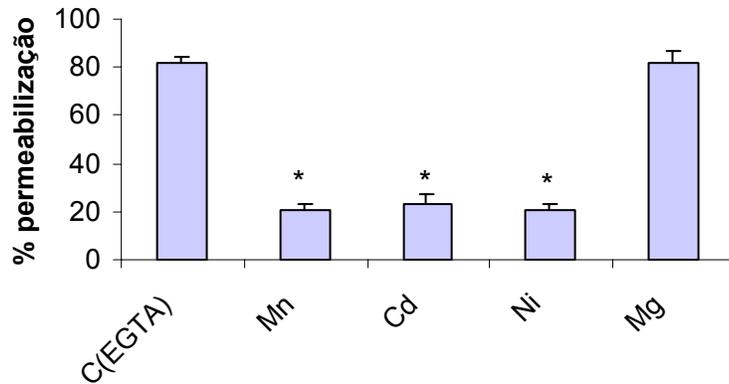
Figura 7 Efeito do Ca²⁺ na permeabilização de astrócitos em cultura com digitonina. Astrócitos foram permeabilizados com 30μM de digitonina por 10 minutos na presença de diferentes concentrações de Ca²⁺ (A) ou na ausência deste (B). Neste caso diferentes concentrações de Ca²⁺ foram adicionadas após a permeabilização num meio livre de digitonina. O período pós-permeabilização observado variou de 2 a 20 minutos. A porcentagem de permeabilização foi estimada por exclusão ao azul de tripan. Cada barra representa (\pm EP) de 6 observações. * Diferença significativa de células permeabilizadas na ausência de Ca²⁺ ($p < 0,01$).

Como podemos ver em 7A, a presença de Ca^{2+} no meio de permeabilização promove uma diminuição de 50% no número de células permeabilizadas já com $19\mu\text{M}$ e mostra-se mais efetivo em maiores concentrações (até 1mM). Efeito semelhante pode ser observado em 6B. Neste caso o Ca^{2+} , nas concentrações de 19 e $123\mu\text{M}$, promoveu o “reselamento” parcial dos poros sendo o efeito intensificado com o aumento do tempo de exposição a este íon.

Foram testados também os cátions Mn^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} e Mg^{2+} durante a etapa de permeabilização (os três primeiros na concentração de 1mM e Mg^{2+} 5mM , visto que já consta no meio de permeabilização na concentração de 1mM).

Mn^{2+} , Cd^{2+} e Ni^{2+} reduziram a porcentagem de astrócitos permeabilizados em torno de 50%, enquanto o Mg^{2+} não apresentou diferença em relação ao controle. Foi observado o efeito do Mn^{2+} também em células já permeabilizadas onde assim como o Ca^{2+} (7B), promoveu um fechamento gradual dos poros (Figura 8B).

A



B

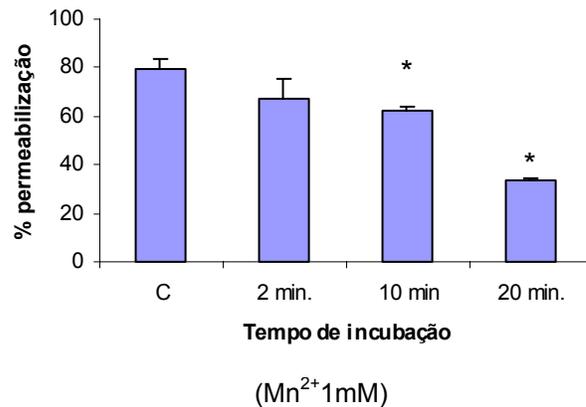


Figura 8. Efeito de cátions divalentes na permeabilização de astrócitos em cultura com digitonina. Em a astrócitos foram permeabilizados com 30 μ M de digitonina por 10 minutos na presença de Mn²⁺, Cd²⁺, Ni²⁺ 1mM ou Mg²⁺ 5mM Em b a permeabilização ocorreu na ausência destes cátions e após foi adicionado Mn²⁺ 1mM por mais 10 minutos num meio livre de digitonina. A porcentagem de permeabilização foi estimada por exclusão ao azul de tripan. Cada barra representa (\pm EP) de 4 observações. * Diferença significativa de células permeabilizadas na ausência de cátions divalentes(p< 0,01).

IV.5. Efeito do ATP sobre a permeabilização

O ATP é descrito na literatura como agente permeabilizante em tipos celulares como macrófagos e mastócitos (Schulz, 1990; Gomperts et al. 1992). Em outras células tais como células cromafins e PC12, o ATP não induz permeabilização ou afeta a permeabilização induzida por outros agentes. Considerando o uso deste nucleotídeo nos ensaios de fosforilação protéica, bem como outros tipos de experimentos, resolvemos investigar o efeito de diversas concentrações de ATP (10 e 1000 μ M) sobre a permeabilização de astrócitos com digitonina.

O gráfico apresentado na figura 9 mostra que em astrócitos, contrariando a tendência dos dados obtidos em outras células, a presença de ATP 50 μ M no meio de permeabilização já causa redução do número de células permeabilizadas, efeito este intensificado em concentrações maiores do nucleotídeo. Entretanto, ATP 10 μ M não afetou a permeabilização celular.

Este efeito "protetor" do ATP na permeabilização de astrócitos com digitonina foi evidente, entretanto o seu mecanismo permanece desconhecido. Além disto, o ATP em concentrações iguais ou superiores a 50 μ M também "protege" as células pós-permeabilização, induzindo o fechamento parcial dos poros.

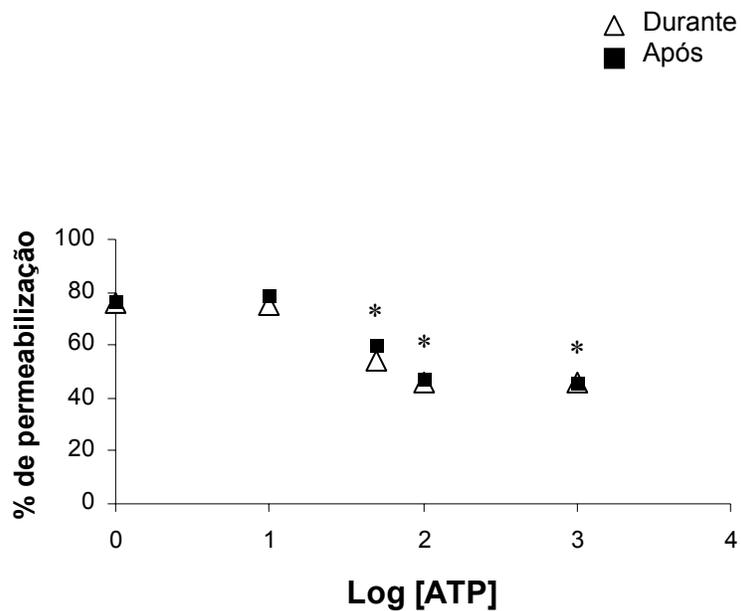


Figura 9 Efeito do ATP na permeabilização de astrócitos em cultura com digitonina. Astrócitos foram permeabilizados com 30 μ M de digitonina por 10 minutos na presença de diferentes concentrações de ATP (Δ) ou na ausência deste nucleotídeo (\blacksquare). Neste caso diferentes concentrações de ATP foram adicionadas após a permeabilização por mais 10 minutos num meio livre de digitonina. A porcentagem de permeabilização foi estimada por exclusão ao azul de tripan. Cada ponto representa 6 observações. * Diferença significativa de células permeabilizadas na ausência de ATP ($p < 0,01$).

IV.6. Efeito do meio de permeabilização na fosforilação de proteínas

Na figura 10 é mostrado o efeito de meios com diferentes composições iônicas sobre o perfil fosfoprotéico de astrócitos, já avaliados quanto ao efeito na permeabilização propriamente dita (Figura 6). Diferenças na fosforilação foram avaliadas após a permeabilização e incubação dos astrócitos com [³²P]ATP (40μCi/ml) nos mesmos meios utilizados na figura 6.

A incorporação total de ³²P foi maior no meio contendo o ânion glutamato quando comparado com meios contendo gluconato ou cloreto. Mostrou-se também um pouco mais alta na presença de K⁺ do que de Na⁺. Sendo assim optamos por utilizar o meio glutamato de potássio nos experimentos posteriores. Não houve alterações na fosforilação de proteínas específicas nos diferentes meios.

Quando comparada à células intactas marcadas com ³²P-fosfato, a incorporação geral de ³²P em células permeabilizadas mostrou-se nitidamente menor (dados não mostrados), levando-nos a estudar maneiras de aprimorar esta técnica e garantir uma melhor análise dos resultados.

Em estudos prévios, a fim de obtermos a concentração ideal de ATP para a ativar a, fosforilação da GFAP e outras fosfoproteínas em astrócitos permeabilizados, foi testada a adição de ATP “frio” (10 e 100μM) junto ao [³²P]ATP. Verificamos que quanto maior a concentração de ATP “frio” utilizada, menor a marcação radioativa, obviamente resultante da competição entre ATP “frio” e [³²P]ATP junto às proteínas quinases. Entretanto, valendo-se agora dos dados relativos a redução da permeabilização provocada por ATP (Figura 9), podemos também atribuir esta diminuição da fosforilação na presença de ATP “frio” 10 e 100μM a um parcial fechamento de poros. Cabe aqui lembrar que o ATP é impermeável a membrana plasmática da maioria das células, não atravessando a membrana intacta.

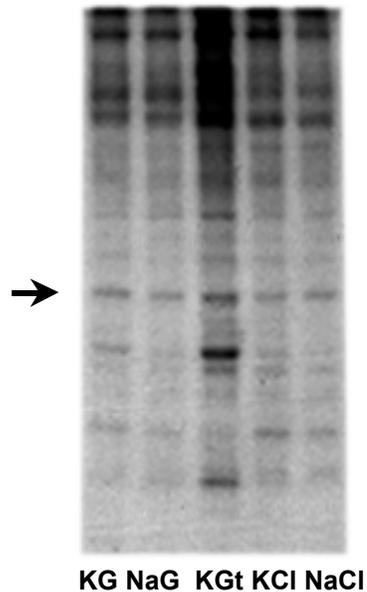


Figura 10. Efeito dos diferentes meios de permeabilização na fosforilação de proteínas em astrócitos em cultura. Astrócitos foram permeabilizados com 30 μ M de digitonina por 10 minutos em meio contendo gluconato de potássio (GK), gluconato de sódio (GNa), glutamato de potássio (GtK), KCl ou NaCl, todos na concentração de 140mM. Após, foram substituídos por meios de composição semelhante mas livres de digitonina, aos quais foi adicionado 40 μ Ci/ml de [32 P]ATP por mais 10 minutos. A reação foi parada com solução de amostra e as proteínas separadas em gel de poliacrilamida 10% e analisadas em Phosphorimager. A seta indica GFAP.

