

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA

Felippo Bifi

**CULTURA ORGANOTÍPICA HIPOCAMPAL DE RATOS WISTAR KYOTO:
PERFIL CELULAR E EFEITO DA GUANOSINA SOBRE A CAPTAÇÃO DE
GLUTAMATO**

Porto Alegre

2022

Felippo Bifi

**CULTURA ORGANOTÍPICA HIPOCAMPAL DE RATOS WISTAR KYOTO:
PERFIL CELULAR E EFEITO DA GUANOSINA SOBRE A CAPTAÇÃO DE
GLUTAMATO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Diogo Onofre Gomes de Souza

Porto Alegre

2022

CIP - Catalogação na Publicação

Bifi, Felippo

Cultura organotípica hipocampal de ratos Wistar
Kyoto: perfil celular e efeito da guanosina sobre a
captação de glutamato / Felippo Bifi. -- 2022.
55 f.

Orientador: Diogo Onofre Gomes de Souza.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2022.

1. cultura organotípica. 2. hipocampo. 3.
guanosina. 4. neurônio. 5. astrócito. I. Onofre Gomes
de Souza, Diogo, orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e à minha irmã por todo o incentivo, apoio e amor que transmitiram a mim, não só neste período de mestrado, mas como por toda a vida, mesmo nos momentos de dificuldade. Sem vocês nada seria possível.

Ao meu orientador Diogo Souza e à Francieli Rohden por todo o conhecimento, liberdade, paciência e dedicação que se propuseram a mim para realização deste projeto sem medir qualquer esforço. Obrigado por cada elogio e também por cada “puxão de orelha”.

Ao meu companheiro Darlan Castilho que esteve ao meu lado nos momentos de paz e alegria, mas também de angústias e frustrações. Obrigado por ter sido ouvido e por cada conselho prestado. Você fez esta trajetória ser mais leve.

À Débora Guerini e ao Léo Meira por todo o aprendizado passado e pelo auxílio na realização de vários experimentos que foram essenciais para o desenvolvimento deste mestrado. A ciência é justamente isso, um compartilhamento de ideias para a construção do conhecimento.

A todos amigos, familiares, colegas e ex-colegas que de alguma forma tiveram participação nesta etapa em minha vida, cada um de vocês tem um espaço guardado no coração.

E por último, mas não menos importante, a todo o corpo docente, direção e administração da universidade por oportunizarem, não só a minha formação, mas de todos que um dia sonham ou sonharam em mudar o mundo através da educação.

SUMÁRIO

PARTE I.....	7
RESUMO	8
ABSTRACT.....	9
LISTA DE ABREVIATURAS.....	10
LISTA DE FIGURAS.....	11
1. INTRODUÇÃO	12
1.1. Cultura primária e cultura organotípica.....	12
1.2. Cultura organotípica através dos anos	12
1.3. Cultura organotípica e suas aplicações.....	15
1.4. Hipocampo: neurônios e astrócitos	16
1.5. Cultura organotípica hipocampal.....	17
1.6. Guanosina.....	18
2. JUSTIFICATIVA	20
3. OBJETIVOS	21
3.1. Objetivo geral.....	21
3.2. Objetivos específicos	21
PARTE II.....	22
4. METODOLOGIA.....	23
4.1. Aspectos éticos.....	23
4.2. Animais.....	23
4.3. Cultura organotípica hipocampal.....	24
4.4. Avaliação da morte celular	24
4.5. Avaliação de células NeuN+ e GFAP+.....	25
4.6. Avaliação da complexidade de células GFAP+	26
4.7. Avaliação dos potencial e massa mitocondriais	26

4.8. Avaliação da captação de glutamato.....	27
4.9. Análise estatística	28
5. RESULTADOS	29
5.1. Avaliação da morte celular	29
5.2. Avaliação de células NeuN+ e GFAP+.....	29
5.3. Avaliação da complexidade de células GFAP+	31
5.4. Avaliação dos potencial e massa mitocondriais	31
5.5. Avaliação da captação de glutamato.....	33
PARTE III.....	34
6. DISCUSSÃO	35
7. CONCLUSÕES	42
8. PERSPECTIVAS	43
REFERÊNCIAS	44
ANEXO A - Carta de Aprovação da CEUA-IC/FUC.....	51
FIGURA SUPLEMENTAR A - Gráficos em dot plot da citometria de fluxo: Fatias hipocâmpais de fêmeas do DIV 1	52
FIGURA SUPLEMENTAR B - Gráficos em dot plot da citometria de fluxo: Fatias hipocâmpais de fêmeas do DIV 28	53
FIGURA SUPLEMENTAR C - Gráficos em dot plot da citometria de fluxo: Fatias hipocâmpais de machos do DIV 1.....	54
FIGURA SUPLEMENTAR D - Gráficos em dot plot da citometria de fluxo: Fatias hipocâmpais de machos do DIV 28.....	55

PARTE I

RESUMO

A cultura de células primárias *in vitro* é uma técnica bem estabelecida e utilizada por diversos grupos de pesquisa por todo o mundo. Nesta metodologia, pode-se compreender a forma que diferentes células, como neurônios, glia ou mesmo células do sistema periférico, se comportam frente a diferentes insultos ou mesmo no estudo de drogas ou fármacos em um ambiente isolado. Contudo, culturas de células primárias não refletem de forma fiel como o tecido original se comporta devido à falta de contato com outros tipos celulares. Na tentativa de superar este desafio, culturas tridimensionais foram desenvolvidas com o intuito de serem um modelo intermediário entre culturas de células primárias e experimentos *in vivo*. Dentre elas, a técnica da cultura organotípica mantém todos tipos celulares presentes no tecido, preserva a citoarquitetura tridimensional original bem como a comunicação entre estas células. Culturas organotípicas podem ser realizadas a partir de explante de tecido periférico, mas é no sistema nervoso central que há um maior interesse e investigação pela tentativa de melhor compreender mecanismos celulares de diferentes regiões cerebrais, entre elas, o hipocampo, devido a sua importância na consolidação da memória e aprendizado. Assim sendo, esta metodologia oferece possibilidades de estudo da fisiopatologia de diferentes modelos de doenças cerebrais e, para além disso, a cultura organotípica também nos permite a investigação de substâncias ou fármacos com potencial efeito neuroprotetor. Porém, mesmo com a infinidade de trabalhos utilizando esta técnica para fins de estudos de neurodegeneração/neuroproteção, pouco se sabe como células neuronais e gliais se apresentam durante o desenvolvimento e amadurecimento do hipocampo em cultura, sendo este então, o objetivo da presente dissertação. Além disso, nos propusemos a investigar a viabilidade celular e o efeito da guanosina sobre a captação de glutamato nas culturas. Com isso, entre outros resultados, este trabalho demonstrou que as fatias organotípicas hipocámpais de ratos Wistar Kyoto neonatos machos e fêmeas possuem uma viabilidade duradoura (28 dias) em cultura por não captarem iodeto de propídeo e também possuem mitocôndrias viáveis e funcionais demonstradas através de marcadores específicos. Quanto ao perfil celular destas fatias foi observado, através de citometria de fluxo, uma diminuição de células marcadas para as proteínas NeuN (neurônios) e GFAP (astrócitos) em machos após 28 dias de cultura, porém sem haver alteração na relação destas células (NeuN+/GFAP+) nos dias 1 e 28 de cultura. Verificamos um possível indicador de reatividade astrocitária foi observado através do aumento da complexidade das células que expressam GFAP para machos e fêmeas em cultura. Quanto à captação de glutamato, verificamos em machos, que a adição de guanosina foi capaz de prevenir a diminuição da captação no 28º dia de cultura, indicando um potencial efeito neuroprotetor via atenuação de potencial excitotoxicidade glutamatérgica. Assim sendo, mais resultados são necessários para elucidação de algumas hipóteses apresentadas neste trabalho, mas, de antemão, podemos concluir que a cultura organotípica é uma excelente ferramenta *in vitro* para estudarmos diferentes regiões cerebrais e suas vias de sinalização em diversos modelos de intervenções *in vivo* (exercício, dieta, entre outras) e *in vitro*, incluindo estratégias neuroprotetoras frente a modelos de injúria cerebral.

Palavras-chave: cultura organotípica; hipocampo; guanosina; neurônio; astrócito; glutamato; rato Wistar Kyoto.

ABSTRACT

In vitro primary cell culture is a well-established technique used by several research groups around the world. In this methodology, it is possible to understand the way that different cells, such as neurons, glia or even cells of the peripheral system, behave in the face of different insults or even in the study of drugs or substances in an isolated environment. However, primary cell cultures do not accurately reflect how the original tissue behaves due to lack of contact with other cell types. In an attempt to overcome this challenge, three-dimensional cultures were developed in order to be an intermediate model between primary cell cultures and in vivo experiments. Among them, the organotypic culture technique maintains all cell types present in the tissue, preserves the original three-dimensional cytoarchitecture as well as the communication between these cells. Organotypic cultures can be performed from peripheral tissue explants, but it is in the central nervous system that there is greater interest and investigation in an attempt to better understand cellular mechanisms of different brain regions, including the hippocampus, due to its importance in consolidation of memory and learning. Therefore, this methodology offers possibilities for studying the pathophysiology of different models of brain diseases and, in addition, organotypic culture also allows us to investigate substances or drugs with a potential neuroprotective effect. However, even with the infinity of works using this technique for purposes of neurodegeneration/neuroprotection studies, little is known about how neuronal and glial cells present themselves during the development and maturation of the hippocampus in culture, which is then the objective of the present dissertation. In addition, we investigated cell viability and the effect of guanosine on glutamate uptake in cultures. Thus, among other results, this work demonstrated that organotypic hippocampal slices from male and female neonate Wistar Kyoto rats have a long-lasting viability (28 days) in culture because they do not capture propidium iodide and also have viable and functional mitochondria demonstrated through markers specific. As for the cellular profile of these slices, a decrease in NeuN- (neurons) and GFAP- (astrocytes) labeled cells in males after 28 days of culture was observed through flow cytometry, but there was no change in the ratio of these cells (NeuN+/GFAP+) on days 1 and 28 of culture. We verified a possible indicator of astrocyte reactivity was observed through the increase in the complexity of GFAP-expressing cells for males and females in culture. As for glutamate uptake, we found in males that the addition of guanosine was able to prevent a decrease in uptake on the 28th day of culture, indicating a potential neuroprotective effect through attenuation of potential glutamatergic excitotoxicity. Therefore, more results are needed to elucidate some hypotheses presented in this work, but, beforehand, we are possible to conclude that organotypic culture is an excellent in vitro tool to study different brain regions and their signaling pathways in different models of in vivo interventions (exercise, diet, among others) and in vitro, including neuroprotective strategies against brain injury models.

Key words: organotypic culture; hippocampus; guanosine; neuron; astrocyte; glutamate; Wistar Kyoto rat.

LISTA DE ABREVIATURAS

Akt – Proteína cinase B

DIV – Dia *in vitro*

FSC – Ângulo de dispersão frontal

GFAP – Proteína ácida fibrilar glial

GLAST – Transportador de glutamato e aspartato

GLT-1 – Transportador de glutamato 1

GUO – Guanosina

IMF – Intensidade média de fluorescência

IP – Iodeto de propídeo

NeuN – Proteína nuclear neuronal específica

PI3K – Fosfatidilinositol-3-cinase

SSC – Ângulo de dispersão lateral

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Cultura organotípica através do método do “roller tube”	13
Figura 2 – Cultura organotípica através do método da membrana semipermeável ...	14
Figura 3 – Circuito sináptico do hipocampo.....	16
Figura 4 – Estrutura molecular da guanosina	19
Figura 5 – Avaliação da morte celular das culturas organotípicas hipocampais 28 dias em cultura através da incorporação de iodeto de propídeo.....	29
Figura 6 – Percentagem de células NeuN+ e GFAP+, e sua relação, nas fatias organotípicas hipocampais de fêmeas e machos nos DIV 1 e DIV 28, através de citometria de fluxo	30
Figura 7 – Avaliação da complexidade de células GFAP+ das fatias organotípicas hipocampais de fêmeas e machos nos DIV 1 e DIV 28, através de citometria de fluxo.....	31
Figura 8 – Percentagem de células comarcadas com os MitoTracker Red FM e MitoTracker Green FM, e a relação das suas respectivas intensidades médias de fluorescência, das fatias organotípicas hipocampais de fêmeas e machos nos DIV 1 e DIV 28, através de citometria de fluxo.....	32
Figura 9 – Captação de glutamato pelas fatias organotípicas hipocampais nos DIV 1 e DIV 28 sem e com adição de guanosina	33

1. INTRODUÇÃO

1.1. Cultura primária e cultura organotípica

A cultura de células primárias *in vitro* é uma técnica bem estabelecida e utilizada por diversos grupos de pesquisa por todo o mundo. Nesta metodologia, pode-se compreender a forma que diferentes células, como neurônios, glia ou mesmo células do sistema periférico, se comportam frente a diferentes insultos ou mesmo no estudo de drogas ou fármacos em um ambiente isolado. O desenvolvimento destas técnicas *in vitro* permitem uma maior praticidade de trabalho e também uma redução do uso de animais em experimentos (Patil et al., 2020). Contudo, culturas de células primárias não refletem de forma fiel como o tecido original se comporta devido à falta de contato com outros tipos celulares (Haycock, 2011; Humpel, 2015).