IV.7. Comparação entre marcação radioativa em astrócitos intactos e permeabilizados

Na figura 11 pode-se observar a semelhança entre o perfil eletroforético de astrócitos intactos (**B**) e permeabilizados (**A**), permitindo a comparação dos resultados obtidos nos dois métodos. Neste caso deve-se considerar que células intactas são incubadas com 5 μ Ci/ml de 32 P-fosfato durante uma hora a fim de possibilitar a síntese de [32 P]ATP a partir deste, enquanto células permeabilizadas com digitonina recebem diretamente 30 μ Ci/ml de [32 P]ATP por somente 10 minutos. Apesar de permeabilizados os astrócitos mantêm a atividade mitocondrial íntegra e são capazes de sintetizar este nucleotídeo, mas sendo o ATP impermeável a membrana plasmática podemos selecionar somente a fosforilação nestas células onde ele penetra. A comparação autorradiográfica entre o nível de fosforilação de proteínas por estes dois métodos fica, assim, impossibilitada.

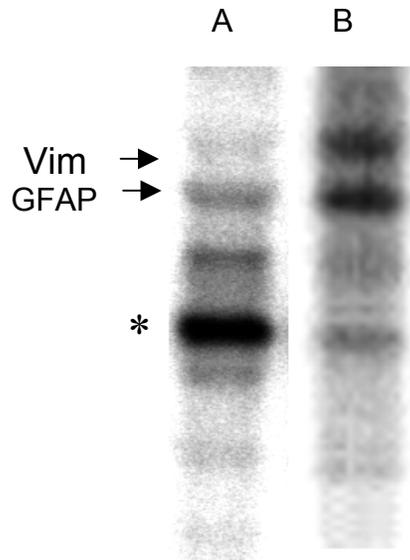


Figura 11. Perfil eletroforético de fosfoproteínas em cultura de astrócitos intactos e permeabilizados. A: Astrócitos permeabilizados com 30 μ M de digitonina por 10 minutos e incubados com 40 μ Ci/ml de [γ ³²P]ATP por mais 10 minutos. **B:** Astrócitos intactos incubados com 5 μ Ci/ml de ³²P-fosfato durante 1 hora. As bandas correspondentes a GFAP e vimentina são indicadas pelas setas. O asterisco indica uma proteína desconhecida de aproximadamente 40kDa. As fosfoproteínas foram separadas em gel de poliacrilamida 10% e analisadas em PhosphorImager.

IV.8. Efeito do Ca^{2+} e AMPc sobre a fosforilação de GFAP e vimentina em células permeabilizadas

Segundos mensageiros como o Ca^{2+} e AMPc regulam através da ação de proteínas quinases e fosfatases o equilíbrio entre a fração polimerizada e despolimerizada dos filamentos intermediários. Trata-se de um processo dinâmico que contribui para a característica plástica apresentada pelos astrócitos.

Promovendo a permeabilização celular podemos controlar a concentração destes segundos mensageiros no citoplasma e assim sendo, ampliar estudos acerca de sua ação sobre proteínas quinases e fosfatases atuantes sobre GFAP e vimentina. No presente trabalho, astrócitos permeabilizados foram incubados com [^{32}P]ATP por 10 minutos em presença de AMPc (Figura 12A), Ca^{2+} (Figura 12B) ou em ausência destes.

Em 12A temos um nítido aumento na fosforilação da GFAP em relação ao controle. A vimentina curiosamente apresenta-se muito pouco fosforilada nestas preparações em relação ao que se obtém em células intactas marcadas com ^{32}P (Figura 11), mas ainda assim conseguimos observar um leve estímulo na sua fosforilação em presença de AMPc.

O Ca^{2+} promoveu um gradual aumento relativo na fosforilação de GFAP e vimentina conforme aumentava sua concentração, entretanto a fosforilação geral aparentemente foi reduzida com o aumento deste segundo mensageiro (Figura 12B). Provavelmente esta seja uma consequência do fechamento parcial dos poros provocado por Ca^{2+} , e a consequente redução na entrada de [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP nos astrócitos (Figura 9).

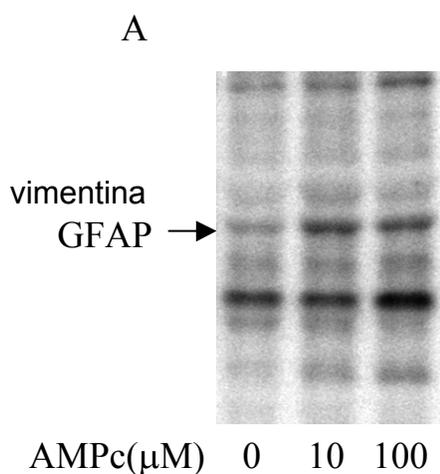


Figura 12. Efeito de Ca^{2+} e AMPc na fosforilação de proteínas em astrócitos permeabilizados com digitonina. Astrócitos foram permeabilizados com $30\mu\text{M}$ de digitonina por 10 minutos e incubados com $40\mu\text{Ci/ml}$ de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ por mais 10 minutos em presença de AMPc (**A**), Ca^{2+} (**B**) ou ausência destes. As fosfoproteínas foram separadas em gel de poliacrilamida 10% e analisadas em PhosphorImager.

IV.9. Avaliação da perda protéica decorrente da permeabilização

Para avaliação da integridade dos sistemas intracelulares após a permeabilização, um importante parâmetro a ser observado é a perda protéica. Não somente a diferença de proteína total entre células intactas e permeabilizadas, mas também a relação proteínas solúveis/insolúveis e a perda de proteínas de diferentes pesos moleculares constituem aspectos importantes a serem estudados neste momento. Na figura 13 apresentamos resultados referentes a quantificação de GFAP, vimentina, S100B e p90, uma proteína cuja identidade ainda é desconhecida por nós, em células intactas e permeabilizadas.

A perda protéica média foi de 25% (13A). De A a D é mostrada a quantificação de GFAP e vimentina por “immunoblotting”, onde constatamos que estas proteínas insolúveis praticamente não tiveram seu imunoc conteúdo alterado nas nossas condições de permeabilização. Entretanto, em 11C vemos que a p90, verificada num gel corado com azul de comassie, teve seu conteúdo bastante reduzido neste processo.

Na figura 12A temos a quantificação de S100B, uma proteína solúvel e muito pequena (20kDa na forma dimérica) a qual tem seu conteúdo reduzido em 57% nas células permeabilizadas em relação as células intactas. Neste gráfico cada proteína é representada já como porcentagem de seu próprio controle, não podendo ser comparadas entre si, mesmo porque os resultados foram obtidos por diferentes metodologias.

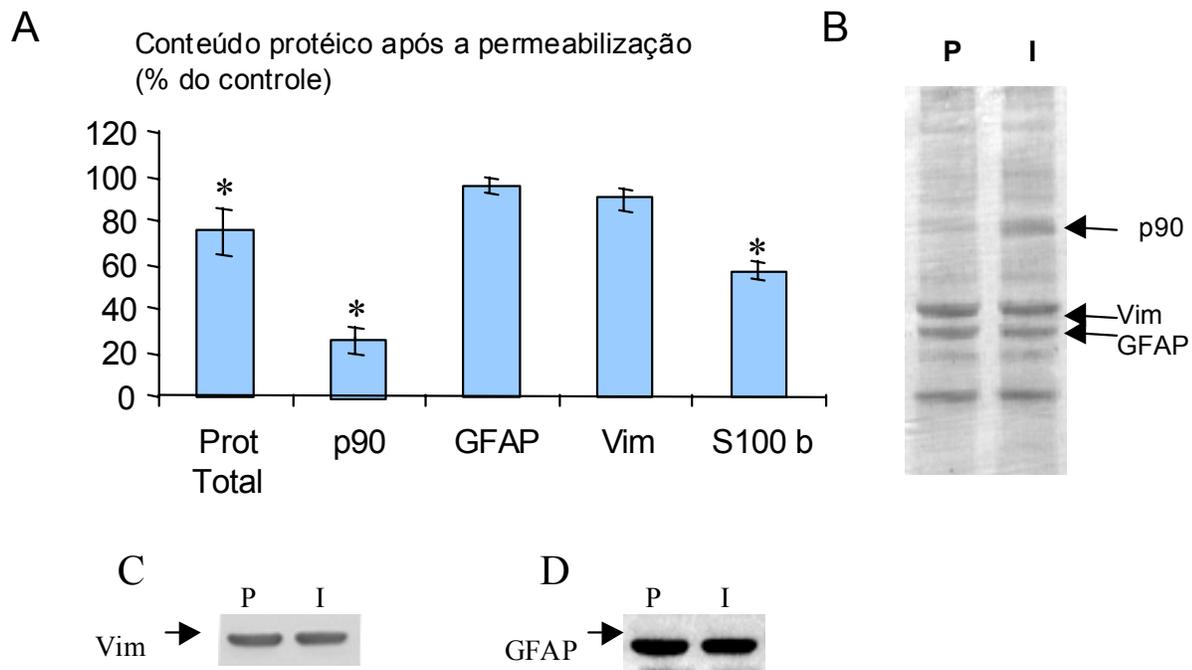


Figura 13. Avaliação da perda protéica após a permeabilização. Proteína total, GFAP, vimentina, S100 β e p90 estão representadas como a diferença do conteúdo medido em células intactas (controle 100%) em relação às células permeabilizadas (30 μ M de digitonina por 10 minutos). P, células permeabilizadas; I, células intactas. Cada valor representa a média de 3 a 6 observações, com seus respectivos erros padrão. *Diferença significativa em relação as células intactas ($p < 0,01$).

IV.10. Imunocitoquímica para GFAP

A fim de visualizarmos possíveis alterações na estrutura de filamentos intermediários durante o processo de permeabilização, assim como o comportamento da S100B, a qual sabemos ter uma considerável fração associada as proteínas de filamentos intermediários exercendo um papel regulatório sobre elas, realizamos imunocitoquímica para GFAP (Figura 12) e S100B (Figura 13) nas situações mostradas a seguir.

Em 14A é mostrada uma cultura intacta exposta por 10 minutos ao meio semelhante ao de permeabilização embora sem digitonina, o qual mantém a morfologia típica do astrócito em cultura primária, a protoplasmática. Após a permeabilização as células incubadas na ausência de Ca^{2+} ou outro segundo mensageiro (14b), conforme esperado não apresentaram alteração na distribuição dos filamentos de GFAP, nem em sua morfologia. As culturas que após a permeabilização receberam meios contendo AMPc $10\mu M$ (14c) e forskolina $10\mu M$ (14d) tiveram a formação de processos. Estes resultados sugerem que a técnica de permeabilização celular com digitonina tem um potencial considerável na investigação de alterações dos filamentos gliais em resposta a segundos mensageiros, especialmente através de fosforilação protéica.

Cabe aqui salientar que em astrócitos em cultura já está bem estabelecido que a forskolina na concentração de $10\mu M$ promove um aumento considerável do nível de fosforilação de GFAP e vimentina, induzindo também a formação de processos 20 minutos após a sua adição (Pollenz e McCarthy, 1986). O perfil observado em forskolina foi similar ao observado em células intactas quando expostas a esta substância por 60 minutos, onde foi desencadeada uma completa diferenciação na morfologia celular (Pollenz e McCarthy, 1986). A figura 14d indica que a atividade da adenilato ciclase parece não ter sido afetada pela permeabilização.

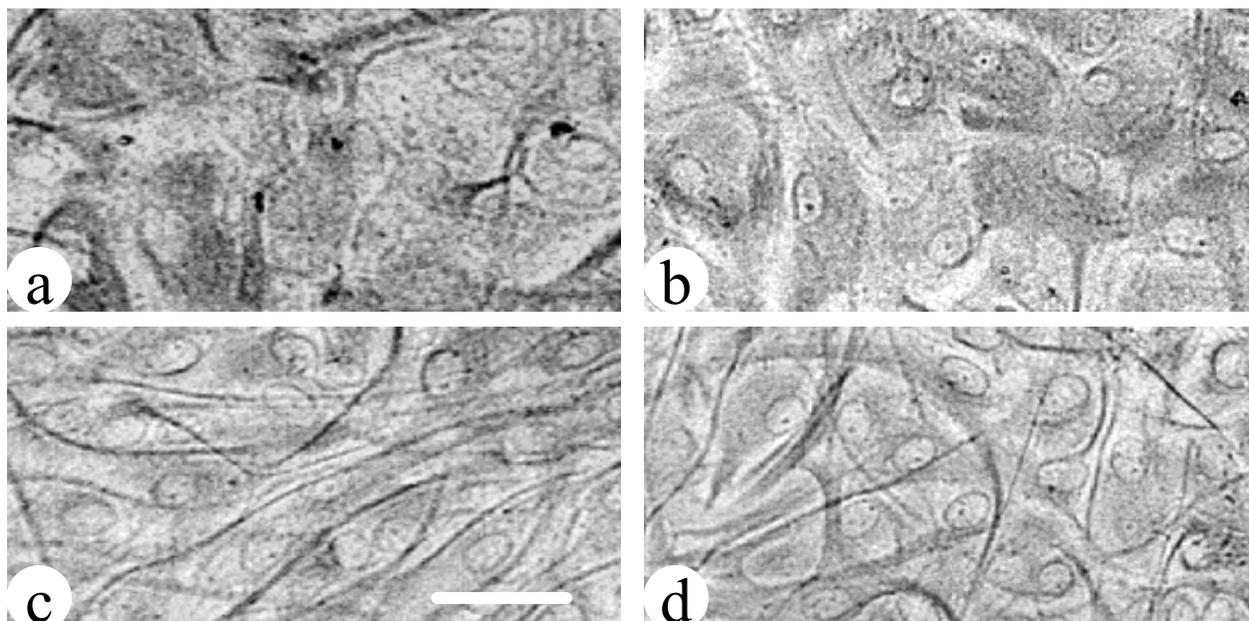


Figura 14. Imunocitoquímica para GFAP. Culturas de astrócitos confluentes foram incubadas com meio contendo glutamato de potássio (GtK) durante 10 minutos em presença (b, c e d) ou ausência (a) de digitonina $30\mu\text{M}$. Após, este meio foi substituído por outro meio livre de digitonina contendo EGTA 1mM (b), AMPc $10\mu\text{M}$ (c) ou forskolina $10\mu\text{M}$ (d). As células foram fixadas e marcadas com anti-GFAP policlonal como descrito em materiais e métodos. Barra corresponde a $10\mu\text{m}$.

IV.11. Imunocitoquímica para S100B

A imunocitoquímica para S100B revelou que em células intactas (15a) esta proteína está distribuída uniformemente pelo citoplasma da célula. Quando o astrócito foi permeabilizado e posteriormente incubado em condições basais (15b), foi percebida uma redução no conteúdo de S100B, em concordância com dados referentes a dosagem desta proteína por ELISA (14A). Esta perda, entretanto, foi menor na região perinuclear. Deve-se considerar, neste caso, que ensaios de imunocitoquímica não fornecem dados quantitativos.

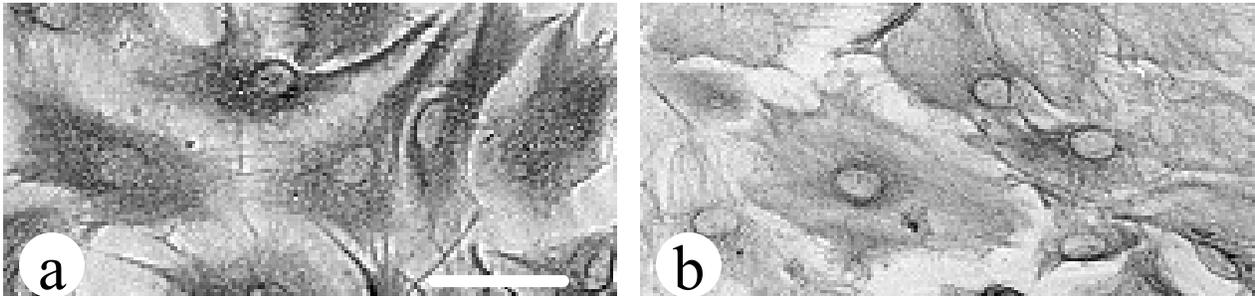


Figura 15 Imunocitoquímica para S100 β . O procedimento aqui realizado foi semelhante ao da figura 11. Em a temos uma cultura intacta e b uma cultura permeabilizada com 30 μ M de digitonina por 10 minutos e após incubada com meio GtK contendo EGTA 1mM. As células foram fixadas e incubadas com anti-S100 β monoclonal como descrito em materiais e métodos. Barra corresponde a 10 μ m.

V. Discussão

V.1. Culturas

As culturas utilizadas em nossos experimentos tinham idade entre 15 e 25 dias. Observamos que partindo da quantidade de células semeadas nas placas ($1,5 \times 10^5$ células/cm²) tínhamos, já ao final da segunda semana de cultivo, a monocamada de astrócitos praticamente estabelecida e assim permanecia desde que não houvesse repique desta cultura para a produção de subcultivos. Isto porque os astrócitos em cultura primária conservam a característica que apresentam *in situ* de inibição do processo de divisão celular pelo contato de sua membrana com células vizinhas (inibição por contato). Esta propriedade, entretanto, é perdida quando são feitos subcultivos, tendendo a formação de uma linhagem celular.

Neste período (15 a 25 dias) a cultura apresenta predominantemente astrócitos do tipo 1, caracterizados entre outros aspectos, pelo formato poligonal. Outros tipos celulares como astrócito do tipo 2, oligodendrócito, microglia e neurônio tendem a colocar-se sobre a monocamada de astrócitos tipo 1, sendo facilmente removidos durante as trocas de meio.

Gottfried (1996) demonstrou, através de imunocitoquímica com anticorpo para GFAP, o grau de pureza destas culturas (mais de 95% das células GFAP positivas). Além disto, a incubação das culturas com anticorpo para β tubulinalll, uma proteína marcadora de neurônios, demonstrou a ausência deste tipo celular já ao final da segunda semana de cultivo (Vinadé et al. 1997).

V.2. Escolha do método de permeabilização celular

As técnicas de permeabilização surgiram com a necessidade de se eliminar a barreira formada pela membrana plasmática da célula ganhando acesso aos sítios intracelulares e ainda assim mantendo preservada sua organização interna.

Estudos acerca de processos de transdução de sinal (Slowiejko et al., 1994) e mecanismos de secreção celular (Dayanithi e Nordmann, 1989; Roth e Burgoyne, 1995; Gutiérrez et al., 1995; Henz et al., 1996) tem se beneficiado destes sistemas celulares “semi-intactos” para, controlando a concentração interna de íons e moléculas impermeáveis célula, ampliar o conhecimento a respeito destes processos.

Dentre os principais métodos de permeabilização celular descritos na literatura destacam-se a eletroporação (Knight e Baker, 1982), o uso de detergentes não iônicos como digitonina e saponina (Dunn e Holz, 1983; Wilson e Kirshner, 1983) e o uso de toxinas bacterianas como a α -toxina ou estreptolisina O (Dekker, 1989). Levando em consideração características relevantes destas metodologias, optamos pelo uso da digitonina como agente permeabilizante neste trabalho.

Para realização da eletroporação seria necessário a aquisição de um aparelho apropriado para a aplicação de pulsos elétricos sobre as células, o que elevaria consideravelmente o custo de nosso trabalho, necessitando também o uso de células em suspensão. Nas nossas culturas de astrócitos, as células encontram-se aderidas a um substrato e, obviamente, unidas entre si. Para sua ressuspensão haveria a necessidade de tratamento com enzimas como a tripsina, por exemplo, que digere proteínas da matriz extracelular facilitando a dissociação celular. Sabe-se, no entanto, que este processo pode alterar a atividade de receptores de membrana, mais precisamente receptores glutamatérgicos do tipo NMDA (Allen et al., 1988). A ressuspensão promove também a manipulação excessiva e desnecessária das células podendo ocasionar alterações em seu funcionamento.

A α -toxina abre poros muito pequenos na membrana plasmática (Tabela 2), permitindo somente a entrada de moléculas como íons e nucleotídeos na célula. A estreptolisina O, que assim como a digitonina age ligando-se ao colesterol, abre poros maiores que 15 nm de diâmetro, possibilitando a passagem de moléculas grandes como peptídios e anticorpos. Todavia, não há estudos acerca de possíveis efeitos que estas toxinas possam ter sobre as células.

Além de exigirem maiores cuidados na manipulação, as toxinas bacterianas são mais caras e instáveis que detergentes como digitonina e saponina.

Entre digitonina e saponina elegemos o primeiro destes por parecer mais adequado as nossas necessidades. Trata-se do método de permeabilização mais amplamente empregado na literatura e por conseguinte temos mais informações a respeito dos seus efeitos sobre as células. Sabe-se, por exemplo, que a digitonina disponível comercialmente apresenta alto grau de pureza, enquanto a saponina, também um glicosídeo de origem vegetal, pode apresentar contaminantes como a própria digitonina. Em trabalhos prévios comparamos a permeabilização de astrócitos em cultura obtida com digitonina e saponina, ambos nas concentrações de 15 e 30 μ M, durante 10 e 20 minutos, e obtivemos resultados semelhantes em todos os pontos (Karl, 1996).