Na tentativa de superar este desafio, culturas tridimensionais foram desenvolvidas com o intuito de serem um modelo intermediário entre culturas de células primárias e experimentos *in vivo* (Carroll, Foliaki, & Haigh, 2021; Ravi et al., 2015). Dentre elas, na técnica da cultura organotípica, a região de interesse de estudo passa por um processo de seccionamento para manter uma espessura adequada que permita sua viabilidade em cultura por dias ou até mesmo semanas. Diferentemente da cultura primária, a cultura organotípica mantém todos tipos celulares presentes no tecido, preserva a citoarquitetura tridimensional original bem como a comunicação entre estas células, permitindo assim obtermos uma situação mais fiel ao ambiente *in vivo* (Hoppe et al., 2010; Humpel, 2015; Noraberg et al., 2005).

1.2. Cultura organotípica através dos anos

O termo “organotípico” foi primeiramente descrito em 1954 em um artigo

científico sobre a diferenciação do olho do embrião de galinha (Reinbold, 1954). Já a primeira atribuição da cultura organotópica com o sistema nervoso central foi baseada no estudo da hipófise de ratos (Bousquet & Meunier, 1962). Mas foi só em 1971 que Boyd fez a primeira descrição técnica da metodologia utilizando uma câmara que permitia o cultivo de grandes quantidades de diferentes tecidos (Boyd, 1971). Um avanço maior ocorreu uma década depois, em 1981, quando Gähwiler desenvolveu a técnica do “roller tube”, o qual as fatias eram coladas sobre lamínulas, inseridas dentro de tubos plásticos, e assim entravam em contato com o meio de cultura a partir do movimento rotacional do equipamento (Figura 1). Porém, foi verificado que neste modelo as células permaneciam em monocamada e as fatias poderiam inclusive cair das lamínulas (Gähwiler, 1981).

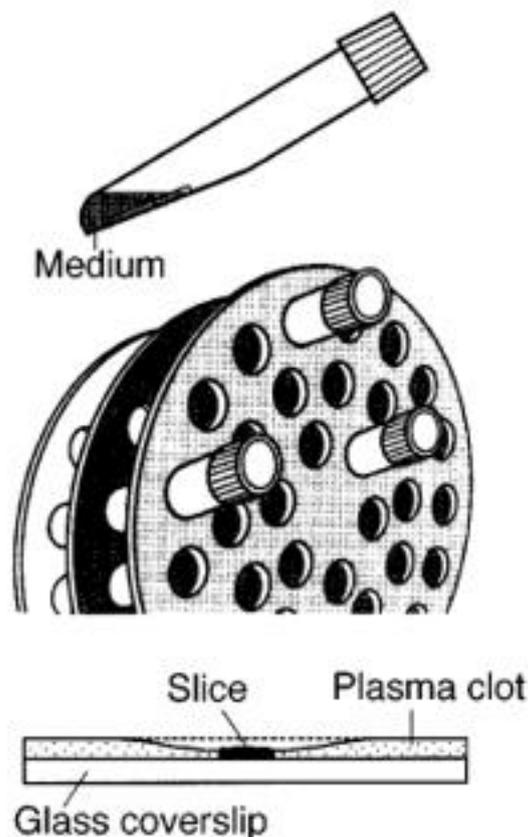


Figura 1. Cultura organotópica através do método do “roller tube”. Retirado de Gähwiler et al., 1997.

Foi então que Stoppini (1991) propôs a realização de cultura organotípica através do método da membrana semipermeável, o qual se observou maior viabilidade das células e verificou-se que, desta forma, estas se apresentam na forma de multicamada. Nesta metodologia, as fatias, após processamento do tecido, são alocadas sobre membranas semipermeáveis, colocadas sobre o meio de cultura que permanece na placa, e assim captam adequadamente os nutrientes e, simultaneamente, ficam em contato com o oxigênio em uma atmosfera controlada (Figura 2). A desvantagem de queda das fatias, observada na técnica do “roller tube”, agora não é mais considerada, pois as membranas apenas são manipuladas para a troca do meio de cultura e para a realização dos experimentos (Stoppini, 1991).

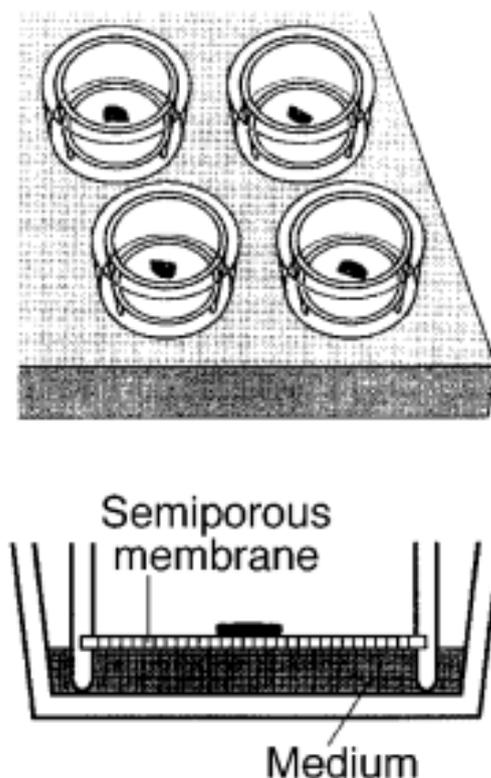


Figura 2. Cultura organotípica através do método da membrana semipermeável. Retirado de Gähwiler et al., 1997.

1.3. Cultura organotípica e suas aplicações

A cultura organotípica já foi realizada utilizando diferentes espécies de animais, como por exemplo em coelhos (Lye et al., 2007), mas foi em roedores, como ratos e camundongos, que grupos de pesquisa demonstraram maior interesse devido à praticidade de manipulação e por fins de legislações abrangendo a ética no uso animal (Humpel, 2015). Para esta técnica, os animais utilizados podem ser neonatos ou adultos. Sabe-se que para animais neonatos, com cerca de 6 a 10 dias de vida, há uma maior homogeneidade em modelos de lesões e uma maior viabilidade celular em cultura (Gähwiler, Thompson, & Muller, 2001; Marksteiner & Humpel, 2008). Por esta mesma razão, trabalhos utilizando culturas organotípicas de animais adultos são escassos, necessitando de maior exploração pelos grupos de pesquisa que estudam esta metodologia (Christian Humpel, 2018b).

Culturas organotípicas podem ser realizadas a partir de explante de tecidos periféricos, como do coração (Liu et al., 2020), do pulmão (Pomeranke, 2017) e do intestino (Markus et al., 2021). Mas é no sistema nervoso central (SNC) que há um maior interesse e investigação pela tentativa de melhor compreender mecanismos celulares de diferentes regiões cerebrais, como do cerebelo (Doussau et al., 2017), do hipotálamo (Martins et al., 2016) e dentre as mais estudadas devido a sua importância na consolidação da memória e aprendizado, o hipocampo (Frezza et al., 2013; Hoppe et al., 2013). Esta metodologia, por apresentar diversas vantagens já mencionadas, oferece possibilidades de estudo de diferentes modelos de doenças, como as neurodegenerativas, entre elas, a Doença de Alzheimer e a Doença de Parkinson, bem como de isquemia cerebral. Para além disso, a cultura organotípica também nos permite o estudo de substâncias ou fármacos com potencial efeito neuroprotetor,

oferecendo a possibilidade do tratamento *in vitro* ocorrer antes, durante ou ao final do insulto induzido, dependendo do objetivo do pesquisador (Cavaliere, Benito-Muñoz & Matute, 2016; Li, Han, & Wang, 2016; Noraberg et al., 2005).

1.4. Hipocampo: neurônios e astrócitos

O hipocampo, anatomicamente falando, é uma estrutura cerebral pertencente ao sistema límbico que é formada pela interligação das regiões do giro denteado (DG) e do corno de Ammon (CA). A região do CA ainda é subdividida em CA1, CA2 e CA3. Na região do DG predominam as células neuronais granulares e na região do CA as neuronais piramidais (Toni & Schinder, 2016). Estes neurônios, entre suas diversas funções, são responsáveis pelo recebimento, modulação e transmissão de diversas informações através de sinapses (Opitz, 2014). Quanto à circuitaria sináptica do hipocampo, sua principal aferência é a via perforante a qual se origina no córtex entorrinal e inerva as células granulares do DG. Também, as fibras musgosas (que são os axônios das células granulares) se projetam às células piramidais de CA3. Outra via importante nesta conexão é a via colateral de Schaffer, onde as células de CA3 emitem projeções para a região de CA1 (Figura 3) (Szirmai, Buzsáki, & Kamondi, 2012; Toni & Schinder, 2016).

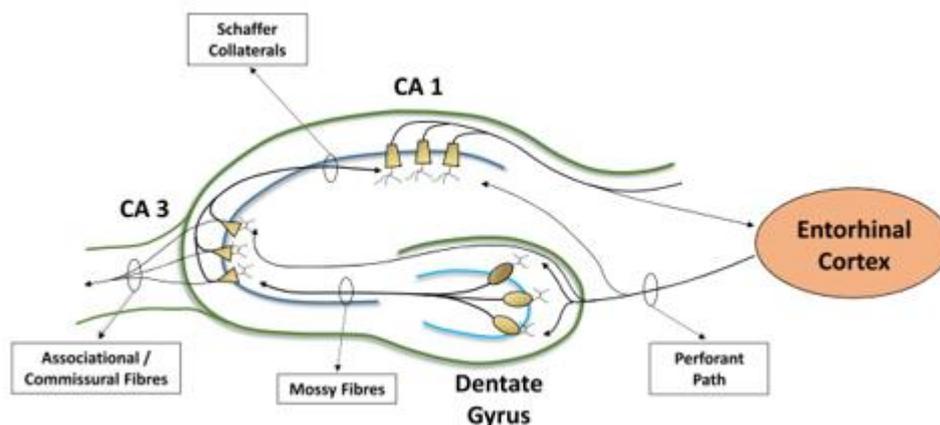


Figura 3. Circuito sináptico do hipocampo. Adaptado de Mancini et al., 2017.

Quanto às células da glia presentes no hipocampo e demais regiões do SNC, os astrócitos se destacam por suas diversas funções, sejam elas em condições fisiológicas ou patológicas. Estas células são divididas em dois grupos conforme sua morfologia e localização: protoplasmáticos (encontrados na substância cinzenta, com mais ramificações) e fibrosos (presentes na substância branca, apresentando menos ramificações) (Hasel & Liddel, 2021; Sofroniew & Vinters, 2010). Entre suas diversas funções, os astrócitos são capazes de captar substratos energéticos do sangue e fornecer aos neurônios (Andersen et al., 2021). Ainda, os astrócitos são responsáveis pela captação e liberação de diversas moléculas importantes na modulação de diversas vias de sinalização, entre elas, o glutamato, principal neurotransmissor excitatório do SNC que apresenta diversas funções fisiológicas, como nos processos de desenvolvimento e aprendizado, porém sua hiperestimulação através do acúmulo na fenda sináptica pode causar excitotoxicidade glutamatérgica (Rose et al., 2018).

1.5. Cultura organotípica hipocampal

Como mencionado anteriormente, o hipocampo é uma das regiões cerebrais mais exploradas em estudos envolvendo culturas organotípicas do SNC devido à sua importância na cognição, memória e vulnerabilidade ao envelhecimento (Lisman et al., 2017). No que diz respeito ao estudo de diferenças gênero-dependentes no hipocampo, Weis e colaboradores (2021) se propuseram a estudar o proteoma de ratos machos e fêmeas utilizando cultura organotípica hipocampal e dentre os resultados alcançados, pode-se verificar uma maior prevalência de metabolismo astrocitário para fêmeas e neuronal para os machos, indicando uma maior atividade glicolítica e oxidativa para obtenção de energia, respectivamente.

Tecnicamente falando, na cultura organotípica hipocampal, após dissecação do cérebro, fatias são seccionadas a partir do hipocampo dos animais em uma espessura que permita uma viabilidade adequada em cultura através de uma apropriada captação dos nutrientes presentes no meio de cultura, o qual contém, entre outros compostos, fatores de crescimento, carboidratos e proteínas. Isso permitirá, então, que as fatias hipocampais estabilizem e amadureçam *in vitro* para que os diferentes experimentos sejam realizados. (Christian Humpel, 2018a).

Diversos grupos de pesquisa que buscam melhor compreender a fisiopatologia de algumas doenças que acometem o hipocampo utilizam esta metodologia *in vitro* e, neste contexto, esta ferramenta nos permite o estudo de impactos relacionados a estresse oxidativo (Hoppe et al., 2013), neuroinflamação (Frezza et al., 2013), privação de oxigênio e glicose (Tasca, Dal-Cim, & Cimarosti, 2014), entre outros. Por outro lado, a cultura organotípica hipocampal também é alvo de estudo de substâncias neuroprotetoras/neuropreventivas. Na tentativa do descobrimento de fármacos que desacelerem a neurodegeneração que ocorre em muitas patologias ou mesmo por seus efeitos benéficos para prevenção destas enfermidades, diversas moléculas são desenvolvidas ou mesmo isoladas de suas fontes (Norberg et al., 2005).

1.6. Guanosina

Assim sendo, dentre estas moléculas citadas, a guanosina, um nucleosídeo endógeno que possui em sua estrutura uma guanina conectada a uma ribose via ligação glicosídica (Figura 4), tem despertado o interesse de cientistas, além de ser amplamente estudada em nosso grupo de pesquisa, devido aos diversos efeitos protetores observados. Ademais, a guanosina, para fins laboratoriais, é um insumo economicamente acessível.

No hipocampo, a guanosina já demonstrou modular diversas vias de sinalização, como por exemplo na ativação da via de sobrevivência da fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K)/proteína cinase B (Akt) e na modulação de canais de potássio ativados por cálcio de grande condutância (BK) em um modelo de isquemia cerebral *in vitro* (Dal-Cim et al., 2011).

Quanto à transmissão glutamatérgica, a guanosina apresentou ser neuroprotetora em diversos modelos de doenças e/ou condições que levam a danos cerebrais através de, entre outros efeitos, no aumento da captação de glutamato prevenindo, assim, excitotoxicidade. (Almeida et al., 2017; da Silva et al., 2020; Müller et al., 2021; Nonose et al., 2020). Porém, mesmo com a infinidade de trabalhos utilizando cultura organotípica para fins de estudos de neurodegeneração/neuroproteção, pouco se sabe como células neuronais e gliais se apresentam durante o desenvolvimento e amadurecimento do hipocampo em cultura.

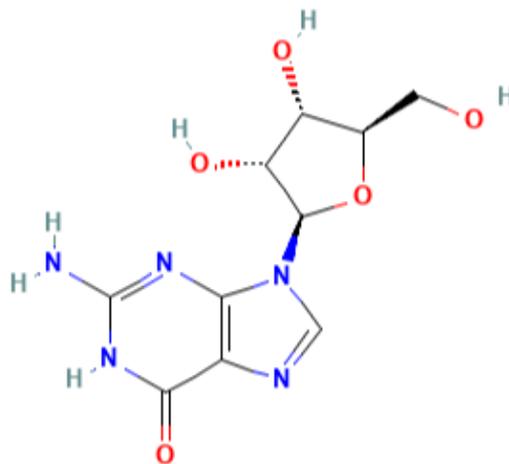


Figura 4. Estrutura molecular da guanosina. Retirado do site <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/135398635>>.

2. JUSTIFICATIVA

Diante do exposto, é de extrema importância compreender como células hipocâmpais se comportam durante a cultura organotípica, tornando possível um melhor entendimento do amadurecimento celular e dos mecanismos envolvidos em diversos impactos *in vivo* (exercício, dieta, entre outros), em patologias e também em estratégias neuroprotetoras/neuropreventivas. Neste estudo, nos propusemos estudar esta metodologia utilizando animais machos e fêmeas para verificar um possível efeito gênero-dependente, visto à escassez de trabalhos disponíveis na literatura com este enfoque. Além disso, este é o primeiro trabalho a avaliar o efeito das guanosina na captação de glutamato em cultura organotípica hipocâmpal.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar a viabilidade duradoura (28 dias) e o perfil celular (neurônios e astrócitos) de fatias organotípicas hipocampais de ratos Wistar Kyoto neonatos, machos e fêmeas e verificar o efeito da guanosina na captação de glutamato neste modelo.

3.2. Objetivos específicos

Avaliar durante a cultura organotípica:

- Dano/morte celular;
- Proporção de células GFAP+ e NeuN+;
- Complexidade das células GFAP+;
- Massa e potencial mitocondriais;
- Captação de glutamato.

PARTE II

4. METODOLOGIA

4.1. Aspectos éticos

Todos os experimentos com os animais foram conduzidos seguindo os cuidados preconizados pelas diretrizes governamentais oficiais, conforme a lei nº 11.794/2008 e as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), em relação à experimentação animal (Diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos - DBCA) e eutanásia (Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA), indicadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Cardiologia/Fundação Universitária de Cardiologia (CEUA/IC-FUC), bem como normativas internacionais como o “*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*” (publicação do NIH Nº 80-23, revisado em 1996) e as normas do “*Canadian Council on Animal Care - CCAC*”. Este projeto foi aprovado pela CEUA/IC-FUC, sob o protocolo UP 5935-21 (Anexo A). Vale ressaltar que este trabalho foi realizado durante a pandemia de COVID-19, a qual assolou nosso país até os dias atuais, e com isso, nos limitou no acesso a equipamentos, materiais e reagentes que seriam utilizados, inviabilizando assim, alguns experimentos planejados.

4.2. Animais

Ratos Wistar Kyoto neonatos (6-8 dias de vida), fêmeas e machos (n = 6-11 conforme experimento), utilizados neste projeto, foram obtidos do Biotério do Centro de Cardiologia Experimental (CCE) do Instituto de Cardiologia - Fundação Universitária de Cardiologia (IC-FUC), situado na Av. Princesa Isabel, 395 - Santana, Porto Alegre/RS. Os animais foram mantidos em suas ninhadas em caixas moradia

de policarbonato de 410x340x640 mm e a maravalha foi trocada a cada 2 dias. As mães dessas ninhadas receberam ração para roedores e água *ad libitum*. A sala em que ficam os animais foi mantida com temperatura regulada em $22 \pm 2^\circ\text{C}$ em ciclo de claro/escuro de 12 horas, controlado por foto período (luzes acesas às 7h e apagadas às 19h). Apenas o rato em procedimento de eutanásia, através do método de decapitação utilizando uma tesoura, foi levado para a sala de procedimentos. As luvas do manipulador e a tesoura para decapitação foram mantidas limpas para que os animais não tenham qualquer tipo de estresse devido ao odor de sangue. Todos os procedimentos foram realizados por profissionais capacitados e treinados, procurando sempre manter o máximo de respeito e bem-estar dos animais.

4.3. Cultura organotípica hipocampal

O protocolo da cultura organotípica hipocampal foi realizada a partir do método descrito por Stoppini (1991) com algumas modificações (Frezza et al., 2009). Brevemente, após decapitação com auxílio de uma tesoura, o cérebro dos animais foi dissecado, o hipocampo removido e fatiado utilizando um fatiador de tecidos McIlwain na espessura de $400 \mu\text{M}$ e as fatias alocadas sobre membranas Millicell® em placas de 6 poços. As culturas foram mantidas em MEM (Medium Essential Minimal) (Gibco) contendo 1% de antibiótico (penicilina 10.000 U/mL + estreptomicina 10.000 $\mu\text{g/mL}$) (Sigma-Aldrich) e 1% de antifúngico (fungizona 250 $\mu\text{g/mL}$) (Sigma-Aldrich) suplementado com 25% de soro de cavalo inativado (Gibco), 36mM de glicose (Sigma-Aldrich), 25 mM de HEPES (Sigma-Aldrich) 4 mM de NaHCO_3 (Sigma-Aldrich) em incubadora a 37°C com 95% de umidade relativa e 5% de CO_2 por até 28 dias, havendo troca do meio de cultura a cada 3 dias.

4.4. Avaliação da morte celular

A morte celular foi avaliada por análise da fluorescência obtida através da captação de iodeto de propídeo (IP) pelas fatias organotípicas hipocampais (Norberg et al., 1999). IP é um composto polar que é impermeável a membranas celulares íntegras, mas é capaz de penetrar em células danificadas e se intercalar ao DNA para gerar uma fluorescência vermelha (Macklis & Madison, 1990). Após 28 dias de cultura, 7,5 μM de IP (Sigma-Aldrich) foi adicionado às culturas por 1 hora e as fatias foram observadas com um microscópio invertido Eclipse TE 300 (Nikon Instruments Inc., EUA) e as imagens capturadas utilizando uma câmera CCD (DXM1200C, Nikon Instruments Inc., EUA). Posteriormente, as imagens foram analisadas usando o software ImageJ (ver1.52a, National Institute of Health, EUA) e, para fins de quantificação, a área da fluorescência vermelha (área morta) foi dividida pela área total da fatia e este valor transformado em porcentagem para apresentação dos resultados (Schneider, Rasband, & Eliceiri, 2012).

4.5. Avaliação de células NeuN+ e GFAP+

Para avaliação das percentagens de células NeuN+ (proteína expressa em neurônios) e GFAP+ (proteína expressa em astrócitos) presentes na cultura, bem como a relação NeuN+/GFAP+, foi realizada a técnica de citometria de fluxo, segundo Weis e colaboradores (2021) com algumas modificações feitas pelo nosso grupo de pesquisa. Fatias provenientes da cultura organotípica foram obtidas: i) 24 horas após sua realização (DIV 1) e ii) no dia 28 de cultura (DIV 28), dissociadas em 100 μL de tampão fosfato-salina (PBS) contendo 0,1% de colagenase tipo IV (Sigma-Aldrich) e 0,1% de DNase (Sigma-Aldrich) e mantidas em banho-maria a 37 °C por 40 minutos. Após, uma solução de PBS + Triton X-100 0,1% foi adicionada às amostras para permeabilização das células por 15 minutos. A próxima etapa realizada foi de bloqueio

através de solução de PBS + albumina do soro bovina (BSA) 5% por 15 minutos. Terminados os processos de dissociação, permeabilização e bloqueio, as amostras foram incubadas com o respectivo anticorpo primário, anti-NeuN (Merck Millipore) (1:100 em PBS + BSA 5%) ou anti-GFAP (Cell Signaling) (1:100 em PBS + BSA 5%) por 1h, seguido da incubação com o anticorpo secundário Alexa Fluor 488 (Sigma-Aldrich) (1:500 em PBS + BSA 5%) também por 1h. Entre todas as etapas realizadas, houve a centrifugação das amostras a 2.000 rpm por 10 minutos, seguida do descarte do sobrenadante obtido e ressuspensão com o reagente adequado da próxima etapa. Fatias hipocampais sem marcação foram utilizadas como controle negativo para os diferentes grupos experimentais. Para análise, 20.000 eventos foram adquiridos por amostra, sendo as percentagens de células NeuN+ e GFAP+ determinadas baseado no ângulo de dispersão frontal (FSC, detecta o tamanho celular) e no ângulo de dispersão lateral (SSC, detecta a complexidade celular) através do canal FL1-H utilizando um citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences, USA).

4.6. Avaliação da complexidade de células GFAP+

Para esta análise, utilizamos as fatias marcadas com anti-GFAP processadas no item 4.5. Brevemente, a população GFAP+ das amostras detectada no canal FL1-H foi plotada em um novo gráfico e as intensidades médias de fluorescência (IMF) foram analisadas e comparadas baseadas no parâmetro SSC da citometria de fluxo que indica complexidade celular. Assim, sugerimos esta análise como um parâmetro para avaliar uma possível reatividade astrocitária em cultura organotípica.

4.7. Avaliação dos potencial e massa mitocondriais

A avaliação dos potencial e massa mitocondriais foi realizada utilizando os

corantes MitoTracker Red FM (MTR) e MitoTracker Green FM (MTG) (Thermo-Fisher), respectivamente, bem como a relação de suas respectivas IMFs, através de citometria de fluxo. A dissociação das fatias foi realizada da mesma forma detalhada no item 4.5. Posterior a esta etapa, houve a incubação das amostras com 300 μ L da solução dos MTR e MTG, na concentração de 100 mM por 30 minutos. Por fim, as amostras foram centrifugadas a 2.000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e houve a ressuspensão com salina do citômetro para análise no equipamento. Fatias hipocâmpais sem marcação foram utilizadas como controle negativo para os diferentes grupos experimentais.