A digitonina liga-se ao colesterol formando poros com arranjo micelar, apresentando-se assim como um método seguro quanto a preservação de organelas, visto que estas são pobres ou mesmo desprovidas deste lipídio (Tabela 1). Controlando concentração de digitonina e tempo de incubação previne-se danos às membranas internas, conseqüentemente o comprometimento da maquinaria celular.

Um dado interessante apresentado na literatura consiste na existência de estruturas na membrana plasmática chamadas *calveolae*, que entre outras características são ricas em colesterol (Park et al., 1998), podendo corresponder aos domínios mais sensíveis a digitonina na membrana das células.

Nos diversos trabalhos já publicados utilizando a digitonina como agente permeabilizante, as concentrações empregadas para este fim variam entre 10 e 150 μ M e os tempos de incubação, de 10 a 30 minutos (Schulz, 1990; Nakanishi et al., 1995). Neste caso deve-se levar em consideração o tipo celular em estudo uma vez que a composição de lipídios da membrana plasmática, como por exemplo o colesterol, pode ser variável entre eles, refletindo numa maior ou menor eficiência da digitonina sobre a membrana. Isto pode ser ilustrado com o fato de que para obtermos cerca de 80% dos astrócitos permeabilizados precisamos utilizar 30 μ M de digitonina por 10 minutos, enquanto em células cromafins da

medula adrenal bovina obtem-se 90% de permeabilização utilizando somente 15 μ M deste detergente durante 5 minutos (Gonçalves et al., 1997).

O objetivo do trabalho a ser realizado é outro fator determinante na padronização das condições de permeabilização. Altas concentrações de digitonina são normalmente usadas para indução de um grande rompimento celular em experimentos voltados a medição de estoques intracelulares de Ca²⁺ (Nadal et al., 1996) e metabólitos celulares (Siushansian et al., 1995). No entanto, concentrações de digitonina maiores que 320 μ M podem danificar as mitocôndrias (Huang e Philbert, 1995).

V.3. Padronização das condições de permeabilização com a digitonina

Decidimos permeabilizar os astrócitos em cultura com 30 μ M de digitonina por 10 minutos. Este tempo e concentração foram eleitos pois nestas condições obteve-se 80% de células permeabilizadas, de acordo com o ensaio de exclusão ao azul de Tripán, valor semelhante ao obtido com 20 minutos de incubação no mesmo meio. Além disto a perda protéica média foi cerca de 25% nestas condições e como já havíamos observado em estudos prévios, a perda de LDH neste intervalo de tempo de permeabilização era de 20%, enquanto aos 20 minutos era 70%, indicando uma grande perda citoplasmática (Karl, 1996).

V.4. Por que permeabilizar astrócitos?

Várias técnicas foram desenvolvidas com o objetivo de investigar proteínas quinases e fosfatases atuantes sobre GFAP e vimentina, cada qual com suas vantagens e desvantagens.

Em primeiro lugar a possibilidade de se cultivar astrócitos é de grande importância para a investigação de processos específicos destas células. No nosso caso o objetivo foi investigar o sistema fosforilante das proteínas de filamentos intermediários. As culturas oferecem a vantagem de poderem ser mantidas por longos períodos de tempo e assim como as fatias cerebrais, terem seu meio externo manipulado. Ao permeabilizarmos estas células com digitonina

porém, nossas possibilidades de estudo ampliam-se consideravelmente. Os poros com cerca de 10nm de diâmetro permitem a introdução de íons e nucleotídeos como ATP e AMPc na célula, além de moléculas grandes como polipeptídeos.

Nos ensaios de fosforilação protéica em astrócitos permeabilizados com digitonina, utilizamos $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$ e não ^{32}P -fosfato. Apesar do processo de permeabilização celular não afetar mitocôndrias e por isto as células estarem aptas a sintetizarem ATP a partir do ^{32}P -fosfato fornecido, a etapa de marcação dos astrócitos permeabilizados dura somente 10 minutos, não sendo tempo suficiente para formação de uma quantidade razoável de $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$ e ainda a fosforilação de proteínas a partir deste. Além disto, com o emprego $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$ podemos, no momento da análise dos resultados, selecionar somente fosforilação correspondente às proteínas das células permeabilizadas, visto que nesta forma o ATP não atravessa a membrana de astrócitos intactos. Considerando que normalmente trabalhamos em presença de 20% de células intactas, a marcação radioativa destas poderia eventualmente mascarar um resultado relativo a fosforilação de proteínas de células permeabilizadas.

O AMPc, outro nucleotídeo passível de ser introduzido no astrócito permeabilizado, é um importante segundo mensageiro o qual exerce grande parte de seus efeitos celulares via modulação de proteínas quinases e fosfatases. Ele é produzido a partir de ATP pela enzima adenilato ciclase a qual encontra-se localizada na face interna da membrana plasmática. A introdução intracelular do AMPc pode ser comparada à estimulação da adenilato ciclase por forskolina (Pollenz e McCarthy, 1986), ou ainda a introdução de análogos do AMPc permeáveis a membrana como o dibutilil-AMPc e 8-Br-AMPc.

O Ca^{2+} , outro segundo mensageiro e modulador de grande parte das atividades celulares, também pode ter sua concentração intracelular manipulada nos astrócitos permeabilizados. Em células intactas as alterações na concentração de Ca^{2+} interno podem se dar somente através da abertura de canais da membrana plasmática permeáveis a este cátion, promovendo sua entrada na célula a favor do gradiente (extracelularmente encontra-se na faixa de 1 a 2 mM, concentração bem mais elevada que no meio intracelular), ou a mobilização de

seus estoques intracelulares, principalmente do retículo endoplasmático. Assim sendo, fica difícil um controle preciso de sua concentração citoplasmática. Cabe aqui ressaltar que mínimas alterações nos níveis de Ca^{2+} intracelular podem gerar significativas alterações no funcionamento celular.

Além disto, IP_3 e cADPR, ambos agentes mobilizadores de estoques intracelulares de Ca^{2+} , podem ser introduzidos em células permeabilizadas e atuarem sobre eles (Morita et al.,1997). Consideramos, neste caso, que os receptores para estas drogas permanecem funcionais e responsivos a estímulos, assim como os canais de membrana.

Outra possibilidade que surge como uso de astrócitos permeabilizados é a introdução de moduladores específicos de proteínas quinases e fosfatases nestas células. Em células intactas, para o estudo do sistema fosforilante de GFAP e vimentina podem ser utilizados moduladores de proteínas quinases e fosfatases permeáveis a membrana plasmática, embora sua ação sobre elas seja relativamente específica, podendo ter outros alvos protéicos celulares. Exemplos destes são o ácido ocadaico, (inibidor de proteínas fosfatases), KN93 e KN92 (ambos inibidores de proteínas quinases), entre tantos outros. Por outro lado, ativadores ou inibidores seletivos de proteínas quinases e fosfatases, por serem de natureza peptídica, requerem a quebra desta barreira e para isto são obtidas as frações subcelulares. Neste caso, entretanto, rompe-se completamente a compartimentalização celular, a qual sabemos ser fundamental para processos de transdução de sinal, principalmente no que diz respeito a localização e proporção de proteínas quinases, fosfatases e seus substratos.

A permeabilização de astrócitos em cultura com digitonina possibilitará a adição de moduladores peptídicos específicos de proteínas possivelmente envolvidas no sistema fosforilante da GFAP e vimentina. Exemplos destes são o peptídeo inibidor de PKA, PKAi 5-22-amida (TTYADFIASGRTGRRNAI-NH₂), o inibidor de PKC, PKCi 19-31-amida (RFARKGALRQKNV-NH₂), ambos produzidos com base nas sequências auto-inibitórias destas proteínas (Gonçalves et al., 1997) e ainda o peptídeo TRTK-12 que ligando-se a S100 (α e β) impede sua ligação a substratos protéicos como a GFAP (Bianchi et al.,1996; Donato, 1999).

V.5. O meio de permeabilização

A composição do meio de permeabilização é um fator fundamental a ser considerado na padronização desta técnica. Devemos ter o cuidado de minimizar o impacto gerado pelo contato do meio intracelular como meio extracelular, buscando aproximar a concentração elementos como Na^+ , K^+ e Ca^{2+} normalmente tão distintas nestes dois compartimentos.

O papel da membrana plasmática como barreira seletiva da célula é crucial para o equilíbrio de suas funções uma vez que mantém as diferenças essenciais entre o citosol e o meio extracelular. Íons como Na^+ , K^+ , Ca^{2+} e Cl^- não tem a habilidade de atravessar livremente esta estrutura, sendo seu transporte através dela realizado basicamente através de proteínas carreadoras ou canais cuja atividade é regulada por sinais transitórios. Graças a esta propriedade da membrana plasmática é possível a formação de gradientes iônicos através dela, os quais podem ser utilizados para direcionar o movimento transmembrana de solutos específicos assim como no caso dos neurônios e células musculares, para produzir e transmitir sinais elétricos. No caso de Na^+ e K^+ , por exemplo, Na^+ encontra-se na faixa de 145mM no meio extracelular e entre 5-15mM no meio intracelular (Alberts et al., 1996). Já o K^+ encontra-se na faixa de 5mM no meio extracelular e 140mM no meio intracelular. Fisiologicamente portanto, parece mais adequado utilizar um meio contendo mais K^+ do que Na^+ nos ensaios de permeabilização.

Quanto ao Ca^{2+} , tendo em vista que células eucarióticas mantém concentrações citoplasmáticas muito baixas deste cátion (grande parte do Ca^{2+} interno encontra-se associado a proteínas ou armazenado em organelas) em relação ao meio extracelular e como já foi dito, mínimas oscilações deste podem ter efeitos modulatórios expressivos sobre determinadas proteínas quinases e fosfatases, decidimos primeiramente trabalhar com meios livres de Ca^{2+} nos ensaios de permeabilização, o que chamamos de condições basais.

Assim como os cátions presentes no meio de permeabilização, a natureza aniônica deste deve também ser considerada. Diversos estudos neste sentido

mostraram ser necessário encontrar a composição iônica ideal para cada metodologia de permeabilização utilizada (Schulz, 1990). Na permeabilização de células cromafins com digitonina, por exemplo, o meio contendo glutamato de potássio (GtK) tem sido bastante utilizado (inclusive em ensaios de fosforilação de proteínas nestas células), enquanto um meio contendo o ânion cloreto (Cl^-) inibiu a secreção de catecolaminas em células cromafins eletropermeabilizadas.

Nós comparamos o efeito dos meios contendo os ânions glutamato, gluconato e cloreto e os cátions Na^+ e K^+ sobre a permeabilização de astrócitos com digitonina e vimos que neste aspecto não há diferença entre eles. Constatação semelhante já fora obtida em células cromafins (Gonçalves et al., dados não publicados).

O Ca^{2+} , por eventualmente estar presente em nossos ensaios de fosforilação, também foi avaliado quanto a seus efeitos no processo de permeabilização. Está descrito que o Ca^{2+} tem um efeito estabilizador sobre bicamadas lipídicas (Rzigalinski et al., 1997).

Em nossos experimentos o Ca^{2+} promoveu a redução da permeabilização quando presente durante esta etapa, assim como o fechamento de poros previamente abertos pela digitonina de forma tempo e concentração dependente. Em parte este resultado pode estar relacionado à estabilização (ou diminuição da fluidez) da membrana plasmática uma vez que o Ca^{2+} ligando-se aos seus lipídios poderia lhe conferir maior “rigidez” ou resistência a ação da digitonina. Este poderia ser considerado um efeito “direto”, estando mais relacionado ao resultado obtido com Ca^{2+} durante a permeabilização.

Por outro lado, não podemos ignorar a idéia de que se os poros já estão abertos e depois disto é adicionado o Ca^{2+} , seria mais lógico que, uma vez diminuindo a fluidez da membrana, fosse mais difícil o fechamento destes poros. Entretanto não foi o que observamos.

Uma hipótese para explicar este efeito de fechamento de poros previamente abertos pela digitonina quando há adição de Ca^{2+} (poderia ser considerado um mecanismo “indireto”) seria por processo semelhante ao que ocorre na liberação de neurotransmissores: Neste caso as células poderiam

reparar danos na membrana plasmática translocando vesículas lipídicas desde o complexo de Golgi até ela (Dawidowicz, 1987), com a subsequente fusão das vesículas nos pontos onde a bicamada lipídica fora danificada (o que para nós corresponderia justamente aos poros formados pela digitonina), promovendo um “resselamento” desta. Tem sido sugerido que as anexinas, proteínas ligantes de Ca^{2+} e fosfolipídios, seriam responsáveis por este movimento, e que a fusão das vesículas na membrana plasmática dependeria de elevações na concentração de Ca^{2+} local, em torno de 10 a $100\mu\text{M}$ (Steinhardt et al., 1994). Estas concentrações foram utilizadas em nossos experimentos e mostraram-se efetivas no fechamento dos poros.

Existem, ainda, relatos na literatura de que cátions como o Ca^{2+} exercem seus efeitos sobre a permeabilização da membrana plasmática através da ligação em sítios específicos para eles. Por isto, seu efeito dependeria mais da composição da membrana, que varia de um tipo celular para outro, do que da natureza do agente permeabilizante (Bashford et al., 1988). Esta idéia corrobora com os resultados obtidos por nós com o uso de Mg^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} e Mn^{2+} , onde somente o primeiro deles não teve efeito sobre a permeabilização, enquanto os três demais, assim como o Ca^{2+} , reduziram a permeabilização dos astrócitos.

Outro dado que ilustra a idéia de que características particulares relativas a composição da membrana plasmática são responsáveis pelo efeito que os cátions exercem sobre ela, está nas linhagens celulares do tipos HeLa, L929, 3T3 e 3T6. Estas, quando permeabilizadas por diferentes agentes, ao contrário do observado em astrócitos, sofrem redução da permeabilização em presença de Mg^{2+} (2mM), efeito este revertido por Ca^{2+} (2mM) (Otero e Carrasco, 1987). Por outro lado o efeito “protetor” do Ca^{2+} sobre a permeabilização da membrana plasmática do astrócito com digitonina também fora observado em células cromafins da medula adrenal bovina (Gonçalves et al., dados não publicados)

V.6. Nucleotídios vs. Permeabilização

Como mencionado na introdução, em tipos celulares como células de Langherhans, fibroblastos, mastócitos e macrófagos o ATP tem efeito permeabilizante (Weisman et al., 1989; Schulz, 1990; Gomperts e Tatham, 1992; Girolomoni et al., 1993), enquanto em células como a linhagem 3T3 isto não ocorre (Arav e Friedberg, 1985). Neste caso foi mostrado que a dissociação dos fosfatos β e γ do ATP não é essencial para a permeabilização da membrana, sendo somente a ligação do ATP a esta suficiente para iniciar o processo de permeabilização (parece envolver o inchamento da célula e consequente ruptura da membrana).

Em diversos modelos experimentais nos quais se trabalha com células permeabilizadas são utilizados, pelo menos em alguma etapa dos experimentos, meios contendo ATP ou outros nucleotídios. Exemplos disto são experimentos voltados a investigação de mecanismos envolvidos no processo de exocitose, onde a possível influência dos nucleotídios na permeabilização das células parece ser normalmente desconsiderada.

Foi nosso interesse verificar os efeitos que o ATP provoca no processo de permeabilização de astrócitos com digitonina visto que este nucleotídio é utilizado em nossos ensaios de fosforilação de proteínas, embora em concentração na faixa de μM .

Curiosamente vimos que em astrócitos o ATP exerce efeito oposto ao descrito em outros tipos celulares, isto é, reduz a permeabilização quando adicionado junto à digitonina e promove o fechamento dos poros previamente abertos por ela quando adicionado após a etapa de permeabilização. Este efeito foi crescente conforme aumentou a concentração do ATP, contudo não sabemos por que mecanismo ele se dá. Poderemos melhor caracteriza-lo fazendo uso de outros agentes permeabilizantes e outros nucleotídios.

Cabe aqui ressaltar a importância de se avaliar se a permeabilização celular é afetada por algum dos componentes presentes nos experimentos aos quais são expostas. Isto é fundamental para uma correta interpretação dos dados obtidos.

V.7. Fosforilação de proteínas em astrócitos permeabilizados com digitonina

Confirmando os resultados obtidos previamente relativos a fosforilação de GFAP e vimentina em células intactas e frações citoesqueléticas, nos astrócitos permeabilizados observou-se também o aumento da fosforilação destas proteínas em resposta a Ca^{2+} e AMPc. Com relação ao Ca^{2+} , entretanto, seu efeito estimulatório sobre a a fosforilação de GFAP e vimentina mostrou-se menos intenso, quando comparado ao obtido em fração citoesquelética de ratos imaturos (Leal et al., 1997).

O tempo de incubação, o tipo de molécula radioativa utilizada ($[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$ ou ^{32}P -fosfato) e sua concentração devem ser adaptados de acordo com a metodologia empregada no estudo da fosforilação de proteínas como GFAP e vimentina (Tabela 3). Estes aspectos devem ser considerados na tentativa de se estabelecer uma correlação quanto ao grau de incorporação geral de ^{32}P nas proteínas para a comparação de dados obtidos pelos diferentes métodos.

Nas células intactas, isto é, fatias cerebrais e culturas de astrócitos, utiliza-se $5\mu\text{Ci}$ de ^{32}P -fosfato numa incubação com duração de 60 minutos. O ^{32}P -fosfato tem a capacidade de atravessar a membrana plasmática íntegra e servir como substrato para a produção de $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$, uma vez que estas células não tem seu meio intracelular alterado, muito menos a atividade mitocondrial. O período de 60 minutos garante não só a formação de $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$ bem como sua utilização por proteínas quinases na fosforilação de seus substratos.

Na fosforilação de proteínas em fração citoesquelética a situação apresenta-se de forma diferente. Neste caso, por obter-se somente a porção correspondente ao citoesqueleto e proteínas associadas a ele como quinases e fosfatases, deve-se fornecer diretamente $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$. Considera-se também que tendo acesso de maneira mais “direta” aos sistemas fosforilantes dos filamentos intermediários, o tempo de incubação deve ser curto, na faixa de 2 minutos, pois excedendo este tempo, proteínas fosfatases podem estar agindo mais efetivamente sobre as fosfoproteínas.

A incubação dos astrócitos permeabilizados com digitonina, por sua vez, dura 10 minutos. Isto porque em um intervalo de tempo maior, a perda protéica decorrente poderia comprometer a atividade celular. Isto pode esclarecer o porque da baixa incorporação de ^{32}P nas fosfoproteínas em astrócitos permeabilizados em relação aos intactos.

	^{32}P -fosfato	$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$	Tempo
Células Intactas	5 μCi	–	60 minutos
Células Permeabilizadas	–	10 μCi	10 minutos
Fração Citoesquelética	–	2 μCi	2 minutos

Tabela 3. Tabela comparativa entre as condições de incubação radioativa nas diferentes metodologias empregadas no estudo da fosforilação de GFAP e vimentina.

Como observamos em nossos resultados comparativos entre a fosforilação protéica em astrócitos intactos e permeabilizados em condições basais, o perfil de migração das proteínas não é modificado, entretanto a fosforilação de algumas proteínas é significativamente alterada. A vimentina, por exemplo, em astrócitos permeabilizados tem sua fosforilação consideravelmente reduzida em relação ao obtido nas células intactas, tanto em condições basais quanto estimulada por AMPc e Ca^{2+} , enquanto seu imunoconteúdo não foi alterado. O mesmo não é observado com a GFAP, que nesta fase da cultura co-existe com a vimentina. Parece que neste caso a redução da fosforilação da vimentina deve-se somente a alterações no balanço entre quinases e fosfatases atuantes sobre ela. Parece também que o seu sistema fosforilante difere, pelo menos em parte, do da GFAP.

Nas mesmas condições constatamos que uma proteína de cerca de 40kDa (indicada com asterisco na figura 11) tem sua fosforilação aumentada em astrócitos permeabilizados. Pode-se especular neste caso que a(s) proteína(s) fosfatase(s) atuante(s) sobre ela esteja sendo perdida(s) ou inibida(s) nestas condições.

Em presença de Ca^{2+} 1 μM percebe-se uma sensível estimulação na fosforilação de GFAP, entretanto, aos 10 μM deste cátion há uma redução geral da

fosforilação a qual torna-se mais evidente aos 100 μ M e 1mM. Provavelmente isto se deva ao fechamento de poros promovido por Ca²⁺ nestas concentrações, o que impede a entrada de [γ ³²P]ATP nas células.

Foi mostrado então, que mesmo permeabilizados os astrócitos permanecem funcionais e responsivos a estímulos no que diz respeito aos sistemas de fosforilação protéica. Obtivemos dados coerentes aos previamente encontrados em fatias hipocâmpais, culturas de astrócitos intactas e frações citoesqueléticas.

V.8. Perda de proteínas na permeabilização

Apesar de 25% do conteúdo protéico total dos astrócitos ser perdido em decorrência do processo de permeabilização, não houveram alterações significativas no imunoc conteúdo de GFAP e vimentina, mostrando que este processo não deve danificar o filamento intermediário destas células. Já S100B, proteína que distribui-se no citoplasma, associada a membranas, ao citoesqueleto ou mesmo ao núcleo (Millward et al., 1998) sofreu redução de 43%. É mais provável que a porção citoplasmática seja a mais afetada neste caso.