4.8. Avaliação da captação de glutamato

O protocolo de captação de glutamato foi realizado baseado em publicações do nosso grupo de pesquisa (Dos Santos Frizzo et al., 2002; Nonose et al., 2020; Zimmer et al., 2015). Após decorridas 24 horas (DIV 1) e 28 dias de cultura (DIV 28), fatias expostas a 100 μ M de guanosina (GUO) (Sigma-Aldrich) no meio de cultura por 90 minutos (ou controle, sem GUO), foram recolhidas em HBSS a 37 °C e ficaram sob ambientação por 10 minutos. Após, estas fatias foram expostas a 0,33 μ Ci/mL [3,4-³H] L-glutamato (Perkin Elmer) em HBSS por 5 minutos (sem adição de glutamato não radioativo). A captação foi interrompida por 3 sucessivas lavagens com HBSS gelado. As fatias foram então mantidas *overnight* em NaOH 0,5 M para posterior processamento e análise da radioatividade em um contador de cintilação líquida 300 SL (Idex, Finlândia). A captação de glutamato independente de sódio foi determinada utilizando cloreto de colina ao invés de cloreto de sódio, sendo subtraída da captação total para obtenção da captação específica (sódio dependente). Os resultados estão expressos em fmol de glutamato captado por fatia hipocâmpal.

4.9. Análise estatística

Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão (DP) e analisados através do test t de Student. Todas as análises foram realizadas com o software GraphPad Prism (ver9.0, GraphPad Software Inc., EUA) e diferenças significativas entre os grupos experimentais foram estabelecidas quando o valor de $p \leq 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Avaliação da morte celular

A exposição das fatias organotípicas hipocampais de ratos fêmeas e machos ao iodeto de propídeo (IP) não obteve diferença significativa e não causou emissão de fluorescência considerável em 28 dias de cultura (Figura 5), ou seja, não se detectou morte celular significativa (fêmeas = $0,18 \pm 0,16\%$, machos = $0,21 \pm 0,13\%$, $p = 0,758$).

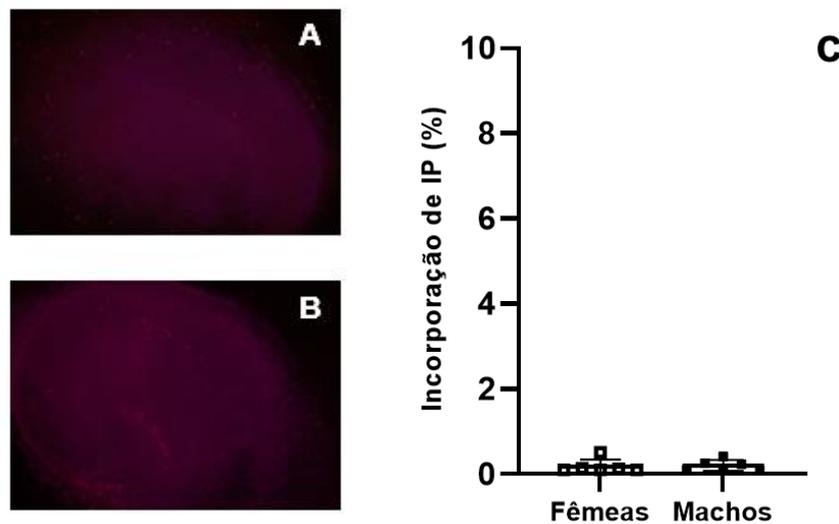


Figura 5: Avaliação da morte celular das culturas organotípicas hipocampais 28 dias em cultura através da incorporação de iodeto de propídeo (IP). Fotomicrografias representativas da incorporação de IP nas fatias organotípicas hipocampais: (A) de fêmeas e (B) de machos. (C) Quantificação da incorporação de IP, expresso como percentual de fluorescência pela área total da fatia. Os dados estão apresentados como média \pm DP, $n = 6$.

5.2. Avaliação de células NeuN+ e GFAP+

As culturas organotípicas dos machos após 28 dias tiveram uma diminuição da marcação de eventos marcados, em relação ao dia 1, tanto com NeuN (neurônios) (DIV 1 = $40 \pm 10\%$, DIV 28 = $25 \pm 3\%$, $p = 0,0075$) (Figura 6A) como com GFAP (astrócitos) (DIV 1 = $42 \pm 15\%$; DIV 28 = $28 \pm 6\%$, $p = 0,046$) (Figura 6B). Não houve diferença significativa nas fatias hipocampais das fêmeas (NeuN: DIV 1 = $34 \pm 8\%$,

DIV 28 = $28 \pm 5\%$, $p = 0,117$; GFAP: DIV 1 = $32 \pm 7\%$, DIV 28 = $26 \pm 4\%$, $p = 0,074$). Observou-se também uma diminuição da dispersão dos dados, principalmente dos machos, no DIV 28 comparado ao DIV 1. Quanto à relação das percentagens de células marcadas com NeuN e com GFAP, não foi verificado nenhuma diferença significativa entre os grupos (fêmeas: DIV 1 = $1,07 \pm 0,25$, DIV 28 = $1,07 \pm 0,19$, $p = 0,965$; machos: DIV 1 = $1,00 \pm 0,15$, DIV 28 = $0,97 \pm 0,22$, $p = 0,756$) (Figura 6C), indicando que, apesar de haver uma diminuição destas duas células em cultura para os machos no DIV 28, não houve alteração da proporção destas para as fatias de machos e fêmeas. Os gráficos em dot plot representativos da citometria de fluxo se encontram nas Figuras Suplementares A-D.

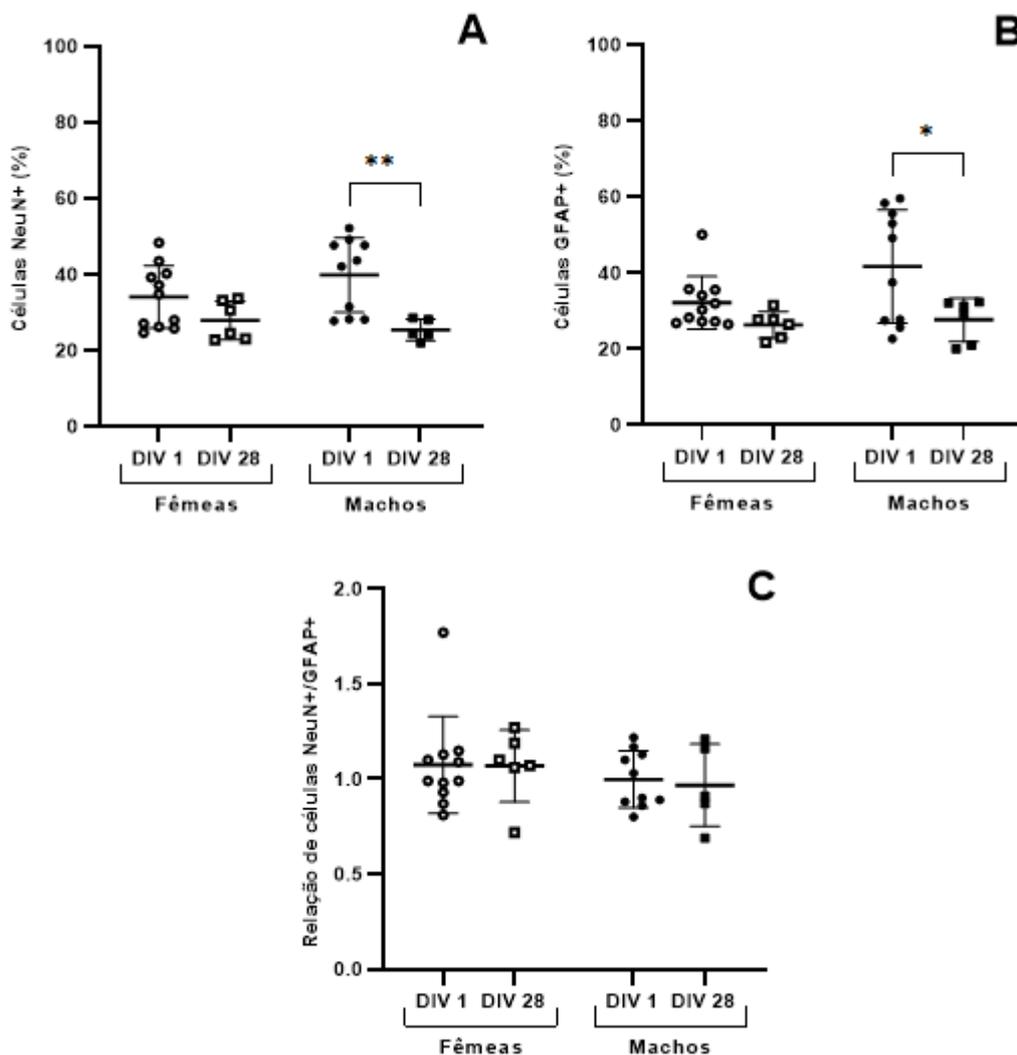


Figura 6. Percentagem de células NeuN+ e GFAP+, e sua relação, nas fatias organotípicas hipocampais de fêmeas e machos nos DIV 1 e DIV 28, através de citometria de fluxo. (A) Marcação utilizando o anticorpo anti-NeuN (neurônios). (B) Marcação utilizando o anticorpo anti-GFAP (astrócitos). (C) Relação entre as percentagens de eventos marcados com os anticorpos anti-NeuN e anti-GFAP. Os dados estão apresentados como média \pm DP, n = 6-11. Diferença significativa estabelecida entre os grupos representados, * $p \leq 0,05$ e ** $p \leq 0,01$.

5.3. Avaliação da complexidade de células GFAP+

Para fêmeas (DIV 1 = 346 ± 43 , DIV 28 = 401 ± 51 , $p = 0,031$) e machos (DIV 1 = 315 ± 22 , DIV 28 = 371 ± 46 , $p = 0,005$), houve um aumento significativo, ao correr do amadurecimento das culturas, na complexidade interna das células marcadas com GFAP (através do parâmetro SSC) das fatias organotípicas hipocampais no DIV 28, comparado ao DIV 1 (Figura 7) sugerindo assim, um potencial aumento na reatividade astrocitária na cultura organotípica hipocampal aos 28 dias.

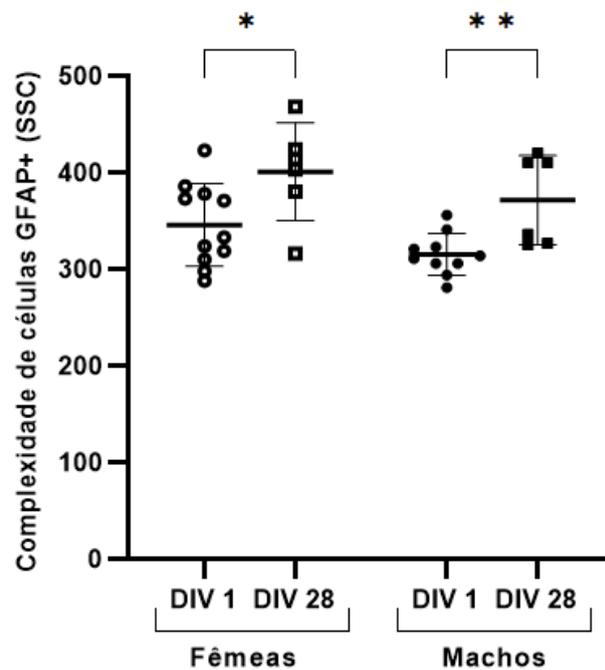


Figura 7. Avaliação da complexidade de células GFAP+ das fatias organotípicas hipocampais de fêmeas e machos nos DIV 1 e DIV 28, através de citometria de fluxo. Os dados estão apresentados como média \pm DP, n = 6-11. Diferença significativa estabelecida entre os grupos representados, * $p \leq 0,05$ e ** $p \leq 0,01$.

5.4. Avaliação dos potencial e massa mitocondriais

As fatias hipocampais de fêmeas e machos, comarcadas com os MitoTracker

Red FM e Green FM, indicaram que potencial e massa mitocondriais, respectivamente, nos DIV 1 e DIV 28, não apresentaram diferenças significativas (fêmeas: DIV 1 = $98 \pm 2\%$, DIV 28 = $97 \pm 2\%$, $p = 0,203$; machos: DIV 1 = $98 \pm 2\%$, DIV 28 = $99 \pm 1\%$, $p = 0,452$). Para todos grupos, as médias ficaram acima de 90% (referente aos 20.000 eventos detectados), indicando que a dissociação da amostra para citometria foi adequada e que as mitocôndrias presentes no tecido permaneceram viáveis nas primeiras 24 horas até os 28 dias de cultura (Figura 8A). Quanto à relação das IMFs detectadas com o MitoTracker Red FM e com o MitoTracker Green FM não foi verificada nenhuma diferença significativa entre os grupos (fêmeas: DIV 1 = $0,51 \pm 0,35$, DIV 28 = $0,55 \pm 0,27$, $p = 0,830$; machos: DIV 1 = $0,53 \pm 0,32$, DIV 28 = $0,46 \pm 0,26$, $p = 0,673$) (Figura 8B), demonstrando não haver mudança da massa e/ou da atividade mitocondrial durante a cultura. Os gráficos em dot plot representativos da citometria de fluxo se encontram nas Figuras Suplementares A-D.

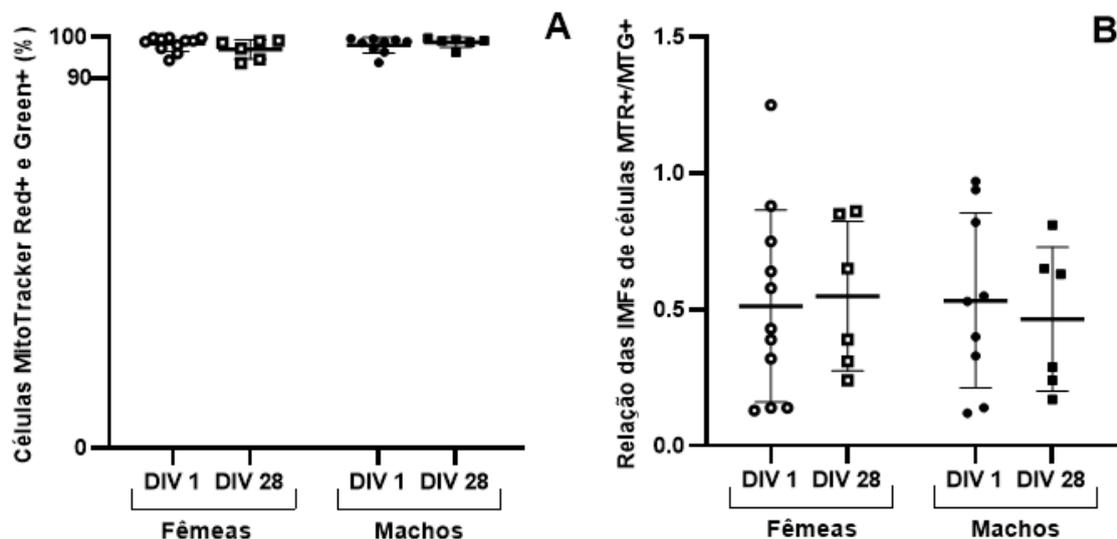


Figura 8. Percentagem de células comarcadas com os MitoTracker Red FM (MTR) e MitoTracker Green FM (MTG), e a relação das suas respectivas intensidades médias de fluorescência (IMFs), das fatias organotípicas hipocâmpais de fêmeas e machos nos DIV 1 e DIV 28, através de citometria de fluxo. (A) Percentagem de eventos comarcados com os corantes MTR e MTG. (B) Relação entre as IMFs detectadas das células MTR+ e MTG+. Os dados estão apresentados como média \pm DP, $n = 6-11$.

5.5. Avaliação da captação de glutamato

As fatias hipocampais das fêmeas no DIV 28 obtiveram uma captação de glutamato menor comparada ao DIV 1 (DIV 1 = 38 ± 17 fmol, DIV 28 = 24 ± 11 fmol, $p = 0,034$) (Figura 9A). Nos machos, o mesmo foi observado (DIV 1 = 38 ± 25 fmol, DIV 28 = 17 ± 9 fmol, $p = 0,029$) e a adição da guanosina preveniu esta diminuição (DIV 28 = 17 ± 9 fmol, DIV 28 GUO = 31 ± 11 fmol, $p = 0,012$) (Figura 9B), indicando um possível efeito neuroprotetor da guanosina via atenuação de potencial excitotoxicidade glutamatérgica. Neste parâmetro analisado, também verificamos uma maior dispersão nos dados obtidos do grupo DIV 1 para fêmeas e machos comparada ao DIV 28.

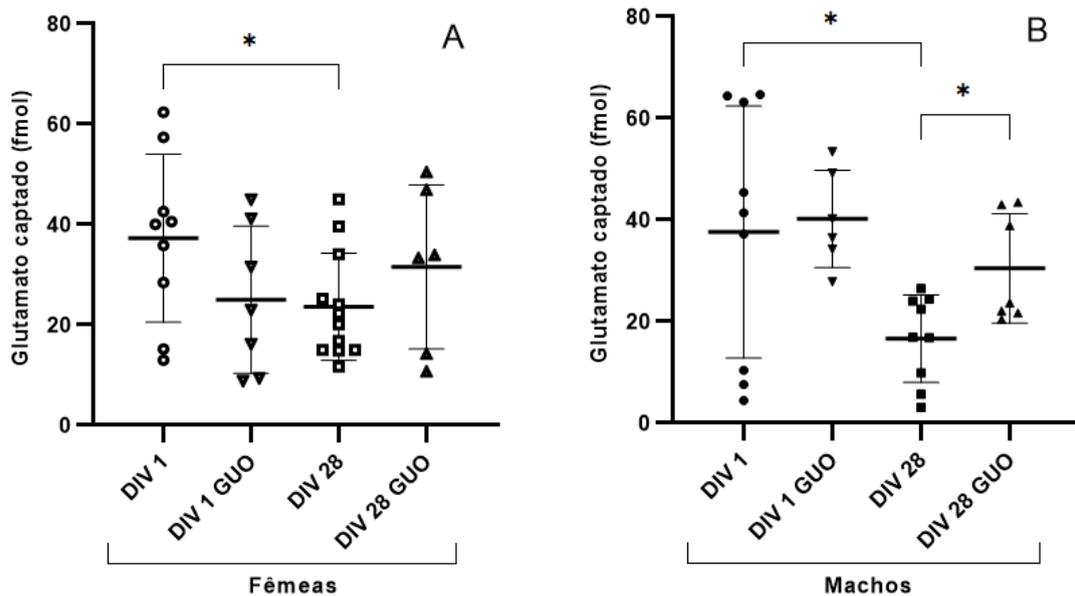


Figura 9. Captação de glutamato pelas fatias organotípicas hipocampais nos DIV 1 e DIV 28 sem e com adição de guanosina. (A) Fêmeas (n = 6-12). (B) Machos (n = 6-9). Os dados estão apresentados como média \pm DP. * Diferença significativa estabelecida entre os grupos representados, $p \leq 0,05$.

PARTE III

6. DISCUSSÃO

A cultura organotípica tem se demonstrado uma excelente ferramenta para melhor compreendermos eventos bioquímicos *in vitro* por manter a conexão entre os diferentes tipos celulares (Li et al., 2016; Noraberg et al., 2005; Pena, 2010). Mais especificamente no que tange ao estudo do sistema nervoso central, esta metodologia nos proporciona a possibilidade de induzir diferentes insultos *in vitro*, mimetizando diversos parâmetros *in vivo*, incluindo doenças cerebrais, bem como o estudo de diferentes estratégias neuroprotetoras (Frezza et al., 2009; Hoppe et al., 2013; Li, Han & Wang, 2016).

Apesar de todas as vantagens notórias desta técnica, em relação a como se comportam as células, sendo elas neuronais e gliais, durante o amadurecimento do tecido *in vitro*, quanto à sua quantidade, viabilidade e funcionalidade, pouco se sabe. Com isso, o intuito deste trabalho foi melhor compreender como se apresentam neurônios e astrócitos, bem como parâmetros relacionados a mitocôndrias e ao sistema glutamatérgico, na cultura organotípica obtidas de animais neonatos até o amadurecimento do tecido hipocampal onde, então, são realizados os diferentes ensaios bioquímicos explorados por grupos de pesquisa que utilizam esta metodologia.

Neste estudo, verificamos que as fatias organotípicas hipocampais possuem uma viabilidade duradoura (28 dias) em cultura, por não captarem significativamente iodeto de propídeo e por possuírem mitocôndrias vivas e funcionais demonstradas através de marcadores específicos. Quanto ao perfil celular destas fatias, observamos uma diminuição de células marcadas para as proteínas NeuN e GFAP em machos após 28 dias de cultura. Por outro lado, um possível indicador de reatividade astrocitária foi verificado através do aumento da complexidade das células que

expressam GFAP para machos e fêmeas em cultura através da técnica de citometria de fluxo. Quanto à captação de glutamato, verificamos, em machos, que a adição de guanossina foi capaz de prevenir a diminuição da captação no 28º dia de cultura.

Vale ressaltar que a ideia inicial deste experimento, na etapa de investigação do perfil neuronal e astrocitário, era avaliar, simultaneamente, as fatias hipocâmpais com os anticorpos anti-NeuN e anti-GFAP para verificarmos os resultados nestes grupos populacionais ao mesmo tempo e na mesma amostra, porém por uma limitação de reagentes onde havíamos disponível apenas os anticorpos desenvolvidos na mesma espécie de animal, não poderia haver comarcação.

Como mencionado, observamos em machos, uma diminuição da marcação de NeuN em 28 dias de cultura. Esta diminuição, inicialmente, pode ser atribuída à dano ou morte neuronal, como discutido por autores que verificaram uma redução dos níveis desta proteína depois de insultos que causam possíveis perturbações metabólicas (Kurauchi et al., 2018; Prager et al., 2016).

Por outro lado, esta diminuição pode, também, indicar perda da proteína NeuN em neurônios viáveis devido à diminuição da síntese proteica ou mesmo da sua antigenicidade, o que corroboraria com nossos resultados obtidos através da captação de iodeto de propídeo os quais não indicaram morte celular significativa. Esta hipótese foi testada por Ünal-Çevik e colaboradores (2004), onde os autores utilizaram um modelo de isquemia em camundongos e puderam verificar a manutenção da integridade da morfologia nuclear e citoplasmática dos neurônios mesmo com a diminuição da imunorreatividade verificada para NeuN. Para confirmação desta hipótese, em nossas condições experimentais, sugerimos a realização da técnica de imunohistoquímica para verificar a morfologia dos neurônios presentes nas fatias hipocâmpais.

Uma outra explicação para a diminuição observada de NeuN seria uma possível axotomia, que seria uma lesão nos axônios dos neurônios neste modelo. Embora nas culturas organotípicas as células mantêm suas conexões, elas podem estar suscetíveis a este fenômeno, prejudicando a condutividade de neurotransmissores que, por consequência, pode levar à morte neuronal. Com isso, esta pode ser considerada uma das maiores desvantagens deste modelo de cultura. Como verificado em trabalhos anteriores, cérebros de animais neonatos são mais suscetíveis à axotomia do que cérebros de animais adultos, pois nestes últimos, a axotomia pode levar a uma regeneração devido à produção local de fatores de crescimento (Humpel, 2015). Com isso, temos a perspectiva de avaliarmos o uso de suplementos, como fatores de crescimento, no meio de cultura dos futuros experimentos.

Em nossos resultados verificamos que, apesar da diminuição de astrócitos GFAP+ em 28 dias de cultura para machos, observamos um aumento da complexidade destes, através do parâmetro sugerido na citometria de fluxo, para machos e fêmeas. Este resultado pode indicar uma possível reatividade astrocitária, visto esta proteína ter sua expressão aumentada em processos nos quais os astrócitos adquirem uma morfologia diferente e características reativas (Middeldorp & Hol, 2011; Pekny et al., 2019). Esta reatividade astrocitária, mostrada para os machos, poderia ser uma resposta à diminuição de neurônios observada em 28 dias de cultura, caso esta diminuição fosse consequência de dano ou morte neuronal (Meraz-Ríos et al., 2013).

Tavares e colaboradores (2001) verificaram em seus resultados, ao comparar o padrão de proteínas relacionadas ao desenvolvimento, um aumento da expressão da proteína GFAP a partir do 7º dia *in vitro* na cultura organotípica quando comparado a fatias hipocâmpais agudas de mesmo EPD (do inglês, *Equivalent Postnatal Day*, que

corresponde a idade do animal no dia da eutanásia somada aos dias das fatias *in vitro*), levando à conclusão de uma possível reatividade astrocitária na cultura organotípica.