Apesar de não tratar-se de um método quantitativo, a imunocitoquímica para S100B parece estar confirmando os dados obtidos com a quantificação desta por ELISA, ou seja, a perda protéica. Pode ser visto ainda que uma porção da S100B segue o perfil dos filamentos de GFAP, correspondendo talvez a fração associada a eles e que de alguma forma regula sua fosforilação (Ziegler et al., 1997).

Corando os géis com azul de Comassie observamos que uma proteína de aproximadamente 90kDa fora bastante perdida no processo de permeabilização celular (70%). Não sabemos sua identidade, mas com a facilidade com que foi perdida, mesmo tendo o praticamente o dobro do peso molecular de GFAP, provavelmente seja uma proteína solúvel citoplasmática.

V.9. Estrutura dos filamentos intermediários em astrócitos permeabilizados com digitonia

Finalmente, por imunocitoquímica para GFAP podemos avaliar a estrutura dos filamentos intermediários no processo de permeabilização bem como sua funcionalidade tanto em condições basais quanto em presença de AMPc e forskolina.

O fato dos astrócitos incubados com forskolina (10 μ M), AMPc (10 μ M) e Ca²⁺ (dados não mostrados), responderem formando processos demonstra que as células permeabilizadas tem a dinâmica dos seus filamentos intermediários preservada. Isto abre a possibilidade de se investigar alterações estruturais destes filamentos em paralelo a fosforilação de proteínas em presença de moduladores de proteínas quinases e fosfases que normalmente não atravessam a membranas intactas.

Tendo em mãos a técnica de permeabilização de astrócitos em cultura com digitonina temos também a possibilidade de investigar o envolvimento do Ca²⁺ proveniente de estoques intracelulares no processo de fosforilação de proteínas, como por exemplo pela introdução de IP₃ e cADPR na célula (Morita et al., 1997). Cada uma destas moléculas tem seus receptores específicos em organelas que armazenam Ca²⁺, como o retículo endoplasmático, e sabe-se que sua mobilização é responsável por modular diversos eventos celulares dentre os quais está a organização do citoesqueleto.

VI. CONCLUSÕES

VI.1. Permeabilização

- Uma permeabilização de 80% foi obtida ao incubar os astrócitos com 30 μ M de digitonina durante 10 minutos;
- Não houve diferença na permeabilização celular ao se utilizar meios de diferentes naturezas iônicas;
- Ca²⁺ a partir de 19 μ M promoveu uma redução na permeabilização quando presente durante esta etapa, assim como promoveu um fechamento dos poros previamente abertos pela digitonina quando empregado após a permeabilização (concentração e tempo-dependente);
- Cátions divalentes como Mn²⁺, Ni²⁺ e Cd²⁺ (1mM) também promoveram a redução (50-60%) da permeabilização celular, enquanto o Mg²⁺ (5mM) não apresentou tal efeito;
- ATP (10 e 100 μ M) promoveu a redução da permeabilização se utilizado tanto durante quanto após esta etapa;

VI.2. Fosforilação

- Dentre os meios utilizados, o glutamato de potássio favoreceu a incorporação geral de ³²P-fosfato nas proteínas;
- AMPc estimulou a fosforilação de GFAP e vimentina já a partir de 1 μ M;
- O Ca²⁺ (<5 μ M) estimulou a fosforilação de GFAP e vimentina, embora acima de 10 μ M tenha provocado a diminuição da incorporação ³²P-fosfato nas proteínas. Isto provavelmente ocorreu em função do fechamento dos poros provocado por este cátion;
- Quando comparado com células intactas, a fosforilação da vimentina em astrócitos permeabilizados mostrou-se bastante reduzida;

VI.3. Perda protéica

- GFAP e vimentina não tiveram seu imunoconteúdo alterado com o processo de permeabilização. Já a S100B foi reduzida em 57%, enquanto p90, em ceca de 70%. Proteína total teve perda de 23% em relação as células intactas;

VI.4. Imunocitoquímica

- Os filamentos de GFAP não sofreram alterações em sua estrutura em condições basais, enquanto em presença de AMPc (10 μ M) ou forskolina (10 μ M) houve a formação de processos. Isto mostra a atividade da adenilato ciclase e PKA não foram comprometidas na permeabilização;
- Em concordância com os dados obtidos com ELISA para S100B, a imunocitoquímica, embora não seja um método quantitativo, mostra uma redução desta proteína estando em maior concentração próximo ao núcleo.

VII. CONCLUSÃO GERAL

Estes resultados sugerem que a técnica de permeabilização de astrócitos em cultura com digitonina tem um potencial considerável para o estudo de alterações estruturais nos filamentos intermediários destas células em paralelo à fosforilação de proteínas, uma vez que permitirá a adição de moduladores peptídicos específicos de quinases e fosfatases.

VIII. BIBLIOGRAFIA

ALBERTS B., BRAY D., LEWIS J., RAFF M., ROBERTS K., WATSON J.D. (1997) Estrutura da membrana plasmática. *Em, Biologia Molecular da Célula*, 3^a ed, pp.477-506.

ALLEN C.N., BRADY R., SWANN J., HORI N., CARPENTER D.O. (1988) N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors are activated by trypsin. *Brain Research*, 458: 147-150.

ARAV R., FRIEDBERG I.(1985) ATP analogues induce membrane permeabilization in transformed mouse fibroblasts. *Biochimica et Biophysica Acta*, 820(2): 183-188.

ARNAIZ G.R.L., IRALDI A.P. (1985) Subcellular fractionation. *In*, Neuromethods: general neurochemical techniques, edited by Alan A. Boulton e Glen B. Baker, Humana ress, Clifton, New Jersey, pp 19-67.

BANKER G.A., GOSLIN K. (1982) Primary dissociated cell cultures of neural tissue. *In Culturing Nerve Cells*, edited by Banker G., Goslin K., The Mit Press, London, cap. 3.

BARRES B.A. (1991) Glial ion channels. *Current Oppinion in Neurobiology*, 1: 354-359.

BASHFORD C.L., ALDER G.M., GRAHAM J.M., MENESTRINA G., PASTERNAK C.A. (1988) Ion modulation of membrane permeability: Effect of cations on intact cells and on cells and phospholipid bilayer terated with pore-forming agents. *The Journal of Membrane Biology*, 103: 79-94.

BHAKDI S., WELLER U., WALEV I., MARTIN E., JONAS D., PALMER M. (1993) A guide to the use of pore-forming toxins for controlled permeabilization of cell membranes. *Medical Microbiology and Immunology (Berl)*, 182(4): 167-175.

BIANCHI R., GARBUGLIA M., VERZINI M., GIAMBANCO I., IVANEKOV V.V., DIMLICH R.V.W., JAMIESON JR.G.A., DONATO R. (1996) S-100 (α e β) binding peptide (TRTK-12) blocks S-100/GFAP interaction: identification of a putative S-100 target epitope within the head domain of GFAP. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1313: 258-267.

BUTLER M. (1991) Serum-free media for neuronal cell culture. *In, Neuronal Cell Lines- A Pratical Approach*, edited by J.N. Wood, IRL Press, Oxford, pp. 55-75.

CHURN S.B., LIMBRICK D., SOMBATI S., DELORENZO R.J. (1994) Exitotoxic activation of NMDA receptor results in inhibition of calcium/calmodulin kinase II activity in cultured hippocampal neurons. *Journal of Neuroscience*, 15: 3200-3214.

CLAPHAM D.E. (1995) Calcium Signaling. *Cell*, 80: 259-168.

COLES J.A. (1995) Glial cells and the supply of substrates of energy metabolism to neurones. *In*, Neuroglia, edited by Helmut Kettenmann e Bruce R. Ransom, Oxford Univerity Press, New York, pp.793-804.

CORBIN J.D., OGREID D., MILLER J.P., SUVA R.H., JASTORFF B., DOSKELAND S.O. (1986) Studies of cGMP analog specificity and function of the two intrasubunit binding sites of cGMP dependent protein kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 48: 1917-1924.

CORVALAN V., COLE R., DE VELLIS J., HAGIWARA S. (1990) Neuronal modulation of calcium channel activity in cultured rat astrocyte. *Neurobiology*, 87: 4345-4348.

DAYANITHI G., NORDMANN J.J. (1989) Chloride and magnesium dependence of vasopressin release from rat permeabilized neurohypophysial nerve endings. *Neuroscience Letters*, 106: 305-309.

DAWIDOWICZ E.A. (1987) Dynamics of membrane lipid metabolism and turnover. *Annual Reviews in Biochemistry*, 56: 43-61.

DEKKER L.V., DE GRAAN P.N.E., PIJNAPPEL P., OESTREICHER A.B., GISPEN W.H. (1991) Noradrenalina release from streptolysin O-permeated rat cortical synaptosomes: Effects of calcium, phorbol esters, protein kinase inhibitors, and antibodies to the neuron-specific protein kinase C substrate B-50 (GAP-43). *Journal of Neurochemistry*, 56: 1146-1153.

DONATO R. (1999) Functional roles of S100 proteins, calcium-binding proteins of the EF-hand type. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1450:191-231.

DUNKLEY P.R., JARVIE P.E., SIM A.T.R. (1996) Protein phosphorylation and dephosphorylation in the nervous system. *In*, Protein phosphorylation: A practical approach, edited by Turner A.J., Bachelard H, IRL press, Oxford, pp.201-228.

DUNN L.A., HOLZ R.W. (1983) Catecholamine secretion from digitonin-treated adrenal medullary chromaffin cells. *Journal of Biological Chemistry*, 258: 4989-4993.

EICHHOLTZ T., ALBLAS J., VAN OVERVELD M., MOOLENAAR W., PLOEGH H. (1990) A pseudosubstrate peptide inhibits protein kinase C-mediated phosphorylation in permeabilized Rat-1 cells. *FEBS*, 261: 2387-2396.

ENG L.F., GHIRNIKAR R.S. (1994) GFAP and astrogliosis. *Brain Pathology*, 4: 229-237.

ENG L.F., LEE Y.L. (1995) Intermediate filaments in astrocytes. *In*, Neuroglia, edited by Helmut Kettenmann e Bruce R. Ransom, Oxford Univerity Press, New York, pp.650-666.

FAWCETT J.M., HARRISON S.M., ORCHARD C.H. (1998) A method for reversible permeabilization of isolated rat ventricular myocytes. *Experimental Phisiology*, 83(3): 293-303.

FRESHNEY I.R. (1994) Advantages of tissue culture. *In*, Culture of animal cells: A manual of basic technique. Edited by R. Ian Freshney, Wiley-Liss, New York, pp.4-5.

FUSE T., YOON K.W., KATO T., YAMADA K. (1998) Heat inducad apoptosis in human glioblastoma cell line AI72. *Neurosurgery* ,42(4): 843-849.