Como discutido, constatamos uma diminuição de células NeuN+ e GFAP+ em 28 dias em cultura organotípica para as fatias hipocampais de machos, porém quando comparado a relação das células marcadas para estas duas proteínas nos dias 1 e 28 de cultura, não se observou diferença significativa. Assim sendo, em nossas condições experimentais, não temos a predominância de qualquer tipo celular ou no DIV 1 ou DIV 28, seja por dano, reatividade ou morte celular.

Outro ponto relevante foi que, ao analisar tais resultados, verificamos que em 28 dias de cultura tivemos uma menor dispersão dos dados, que pode ser atribuído à estabilização do tecido na membrana, bem como de não haver a presença de debris celulares, que poderiam causar interferências nos resultados, características estas da cultura organotípica (Gähwiler, Thompson, & Muller, 2001; Hoppe et al., 2010; Humpel, 2018a).

Quanto aos resultados obtidos dos parâmetros de potencial e massa mitocondriais, através das sondas MitoTracker Red FM e MitoTracker Green FM, respectivamente, verificamos que para machos e fêmeas nos dias 1 e 28 de cultura, pelo menos 90% das células foram comarcadas com estes corantes. Este resultado indica que a grande maioria das mitocôndrias se encontram vivas e funcionais em cultura e que também a dissociação do tecido para processamento para a citometria de fluxo foi adequada.

Quando verificamos a relação das IMFs das células MTR+ e MTG+, não verificamos qualquer diferença significativa entre os grupos, ou seja, sem alteração de massa, tamanho ou mesmo da atividade mitocondrial. Ao olhar os resultados em seu

valor absoluto, verificamos uma média desta relação em torno de 0,5, isto é, os olhando isoladamente, poderíamos concluir que há uma predominância de quantidade ou tamanho das mitocôndrias presentes frente à sua atividade, para todos os grupos experimentais. Porém, nas recomendações do fabricante destes corantes, verificamos que o Mitotracker Green FM tende a possuir uma fluorescência maior que outros marcadores mitocondriais, inclusive o Mitotracker Red FM, e assim deve-se utilizá-lo em uma concentração menor. Porém, em nossos experimentos utilizamos a mesma concentração de ambos, o que poderia justificar, pelo menos em parte, estes resultados (Invitrogen™, MitoTracker® Mitochondrion-Selective Probes, 2008).

Na tentativa de verificar a funcionalidade das células presentes nas fatias hipocâmpais cultivadas, mais especificamente quanto aos astrócitos, realizamos a técnica de captação de glutamato (atividade predominante astrocitária) com e sem adição de guanosina nos dias 1 e 28 de cultura. Em nossas condições, não induzimos um modelo de excitotoxicidade, por exemplo, com adição de altas concentrações de glutamato, pois o objetivo era avaliar a captação das fatias hipocâmpais em amadurecimento na cultura, sem qualquer intervenção. Pudemos observar que para machos e fêmeas houve uma diminuição desta captação em 28 dias, comparado com as primeiras 24 horas do tecido em cultura; e que para os machos, a guanosina foi capaz de prevenir esta diminuição. Esta diminuição observada em 28 dias pode ser atribuída a uma alteração da atividade dos transportadores astrocitários GLAST e GLT-1, responsáveis por manter os níveis de glutamato extracelulares em níveis adequados, que pode acontecer naturalmente com o envelhecimento, segundo estudos recentes (Bellaver et al., 2017; Todd & Hardingham, 2020)

A guanosina é um nucleosídeo endógeno amplamente estudado em nosso, e outros, grupo de pesquisa e é reconhecida devido a seus efeitos neuroprotetores em

diversos modelos de comprometimento cerebral, seja através da modulação do sistema glutamatérgico ou de diferentes vias de sinalização (Almeida et al., 2017; da Silva et al., 2020; Müller et al., 2021; Nonose et al., 2020; Paniz et al., 2014). Este nucleosídeo pode ser liberado no meio extracelular através das células gliais ou mesmo produzido a partir da hidrólise de nucleotídeos, como GTP, GDP ou GMP (Schmidt, Lara, & Souza, 2007).

Diferentemente do que Thomazi e colaboradores (2004) observaram em seu trabalho, onde a guanosina foi capaz apenas de aumentar a captação de glutamato em fatias do córtex de animais jovens (sendo também avaliado as regiões do estriado e hipocampo, de animais neonatos até animais adultos), em nossas condições experimentais a guanosina foi capaz de aumentar a captação das fatias hipocampais em 28 dias de cultura para os machos. Esta discrepância pode ser devido a diferenças nos protocolos, pois realizamos cultura organotípica incubando a guanosina por 90 minutos, enquanto que Thomazi e colaboradores (2004) utilizaram a guanosina por 30 minutos em fatias agudas.

Por outro lado, Nonose e colaboradores (2020) verificaram que 100 μ M de guanosina adicionados em fatias hipocampais de camundongos machos submetidas a um modelo de excitotoxicidade com adição de altas concentrações de glutamato foi capaz de, entre outros efeitos relacionados ao equilíbrio de oxidação e redução, aumentar a captação de glutamato. Em seus achados, este efeito foi evidenciado apenas com a incubação de glutamato junto a guanosina no tempo de 30 minutos. Já em nossas condições experimentais, a guanosina, sem qualquer adição de glutamato, adicionada na concentração de 100 μ M por 90 minutos, foi capaz de prevenir a diminuição da captação observada em 28 dias de cultura, demonstrando que pode haver uma melhora na captação de glutamato sem necessariamente induzirmos um

modelo de dano, visto este ser o nosso objetivo neste experimento.

Os mecanismos pelos quais a guanosina extracelular exerce seu efeito neuroprotetor e, mesmo onde especificamente esta molécula é capaz de se ligar nas células, ainda é alvo de esclarecimento mais amplo, porém parece estar relacionado, pelo menos em parte, à sua interação com os sistemas adenosinérgico e glutamatérgico (Almeida et al., 2017; Bettio, Gil-Mohapel, & Rodrigues, 2016; Lanznaster et al., 2016).

7. CONCLUSÕES

Diante do apresentado, pudemos verificar que, em nossas condições experimentais, as fatias organotípicas hipocampais de ratos Kyoto machos e fêmeas permaneceram viáveis por um longo período em cultura (28 dias), sem danos significativos às mitocôndrias e membranas celulares no tecido hipocampal. Quanto ao perfil celular investigado, verificou-se uma diminuição, durante a cultura, de células NeuN+ (neurônios) e GFAP+ (astrócitos) para machos, mas sem qualquer alteração na relação destas células. Identificamos uma diminuição da captação de glutamato aos 28 dias de cultura, comparado ao dia 1, em machos e em fêmeas, e a guanosina foi capaz de prevenir esta diminuição nas fatias hipocampais de machos, indicando assim um potencial efeito benéfico frente à modulação glutamatérgica, corroborando estudos prévios. Ademais, potencialmente, parece haver uma tendência de prevenir também nas fêmeas. Além disso, observou-se, de uma forma geral, que em 28 dias de cultura houve uma menor dispersão dos resultados obtidos, comparados com os observados no dia 1 dia, tanto no perfil celular neuronal e astrocitário, quanto na captação de glutamato. Assim sendo, mais resultados são necessários para aumento do tamanho amostral e elucidação de algumas hipóteses apresentadas, mas, de antemão, podemos concluir que a cultura organotípica é uma excelente ferramenta *in vitro* para estudarmos diferentes regiões cerebrais e suas vias de sinalização em diversos modelos de intervenções *in vivo* (exercício, dieta, entre outras) e *in vitro*, incluindo estratégias neuroprotetoras frente a modelos de injúria cerebral.

8. PERSPECTIVAS

- Realizar imunohistoquímica das fatias para analisar a morfologia de neurônios, astrócitos e demais células da glia;
- Realizar a técnica de privação de oxigênio e glicose (POG) nas fatias organotípicas para mimetizar um modelo de isquemia cerebral e investigar estratégias neuroprotetores;
- Utilizar ratos espontaneamente hipertensos (SHR) para a POG na cultura organotípica, visto a hipertensão ser o principal fator de risco para isquemia;
- Estabelecer a metodologia da cultura organotípica hipocampal de animais adultos.

REFERÊNCIAS

- Almeida, R. F., Comasseto, D. D., Ramos, D. B., Hansel, G., Zimmer, E. R., Loureiro, S. O., ... Souza, D. O. (2017). Guanosine Anxiolytic-Like Effect Involves Adenosinergic and Glutamatergic Neurotransmitter Systems. *Molecular Neurobiology*, *54*(1), 423–436. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9660-x>
- Andersen, J. V., Markussen, K. H., Jakobsen, E., Schousboe, A., Waagepetersen, H. S., Rosenberg, P. A., & Aldana, B. I. (2021). Glutamate metabolism and recycling at the excitatory synapse in health and neurodegeneration. *Neuropharmacology*, *196*, 108719. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2021.108719>
- Bellaver, B., Souza, D. G., Souza, D. O., & Quincozes-Santos, A. (2017). Hippocampal Astrocyte Cultures from Adult and Aged Rats Reproduce Changes in Glial Functionality Observed in the Aging Brain. *Molecular Neurobiology*, *54*(4), 2969–2985. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-9880-8>
- Bettio, L. E. B., Gil-Mohapel, J., & Rodrigues, A. L. S. (2016). Guanosine and its role in neuropathologies. *Purinergic Signalling*, *12*(3), 411–426. <https://doi.org/10.1007/s11302-016-9509-4>
- Bousquet, J., & Meunier, J. M. (1962). Organotypic culture, on natural and artificial media, of fragments of the adult rat hypophysio Title. *Comptes Rendus Des Seances de La Societe de Biologie et de Ses Filiales*, *156*, 65–67.
- Boyd, W. H. (1971). A chamber for organotypic culture; adapted for growing large volumes of tissue. *Biotechnic and Histochemistry*, *46*(2), 85–87. <https://doi.org/10.3109/10520297109067827>
- Carroll, J. A., Foliaki, S. T., & Haigh, C. L. (2021). A 3D cell culture approach for studying neuroinflammation. *Journal of Neuroscience Methods*, *358*(January), 109201. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2021.109201>
- Cavaliere, F., Benito-Muñoz, M., & Matute, C. (2016). Organotypic Cultures as a Model to Study Adult Neurogenesis in CNS Disorders. *Stem Cells International*, *2016*, 1–6.
- da Silva, J. S., Nonose, Y., Rohden, F., Lukasewicz Ferreira, P. C., Fontella, F. U., Rocha, A., ... Souza, D. O. (2020). Guanosine Neuroprotection of Presynaptic Mitochondrial Calcium Homeostasis in a Mouse Study with Amyloid- β Oligomers. *Molecular Neurobiology*, *57*(11), 4790–4809. <https://doi.org/10.1007/s12035-020-02064-4>
- Dal-Cim, T., Martins, W. C., Santos, A. R. S., & Tasca, C. I. (2011). Guanosine is

- neuroprotective against oxygen/glucose deprivation in hippocampal slices via large conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels, phosphatidylinositol-3 kinase/protein kinase B pathway activation and glutamate uptake. *Neuroscience*, 183, 212–220. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.03.022>
- Dos Santos Frizzo, M. E., Lara, D. R., Prokopiuk, A. D. S., Vargas, C. R., Salbego, C. G., Wajner, M., & Souza, D. O. (2002). Guanosine enhances glutamate uptake in brain cortical slices at normal and excitotoxic conditions. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 22(3), 353–363. <https://doi.org/10.1023/A:1020728203682>
- Doussau, F., Dupont, J. L., Neel, D., Schneider, A., Poulain, B., & Bossu, J. L. (2017). Organotypic cultures of cerebellar slices as a model to investigate demyelinating disorders. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 12(10), 1011–1022. <https://doi.org/10.1080/17460441.2017.1356285>
- Frezza, R. L., Bernardi, A., Hoppe, J. B., Meneghetti, A. B., Battastini, A. M. O., Pohlmann, A. R., ... Salbego, C. (2013). Lipid-core nanocapsules improve the effects of resveratrol against A β -induced neuroinflammation. *J Biom Nanotech.*, 9, 2086–2104. <https://doi.org/10.1166/jbn.2013.1709>
- Frezza, R. L., Bernardi, A., Paese, K., Hoppe, J. B., da Silva, T., Battastini, A. M., ... Salbego, C. (2010). Characterization of trans-resveratrol-loaded lipid-core nanocapsules and tissue distribution studies in rats. *J Biomed Nanotechnol.*, 6, 694–703. <https://doi.org/10.1166/jbn.2010.1161>
- Frezza, R. L., Horn, A. P., Hoppe, J. B., Simão, F., Gerhardt, D., Comiran, R. A., & Salbego, C. G. (2009). A comparative study of β -amyloid peptides A β 1-42 and A β 25-35 toxicity in organotypic hippocampal slice cultures. *Neurochem Res.*, 34, 295–303. <https://doi.org/10.1007/s11064-008-9776-8>
- Gähwiler, B. H. (1981). Morphological differentiation of nerve cells in thin organotypic cultures derived from rat hippocampus and cerebellum. *Proceedings of the Royal Society of London - Biological Sciences*, 211(1184), 287–290. <https://doi.org/10.1098/rspb.1981.0007>
- Gähwiler, B. H., Capogna, M., Debanne, D., McKinney, R. A., & Thompson, S. M. (1997). Organotypic slice cultures: A technique has come of age. *Trends in Neurosciences*, 20(10), 471–477. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(97\)01122-3](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(97)01122-3)
- Gähwiler, B., Thompson, S., & Muller, D. (2001). Preparation and maintenance of organotypic slice cultures of CNS tissue. *Current Protocols in Neuroscience*, 6, 1–11. <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0611s09>

- Hasel, P., & Liddel, S. A. (2021). Astrocytes. *Current Biology*, 31(7), R326–R327. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.01.056>
- Haycock, J. W. (2011). 3D Cell Culture: A Review of Current Approaches and Techniques. *3D Cell Culture: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, 695, 1–15. <https://doi.org/10.1007/978-1-60761-984-0>
- Hoppe, J.B., Frozza, R. L., Pires, E. N. S., Meneghetti, A. B., & Salbego, C. (2013). The curry spice curcumin attenuates beta-amyloid-induced toxicity through beta-catenin and PI3K signaling in rat organotypic hippocampal slice culture. *Neurol Res.*, 35, 857–866. <https://doi.org/10.1179/1743132813Y.0000000225>
- Hoppe, Juliana Bender, Frozza, L., Horn, A. P., Comiran, R. A., Bernardi, A., Martha, M., & Oliveira, A. M. (2010). Amyloid- β neurotoxicity in organotypic culture is attenuated by melatonin: involvement of GSK-3 β , tau and neuroinflammation. *J Pineal Res.*, 48, 230–238. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2010.00747.x>
- Humpel, C. (2015). Organotypic brain slice cultures: A review. *Neuroscience*, 305, 86–98. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.07.086>
- Humpel, Christian. (2018a). Organotypic Brain Slice Cultures. *Current Protocols in Immunology*, 123(1), 1–17. <https://doi.org/10.1002/cpim.59>
- Humpel, Christian. (2018b). Organotypic brain slices of adult transgenic mice: A tool to study Alzheimer's Disease. *Current Alzheimer Research*, 16, 172–181. <https://doi.org/10.2174/1567205016666181212153138>
- Invitrogen. (2008). *MitoTracker® Mitochondrion-Selective Probes*.
- Kurauchi, Y., Noma, K., Hisatsune, A., Seki, T., & Katsuki, H. (2018). Na⁺, K⁺-ATPase inhibition induces neuronal cell death in rat hippocampal slice cultures: Association with GLAST and glial cell abnormalities. *Journal of Pharmacological Sciences*, 138(3), 167–175. <https://doi.org/10.1016/j.jphs.2018.09.004>
- Lanznaster, D., Dal-Cim, T., Piermartiri, T. C. B., & Tasca, C. I. (2016). Guanosine: A neuromodulator with therapeutic potential in brain disorders. *Aging and Disease*, 7(5), 657–679. <https://doi.org/10.14336/AD.2016.0208>
- Li, Q., Han, X., & Wang, J. (2016). Organotypic hippocampal slices as models for stroke and traumatic brain injury. *Molecular Neurobiology*, 53, 4226–4237. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9362-4>
- Lisman, J., Buzsáki, G., Eichenbaum, H., Nadel, L., Rangananth, C., & Redish, A. D. (2017). Viewpoints: How the hippocampus contributes to memory, navigation and cognition. *Nature Neuroscience*, 20(11), 1434–1447. <https://doi.org/10.1038/nn.4661>

- Liu, Z., Klose, K., Neuber, S., Jiang, M., Gossen, M., & Stamm, C. (2020). Comparative analysis of adeno-associated virus serotypes for gene transfer in organotypic heart slices. *Journal of Translational Medicine*, 18(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12967-020-02605-4>
- Lye, M. H., Jakobs, T. C., Masland, R. H., & Koizumi, A. (2007). Organotypic culture of adult rabbit retina. *Journal of Visualized Experiments*, (3), 2–6. <https://doi.org/10.3791/190>
- Macklis, J. D., & Madison, R. D. (1990). Progressive incorporation of propidium iodide in cultured mouse neurons correlates with declining electrophysiological status: a fluorescence scale of membrane integrity. *J Neurosci Methods*, 31, 43–46. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(90\)90007-3](https://doi.org/10.1016/0165-0270(90)90007-3)
- Mancini, A., Gaetani, L., Di Gregorio, M., Tozzi, A., Ghiglieri, V., Calabresi, P., & Di Filippo, M. (2017). Hippocampal neuroplasticity and inflammation: Relevance for multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis and Demyelinating Disorders*, 2(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s40893-017-0019-1>
- Marksteiner, J., & Humpel, C. (2008). Beta-amyloid expression, release and extracellular deposition in aged rat brain slices. *Molecular Psychiatry*, 13(10), 939–952. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4002072>
- Markus, J., Landry, T., Stevens, Z., Scott, H., Llanos, P., Debatis, M., ... Ayehunie, S. (2021). Human small intestinal organotypic culture model for drug permeation, inflammation, and toxicity assays. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal*, 57(2), 160–173. <https://doi.org/10.1007/s11626-020-00526-6>
- Martins, J. P., Alves, C. J., Neto, E., & Lamghari, M. (2016). Communication from the periphery to the hypothalamus through the blood-brain barrier: An in vitro platform. *International Journal of Pharmaceutics*, 499(1–2), 119–130. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.12.058>
- Meraz-Ríos, M. A., Toral-Rios, D., Franco-Bocanegra, D., & Villeda-Hernández, J. (2013). Inflammatory process in Alzheimer's disease. *Front Integr Neurosci*, 7, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fnint.2013.00059>
- Middeldorp, J., & Hol, E. M. (2011). GFAP in health and disease. *Progress in Neurobiology*, 93(3), 421–443. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2011.01.005>
- Müller, G. C., Loureiro, S. O., Pettenuzzo, L. F., Almeida, R. F., Ynumaru, E. Y., Guazzelli, P. A., ... Souza, D. O. (2021). Effects of intranasal guanosine administration on brain function in a rat model of ischemic stroke. *Purinergic Signalling*, 17(2), 255–271. <https://doi.org/10.1007/s11302-021-09766-x>

- Nonose, Y., Pieper, L. Z., da Silva, J. S., Longoni, A., Apel, R. V., Meira-Martins, L. A., ... de Assis, A. M. (2020). Guanosine enhances glutamate uptake and oxidation, preventing oxidative stress in mouse hippocampal slices submitted to high glutamate levels. *Brain Research*, 1748(March), 147080. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2020.147080>
- Noraberg, J., Kristensen, B. W., & Zimmer, J. (1999). Markers for neuronal degeneration in organotypic slice cultures. *Brain Res Protoc.*, 3, 278–290. [https://doi.org/10.1016/S1385-299X\(98\)00050-6](https://doi.org/10.1016/S1385-299X(98)00050-6)
- Noraberg, J., Poulsen, F. R., Blaabjerg, M., Kristensen, B. W., Bonde, C., Montero, M., ... Zimmer, J. (2005). Organotypic hippocampal slice cultures for studies of brain damage, neuroprotection and neurorepair. *Current Drug Targets: CNS and Neurological Disorders*, 4(4), 435–452. <https://doi.org/10.2174/1568007054546108>
- Opitz, B. (2014). Memory function and the hippocampus. *The Hippocampus in Clinical Neuroscience*, 34, 51–59. <https://doi.org/10.1159/000356422>
- Paniz, L. G., Calcagnotto, M. E., Pandolfo, P., Machado, D. G., Santos, G. F., Hansel, G., ... Souza, D. O. (2014). Neuroprotective effects of guanosine administration on behavioral, brain activity, neurochemical and redox parameters in a rat model of chronic hepatic encephalopathy. *Metabolic Brain Disease*, 29(3), 645–654. <https://doi.org/10.1007/s11011-014-9548-x>
- Patil, R., Kale, A. D., Mane, D. R., & Patil, D. (2020). Isolation, culture and characterization of primary cell lines of human buccal mucosal fibroblasts: A combination of explant enzymatic technique. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, 24(1), 68–75. <https://doi.org/10.4103/jomfp.JOMFP>
- Pekny, M., Wilhelmsson, U., Tatlisumak, T., & Pekna, M. (2019). Astrocyte activation and reactive gliosis—A new target in stroke? *Neuroscience Letters*, 689(May 2018), 45–55. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.07.021>
- Pena, F. (2010). Organotypic Cultures as Tool to Test Long-Term Effects of Chemicals on the Nervous System. *Current Medicinal Chemistry*, 17(10), 987–1001. <https://doi.org/10.2174/092986710790820679>
- Pomerenke, A. (2017). Organotypic Models of Lung Cancer. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 430, 161–181. <https://doi.org/10.1007/82>
- Prager, I., Patties, I., Himmelbach, K., Kendzia, E., Merz, F., Müller, K., ... Glasow, A. (2016). Dose-dependent short- and long-term effects of ionizing irradiation on neural stem cells in murine hippocampal tissue cultures: neuroprotective potential of

- resveratrol. *Brain and Behavior*, 6(10), 1–12. <https://doi.org/10.1002/brb3.548>
- Ravi, M., Paramesh, V., Kaviya, S. R., Anuradha, E., & Paul Solomon, F. D. (2015). 3D cell culture systems: Advantages and applications. *Journal of Cellular Physiology*, 230(1), 16–26. <https://doi.org/10.1002/jcp.24683>
- Reinbold, R. (1954). Organotypic differentiation of the eye of the chick embryo in vitro. *Comptes Rendus Des Seances de La Societe de Biologie et de Ses Filiales*, 148, 1493–1495.
- Rose, C. R., Felix, L., Zeug, A., Dietrich, D., Reiner, A., & Henneberger, C. (2018). Astroglial glutamate signaling and uptake in the hippocampus. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 10(January), 1–20. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00451>
- Schmidt, A. P., Lara, D. R., & Souza, D. O. (2007). Proposal of a guanine-based purinergic system in the mammalian central nervous system. *Pharmacology and Therapeutics*, 116(3), 401–416. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2007.07.004>
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Sofroniew, M. V., & Vinters, H. V. (2010). Astrocytes: Biology and pathology. *Acta Neuropathologica*, 119(1), 7–35. <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0619-8>
- Stoppini, L. (1991). A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods*, 37, 173–182. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(91\)90128-M](https://doi.org/10.1016/0165-0270(91)90128-M)
- Szirmai, I., Buzsáki, G., & Kamondi, A. (2012). 120 years of hippocampal Schaffer collaterals. *Hippocampus*, 22(7), 1508–1516. <https://doi.org/10.1002/hipo.22001>
- Tasca, C. I., Dal-Cim, T., & Cimarosti, H. (2014). In vitro oxygen-glucose deprivation to study ischemic cell death. *Neuronal Cell Death: Methods and Protocols*, 1254, 197–2010. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2152-2>
- Tavares, A., Cimarosti, H., Valentim, L., & Salbego, C. (2001). Profile of phosphoprotein labelling in organotypic slice cultures of rat hippocampus. *NeuroReport*, 12, 2705–2709. <https://doi.org/10.1097/00001756-200108280-00023>
- Thomazi, A. P., Godinho, G. F. R. S., Rodrigues, J. M., Schwalm, F. D., Frizzo, M. E. S., Moriguchi, E., ... Wofchuk, S. T. (2004). Ontogenetic profile of glutamate uptake in brain structures slices from rats: Sensitivity to guanosine. *Mechanisms of Ageing and Development*, 125(7), 475–481. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2004.04.005>
- Todd, A. C., & Hardingham, G. E. (2020). The regulation of astrocytic glutamate transporters in health and neurodegenerative diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(24), 1–32. <https://doi.org/10.3390/ijms21249607>

- Toni, N., & Schinder, A. F. (2016). Maturation and functional integration of new granule cells into the adult hippocampus. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(1). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018903>
- Ünal-Çevik, I., Kiliç, M., Gürsoy-Özdemir, Y., Gurer, G., & Dalkara, T. (2004). Loss of NeuN immunoreactivity after cerebral ischemia does not indicate neuronal cell loss: A cautionary note. *Brain Research*, 1015(1–2), 169–174. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.04.032>
- Weis, S. N., Souza, J. M. F., Hoppe, J. B., Firmino, M., Auer, M., Ataii, N. N., ... de Sousa, M. V. (2021). In-depth quantitative proteomic characterization of organotypic hippocampal slice culture reveals sex-specific differences in biochemical pathways. *Scientific Reports*, 11(1), 1–18. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82016-7>
- Zimmer, E. R., Torrez, V. R., Kalinine, E., Augustin, M. C., Zenki, K. C., Almeida, R. F., ... Portela, L. V. (2015). Long-term NMDAR antagonism correlates reduced astrocytic glutamate uptake with anxiety-like phenotype. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9(JUNE), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00219>

ANEXO A – Carta de Aprovação da CEUA-IC/FUC



INSTITUTO DE CARDIOLOGIA
FUNDAÇÃO UNIVERSITÁRIA DE CARDIOLOGIA
DIRETORIA CIENTÍFICA
COMISSÃO DE ÉTICA PARA USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Cultura organotípica hipocampal como modelo de estudo da toxicidade dos oligômeros do peptídeo β -amiloide e do potencial efeito neuroprotetor de guanosina", registrada com o protocolo UP 5935-21, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Diogo de Souza - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do INSTITUTO DE CARDIOLOGIA/FUNDAÇÃO UNIVERSITÁRIA DE CARDIOLOGIA (CEUA/IC-FUC).