GIROLOMONI G., SANTANTONIO M.L., PASTORE S., BERGSTRESSER P.R., GIANNETTI A. CRUZ P.D.JR (1993) Epidermal langerhans cells are resistant to the permeabiizing effects of extracellular ATP: in vitro evidence supporting a protective role of membrane ATPase. *Journal of Investigation in Dermatology*, 100(3): 282-287.

GIULIAN D., YOUNG D.G., WOODWARD J., BROWN D.C., LACHMAN I.B. (1988) Interleukin-1 is na astroglial growth factor in developing brain. *Journal of Neuroscience*, 8: 709-714.

GIULIAN D. (1995) Microglial and neuronal disfunction. *In*, Neuroglia, edited by Helmut Kettenmann e Bruce R. Ransom, Oxford Univerity Press, New York, pp. 671-684.

GOMPERTS B.D., TATHAM P.E.R. (1992) Regulated exocitosis secretion from permeabilized cells. *Methods in Enzimology*, 219: 178-189.

GONÇALVES C.A., HALL A., SIM A.T.R., BUNN S.J., MARLEY P.D., CHEAH T.B., DUNKLEY P.R. (1997) Tyrosine hydroxylase phosphorylation in digitonin-permeabilized bovine adrenal chromaffin cells: The effect of protein kinase and phosphatase inhibitors on Ser¹⁹ and Ser⁴⁰ phosphorylation. *Journal of Neurochemistry*, 69: 2387-2396.

GONÇALVES C.A., RODNIGHT R. (1992) Apparent identity of ppH-47, a protein highly phosphorylated in hippocampus, with a form of glial fibrillary acidic protein. *Neuroscience Research Communications*, Vol.11 No. 2: 109-117.

GONÇALVES C.A., SALBEGO C.G., WOFCHUK S.T., ROCHA E., RODNIGHT R. (1990) Properties of a protein phosphorylating system that labels a 47kDa phosphoprotein (ppH-47) in slices of rat hippocampus. *Neuroscience Research Communications*, Vol.6 No.3: 129-133.

GOTTFRIED C. (1996) Dissociação celular e cultura de astrócitos de hipocampo: padronização metodológica e análise eletroforética do perfil fosfoprotéico. Tese de mestrado, Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS, Porto Alegre.

GOTTFRIED C., VALENTIM L., SALBEGO C., KARK J., WOFCHUK S.T., RODNIGHT R. (1999) Regulation of protein phosphorylation in astrocyte cultures by external calcium ions: specific effects on the phosphorylation of glial fibrillary acidic protein (GFAP), vimentin and heat shock protein 27 (HSP-27). *Brain Research*, 833: 142-149.

GOWER H., RODNIGHT R. (1982) Intrinsic protein phosphorylation in synaptic plasma membrane fragments from the rat. General characteristics and migration behaviour on polyacrilamide gels of the main phosphate acceptors. *Biochimica et Biophysica Acta*, 716: 45-52.

GREEN J.A.E., KEIR G., THOMPSON E.J. (1997) A specific and sensitive ELISA for measuring S100B in cerebrospinal fluid. *Journal of Immunology Methods*, 205: 35-41.

GUTIÉRRES L.M., CÀNAVES J.M., FERRER-MONTIEL A.V., REIG J.A., MONTAL M., VINIEGRA S. (1995) A peptide that mimics the carboxi-terminal domains of SNAP-25 blocks Ca²⁺-dependent exocytosis in chromaffin cells. *FEBS Letters*, 372: 39-43.

HAMPRECHT B., DRINGEN R. (1995) Energy metabolism. *In*, Neuroglia, edited by Helmut Kettenmann e Bruce R. Ransom, Oxford University Press, New York, pp.473-487.

HATTEN M.E., MASON C.A. (1990) Mechanisms of glial-guided neuronal migration in vitro and in vivo. *Experientia*, 15;46(9): 907-916.

HARRISON B.C., MOBLEY P.L. (1989) Phorbol ester-induced change in astrocyte morphology: correlation with protein kinase C activation and protein phosphorylation. *Journal of Neuroscience Research*, 25: 1723-1730.

HARRISON B.C., MOBLEY P.L. (1992) Phosphorylation of glial fibrillary acidic protein and vimentin by cytoskeletal-associated intermediate filament protein kinase activity in astrocytes. *Journal of Neurochemistry*, 58: 320-327.

HEEGARD H., BJERRUM O.J. (1988) Immunoblotting: General principles and procedures. In, *Handbook of Immunoblotting of Proteins*, edited by O.J. Bjerrum e N.H. Heegard, Boca Raton, Florida, vol.1,pp.1-15.

HENZ J.J.H., OESTREICHER A.B., DE WIT M., MARQUART A., GISPEM W-H., DE GRAAN P.N.E. (1996) Evidence for a role of calmodulin in calcium-induced noradrenaline release from permeated synaptosomes: effects of calmodulin antibodies and antagonists. *Journal of Neurochemistry*, 66: 1933-1942.

HU J., FERREIRA A., VAN ELDIK L.J. (1997) S100 β induces neuronal cell death through nitric oxide release from astrocytes. *Journal of Neurochemistry*, 69: 2294-2301.

HU J., VAN ELDIK L.J. (1996) S100 β induces apoptotic cell death in cultured astrocytes via a nitric oxide-dependent pathway. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1313: 139-145.

HUANG J., PHILBERT M.A. (1995) Distribution of glutathione-related enzyme systems in mitochondria and cytosol of cultured cerebellar astrocytes and granule cells. *Brain Research*, 680: 16-22.

HUNTER K.E., HATTEN M.E. (1995) Radial glial cell transformation to astrocytes is bidirectional: regulated by a diffusible factor in embryonic forebrain. *Proc. of National Academy of Science USA*, 92(6): 2061-2065.

HUNTER T. (1995) Protein kinases and phosphatases: The yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell*, 80: 225-236.

INAGAKI M., NAKAMURA Y., TAKEDA M., NISHIMURA T., INAGAKI N. (1994) Glial fibrillary acidic protein: dynamic property and regulation by phosphorylation. *Brain Pathology*, 4(3): 239-243.

INOUE M., INO Y., ISHIDA T. (1992) Calcium binding to phospholipid. Structural study of calcium glycerolphosphate. *Journal of Lipid Research*, 33: 985-994.

IWATA E., ASANUMA M., NISHIBAYASHI S., KONDO Y., OGAWA N. (1997) Different effects of oxidative stress on activation of transcription factors in primary cultured rat neuronal and glial cells. *Brain Research- Molecular Brain Research*, 50 (1-2): 213-230.

JUANG R.H., CHANG Y.D., SUNG H., SU J.C. (1984) Over-drying method for polyacrilamide gel slab packed in cellophane sandwich. *Analytical Biochemistry*, 141: 348-350.

JUNQUEIRA L.C., CARNEIRO J. (1989) Tecido Nervoso. *In*, Histologia Básica, 7ª edição, Editora Guanabara, pp.120-145.

KANDEL E.R. (1985) Brain and Behavior. *In*, Principles of Neural Science, edited by E.R. Kandel e J.H. Schwartz, 2ª ed, Elsevier, New York, pp. 3-12.

KAO L-S. (1988) Calcium homeostasis in digitonin-permeabilized bovine chromaffin cells. *Journal of Neurochemistry*, 51: 221-227.

KARL J. (1997) Permeabilização de astrócitos em cultura com digitonina: um modelo para o estudo da fosforilação da GFAP. Dissertação de Bacharelado, Ciências Biológicas, Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS, Porto Alegre.

KARL J., GOTTFRIED C., TRAMONTINA F., DUNKLEY P., RODNIGHT R., GONÇALVES C.A. (1999) GFAP phosphorylation studied in digitonin permeabilized astrocytes: standardization of conditions. Submitted to Brain Research.

KIMELBERG H.K., KATZ D.M. (1985) High-affinity uptake of serotonin into immunocytochemically identified astrocytes. *Science*, 228: 889-891.

KIMELBERG H.K., NOREMBERG M.D. (1989) Astrocytes. *Scientific American*, 260: 66-76.

KNIGHT D.E., BAKER P.F. (1982) Calcium dependence of catecholamine release from bovine adrenal medullary cells after exposure to intense electric fields. *Journal of Membrane Biology*, 68: 107-140.

KITANAKA J., ONOE H., BABA A. (1991) Astrocytes possess prostaglandin F_{2α} receptors coupled to phospholipase C. *Biochemistry and Biophysical Research Communication*, 178: 946-952.

LEE S.A., HOLZ R.W. (1986) Protein phosphorylation and secretion in digitonin-permeabilized adrenal chromaffin cells. *Journal of Biological Chemistry*, 261: 17089-17098.

LEVISON S.W., MCCARTHY K.D. (1982) Astroglia in culture. *In*, Culturing Nerve Cells, edited by G. Banker e K. Gosslin, The MIT Press, London, pp.309-336.

LIPTON P. (1985) Brain slices- Uses and abuses. *In*, Neuromethods: general neurochemical techniques, edited by Alan A. Boulton e Glen B. Baker, Humana Press, Clifton, New Jersey, pp. 69-115.

MCCARTHY K.D., PRIME J., HARMON T., PLENZ R. (1985) Receptor mediated phosphorylation of astroglial intermediate filament proteins in cultured astroglia. *Journal of Neurochemistry*, 44: 723-730.

MILLWARD T.A., HEIZMANN C.W., SCHÄFER B.W., HEMMINGS B.A. (1988) Calcium regulation of Ndrprotein kinase mediated by S100 calcium binding proteins. *EMBO Journal*, 17: 5913:5922.

MORGAN A., WILKINSON M., BURGOYNE R.D. (1993) Identification of Exo2 as the catalytic subunit of protein kinase A reveals a role for cyclic-AMP in Ca^{2+} -dependent exocytosis in chromaffin cells. *The EMBO Journal*, vol.12, no.10, pp. 3747-3752.

MORITA K., KITAYAMA S., DOHI T. (1997) Stimulation of cyclic ADP-ribosynthesis by acetylcholine and its role in catecholamine release in bovine adrenal chromaffin cells. *Journal of Biological Chemistry*, 272: 21002-21009.

MÜLLER W., HENEMANN U., SCHUCHMANN S. (1997) Impaired Ca-signaling in astrocytes from Ts16 mouse model of Down Syndrome. *Neuroscience Letters*, 223: 81-84.

NADAL A., FUENTES E., MCNAUGHTON P.A. (1996) Albumin stimulates uptake of calcium into subcellular stores in rat cortical astrocytes. *Journal of Physiology*, 492: 737-750.

NAKANISHI N., ONOZAWA S., MATSUMOTO R., HASEGAWA H., MINAMI N. (1995) Vesicular monoamine uptake by digitonin-permeabilized PC12 cells: inhibitory effect of modulators and drugs on the amine transport. *Journal of Biochemistry (Tokyo)*, 118(2): 291-296.

NAOR Z., DAN-COHEN H., HERMON J., LIMOR R. (1989) Induction of exocytosis in permeabilized pituitary cells by α - and β -type protein kinase C. *Proc. of National Academy of Science USA*, 86: 4501-4504.

NARIN A.C., SHENOLIKAR S. (1992) The role of protein phosphatase in synaptic transmission, plasticity and neuronal development. *Current Opinion in Neurobiology*, 2: 296-301.

NESTLER E.J., GREENGARD P. (1984) Protein Kinases. *In*, Protein phosphorylation in the nervous system, edited by Eric J. Nestler e Paul Greengard, John Wiley & Sons, New York, pp.17-80.

NESTLER E.J., GREENGARD P. (1993) Protein phosphorylation and regulation of neuronal function. *In*, Basic Neurochemistry, edited by George J. Siegel, Bernard W. Agranoff, R. Wayne Albers, Perry B. Molinoff, Raven Press, New York, pp 449-474.

NEWMAN E.A. (1995) Glial cell regulation of extracellular potassium. *In*, Neuroglia, edited by Helmut Kettenmann e Bruce R. Ransom, Oxford Univerity Press, New York, pp.717-731.

ORLOWSKI S., MIR L.M. (1993) Cell electropermeabilization: a new tool for biochemical and pharmacological studies. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1154(1): 51-63.

OTERO M.J., CARRASCO L. (1987) Control of membrane permeability in animal cells by divalent cátions. *Experimental Cell Research*, 169: 531-542.

PADMANABHAN J., SHELANSKI M.L. (1998) Process formation in astrocytes: modulation of cytoskeletal proteins. *Neurochemical Research*, 23(3): 377-384.

PARK H., GO Y., ST.JOHN P.L., LISANTI M.P., ABRAHAMSON D.R., JO H. (1998) Plasma membrane cholesterol is a key molecule in shear stress-dependent actication of extracellular signal-regulated kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(48): 32304-32311.

POCOTTE S.L., FRYE R.A., SENTER R.A., TERBUSH D.R., LEE S.A., HOLZ R.A.W. (1985) Effects of phorbol ester on catecholamine secretion and protein phosphorylation in adrenal medullary cell cultures. *Proc. Natural Academy of Science USA*, 82: 930-934.

POLLENZ R.S, MCCARTHY K.D. (1986) Analysis of cAMP-dependent changes in intermediate filament protein phosphorylation and cell morphology in cultured astroglia. *Journal of Neurochemistry*, 47: 9-17.

PRIVAT A., GIMENEZ-RIBOTTA M., RIDET J. (1995) Morphology of astrocytes. *In*, Neuroglia, edited by Helmut Kettenmann e Bruce R. Ransom, Oxford Univerity Press, New York, pp.3-22.

RAINE C. (1993) Neurocellular anatomy. *In*, Basic Neurochemistry, edited by George J. Siegel, Bernard W. Agranoff, R. Wayne Albers, Perry B. Molinoff, Raven Press, New York, pp.3-32.

ROBERTSON P.L., BRUNO G.R., DATTA S.C. (1990) Glutamate-stimulated, guanine nucleotide-mediated phosphoinositide turnover in astrocytes is inhibited by cyclic AMP, *Journal of Neurochemistry*, 55: 1727-1733.

ROBERTSON R.T., ZIMMER J., GÄHWILER B.H. (1989) Dissection procedures for preparation of slice cultures. *In A Dissection and Tissue Culture Manual of the Nervous System*, edited by Abraham Shahar, Jean de Vellis, Antonia Vernadakis, Bernard Haber, Alan R. Liss, Inc., New York, pp. 1-15.

RODNIGHT R., GONÇALVES C.A., WOFCHUK S.T., LEAL R. (1997) Control of the phosphorylation of the astrocyte marker glial fibrillary acidic protein (GFAP) in the immature rat hippocampus by glutamate and calcium ions: possible key factor in astrocytic plasticity. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 30: 1-14.

ROTH D., BURGOYNE R.D. (1995) Stimulation of catecholamine secretion from adrenal chromaffin cells by 14-3-3 proteins is due to reorganization of the cortical actin network. *FEBS Letters*, 374: 77-81.

RZIGALINSKI B.A., LIANG S., MCKINNEY J.S., WILLOUGHBY K.A., ELLIS E.F. (1997) Effect of Ca^{2+} on in vitro astrocyte injury. *Journal of Neurochemistry*, 68: 289-296.

SCHULZ I. (1990) Permeabilizing cells: Some methods and applications for the study of intracellular processes. *Methods in Enzymology*, 192: 280-300.

SCHWARTZ J.P., MISHLER K. (1990) Beta-adrenergic receptor regulation, through cyclic AMP, of nerve growth factor expression in rat cortical and cerebellar astrocytes. *Cell Molecular Neurobiology*, 10: 447-457.

SCOTTO C., DELOUME J.C., ROUSSEAU D., CHAMBAZE., BAUDIER J. (1998) Calcium and S100B regulation of p53-dependent cell growth, arrest and apoptosis. *Molecular and Cellular Biology*, Vol.18 No.7: 4272-4281.

SHAO Y., MCCARTHY K.D. (1994) Plasticity of astrocytes. *Glia*, 11: 147-155.

SIUSHANSIAN R., WILSON J.X. (1995) Ascorbate transport and intracellular concentration in cerebral astrocytes. *Journal of Neurochemistry*, 65: 41-49.

SLOWIEJKO D.M., LEVEY A.I., FISHER S.K. (1994) Sequestration of muscarinic cholinergic receptors in permeabilized neuroblastoma cells. *Journal of Neurochemistry*, 62: 1795-1803.

SMOLEN J.E., SANDBORG R.R. (1990) Ca^{2+} -induced secretion by electropermeabilized human neutrophils. The roles of Ca^{2+} , nucleotides and protein kinase C. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1052(1): 133-142.

SORCI G., AGNELETTI A.L., BIANCHI R., DONATO R. (1998) Association of S100B with intermediate filaments and microtubules in glial cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1448: 277-289.

STECHER B., AHNERT-HILGER G., WELLER U., KEMMER T.P., GRATZL M. (1992) Amylase release from streptolysin O-permeabilized pancreatic acinar

cells. Effects of Ca^{2+} , guanosine 5'[gamma-thio]triphosphate, cyclic AMP, tetanus toxin and botulinum A toxin. *Biochemical Journal*, 283 (Pt3): 899-904.

STEINHARDT R.A., BI G., ALDERTON J.M. (1994) Cell membrane resealing by a vesicular mechanism similar to neurotransmitter release. *Science*, 263: 390-393.

STREIT W.J. (1993) Microglial-neuronal interactions. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 6(4): 261-266.

STREIT W.J. (1995) Microglial cells. *In*, Neuroglia, edited by Helmut Kettenmann e Bruce R. Ransom, Oxford University Press, New York, pp.85-96.

STREIT W.J. (1996) The role of microglia in brain injury. *Neurotoxicology*, 17(3-4): 671-678.

SZUCHET S. (1995) The morphology and ultrastructure of oligodendrocytes and their functional implications. *In*, Neuroglia, edited by Helmut Kettenmann e Bruce R. Ransom, Oxford University Press, New York, pp.23-43.

TAKUMA T., ICHIDA T. (1994) Catalytic subunit of protein kinase A induces amylase release from streptolysin O-permeabilized parotid acini. *Journal of Biological Chemistry*, 269: 22124-22128.

TSUJIMURA K., TANAKA J., ANDO S., MATSUOKA Y., KUSUBATA M., SUGIURA H., YAMAUCHI T., INAGAKI M. (1994) Identification of phosphorylation sites on glial fibrillary acidic protein for cdc2 kinase and Ca^{2+} -calmodulin-dependent protein kinase II. *Journal of Biochemistry*, 116: 426-434.

VERNADAKIS A., KENTROTI S. (1994) Glial cells derived from aged brain in culture display both mature and immature astrocytic phenotypes. *Journal of Neuroscience Research*, 38: 451-458.

VINADÉ L., RODNIGHT R. (1996) The dephosphorylation of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in the immature rat hippocampus is catalyzed mainly by a type 1 protein phosphatase. *Brain Research*, 732: 195-200.

VINADÉ L., GONÇALVES C.A., WOFCHUK S., GOTTFRIED C., RODNIGHT R. (1997) Evidence for a role for calcium ions in the dephosphorylation of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in immature hippocampal slices and in astrocyte cultures from the rat. *Developmental Brain Research*, 104, p 11-17.

VIRTA M., AKERMAN K.E., SAVIRANTA P., OKER-BLOM C., KARP M.T. (1995) Real-time measurement of cell permeabilization with low-molecular-weight membranolytic agents. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 36(2): 303-315.

WALAAS S.I., GREENGARD P. (1991) Protein phosphorylation and neuronal function. *Pharmacological Reviews*, 43: 299-349.

WALZ W. (1989) Role of glial cells in the regulation of the brain ion microenvironment. *Progress in Neurobiology*, 33: 309-333.

WEISMAN G.A., DE B.K., PRITCHARD R.S. (1989) Ionic dependence of extracellular ATP-induced permeabilization of transformed mouse fibroblasts: role of plasma membrane activities that regulate cell volume. *Journal of Cell Physiology*, 138: 375-383.

WILSON S.P. KIRSHNER N. (1983) Calcium-evoked secretion from digitonin-permeabilized adrenal chromaffin cells. *Journal of Biological Chemistry*. 258: 4994-5000.

WOFCHUK S.T., RODNIGHT R. (1990) Stimulation by glutamate of the phosphorylation of two substrates of protein kinase c, B-50/GAP 43 and MARKS, and of the ppH-47, a protein highly labelled in incubated slices from the rat hippocampus. *Neuroscience Research Communications*, Vol.6 No.3: 135-139.

WOFCHUK S.T., RODNIGHT R. (1995) Age-dependent changes in regulation by external calcium ions of the phosphorylation of glial fibrillary acidic protein in slices of rat hippocampus. *Developmental Brain Research*, 85: 181-186.

WOLBURG H., RISAU W. (1995) Formation of the blood-brain barrier. In, Neuroglia, edited by Helmut Kettenmann e Bruce R. Ransom, Oxford University Press, New York, pp.763-776.

XU D.Z., LU Q., KUBICKA R., DEITCH E.A. (1999) The effect of hipoxia/reoxygenation on the cellular function of intestinal epithelial cells. *Journal of Trauma*, 46(2): 280-285.

ZIEGLER D., INNOCENTI C., LEAL R., RODNIGHT R., GONÇALVES C.A. (1998) The S100 β protein inhibits phosphorylation of GFAP e vimentin in citoesqueletal fraction from immature rat hippocampus. *Neurochemical Research*, 23(10): 1259-1263.