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Espécie/linhagem	Ratos Wistar-Kyoto
Peso/idade	6 – 8 dias
Origem	Centro de Cardiologia Experimental
Vigência da autorização	05/2021 a 02/2022
Nº de animais	80
Sexo	Fêmeas e machos

Porto Alegre, 24 de junho de 2021.

Dra. Luotete V. Teixeira
Presidente CEUA/IC-FUC

Instituto de Cardiologia/Fundação Universitária de Cardiologia - Diretoria Científica
Comissão de Ética para Uso de Animais - CEUA/IC/FUC
Avenida Princesa Isabel, 370 - Santana - Centro Cultural Rubem Rodrigues
90620-001 - Porto Alegre/RS
ceua@cardiologia@gmail.com

FIGURA SUPLEMENTAR A – Gráficos em dot plot da citometria de fluxo: Fatias hipocampais de fêmeas do DIV 1

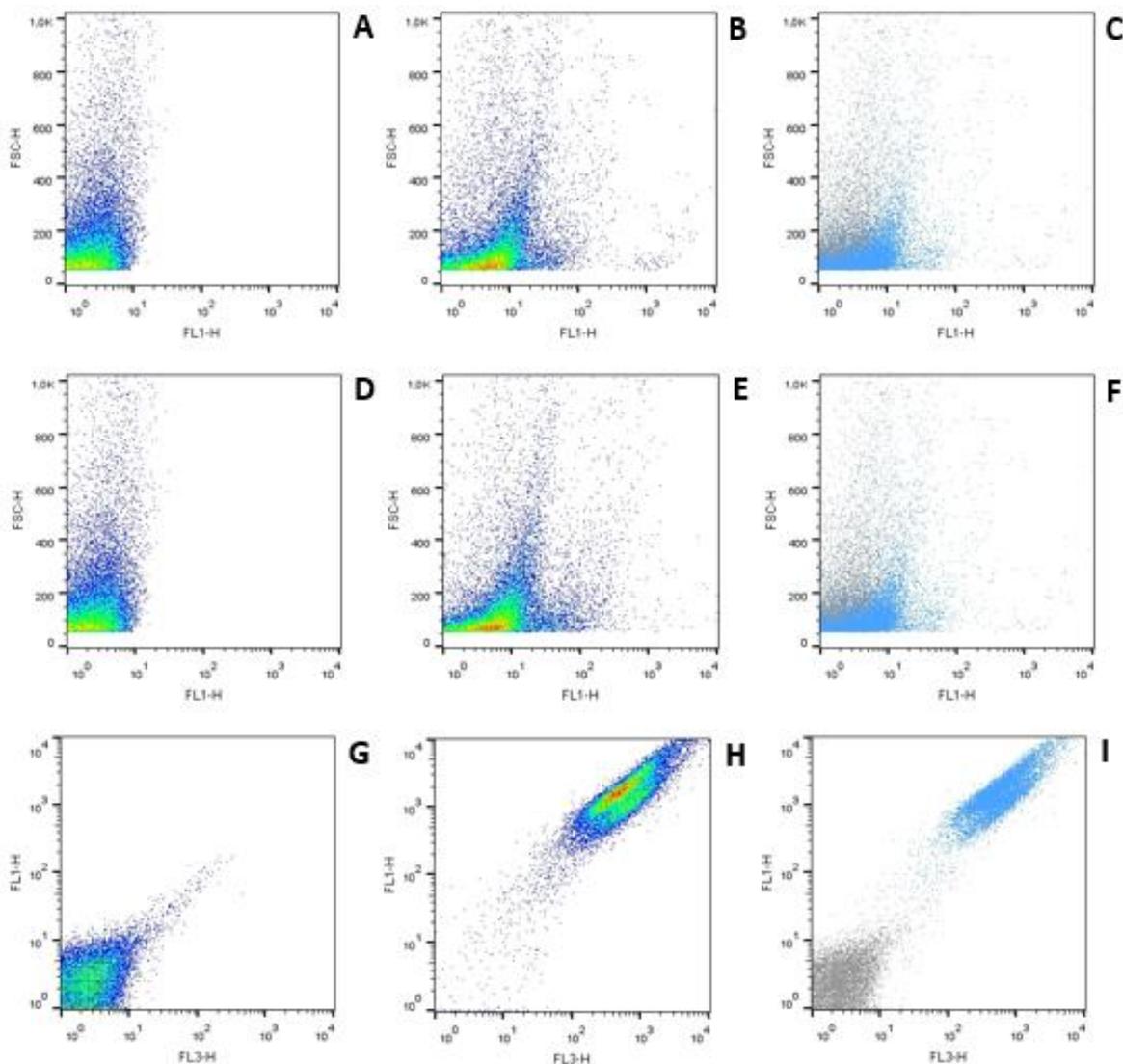


Figura Suplementar A. Gráficos em dot plot representativos da citometria de fluxo das fatias oragnotípicas hipocampais de fêmeas do DIV 1. (A) Fatia hipocampal do grupo controle utilizando os parâmetros FSC-H e FL1-H. (B) Fatia hipocampal marcada para a proteína NeuN (detectada no eixo FL1-H). (C) Sobreposição dos gráfico A e B. (D) Fatia hipocampal do grupo controle utilizando os parâmetros FSC-H e FL1-H. (E) Fatia hipocampal marcada para a proteína GFAP (detectada no eixo FL1-H). (F) Sobreposição dos gráfico D e E. (G) Fatia hipocampal do grupo controle utilizando os parâmetros FL1-H e FL3-H. (H) Fatia hipocampal comarcada com os Mitotracker Red FM (MTR) e MitoTracker Green FM (MTG) (detectados nos eixos FL3-H e FL1-H, respectivamente). (I) Sobreposição dos gráfico G e H.

FIGURA SUPLEMENTAR B – Gráficos em dot plot da citometria de fluxo: Fatias hipocâmpais de fêmeas do DIV 28

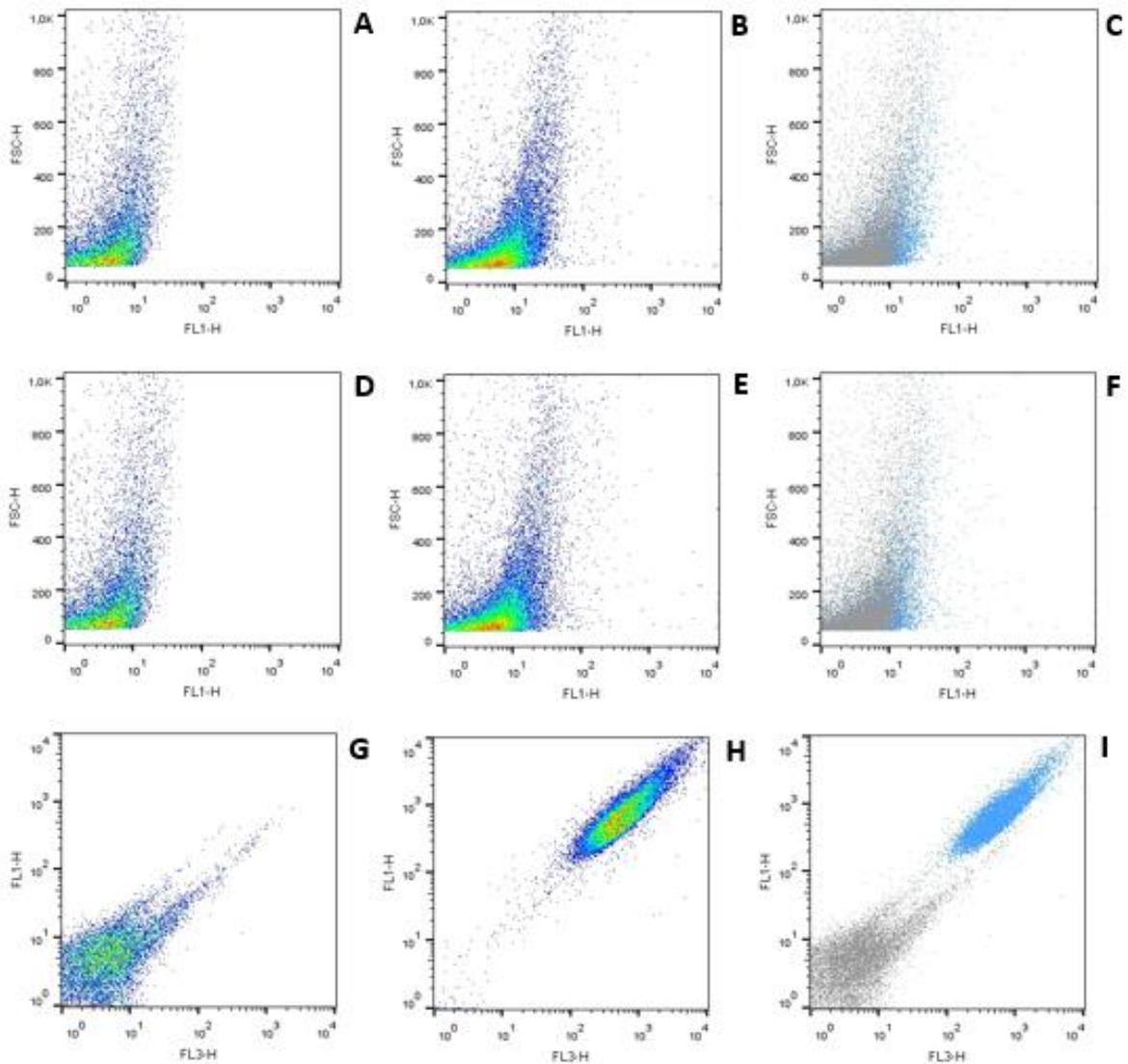


Figura Suplementar B. Gráficos em dot plot representativos da citometria de fluxo das fatias oragnotípicas hipocâmpais de fêmeas do DIV 28. (A) Fatia hipocâmpal do grupo controle utilizando os parâmetros FSC-H e FL1-H. (B) Fatia hipocâmpal marcada para a proteína NeuN (detectada no eixo FL1-H). (C) Sobreposição dos gráfico A e B. (D) Fatia hipocâmpal do grupo controle utilizando os parâmetros FSC-H e FL1-H. (E) Fatia hipocâmpal marcada para a proteína GFAP (detectada no eixo FL1-H). (F) Sobreposição dos gráfico D e E. (G) Fatia hipocâmpal do grupo controle utilizando os parâmetros FL1-H e FL3-H. (H) Fatia hipocâmpal comarcada com os Mitotracker Red FM (MTR) e MitoTracker Green FM (MTG) (detectados nos eixos FL3-H e FL1-H, respectivamente). (I) Sobreposição dos gráfico G e H.

FIGURA SUPLEMENTAR C – Gráficos em dot plot da citometria de fluxo: Fatias hipocâmpais de machos do DIV 1

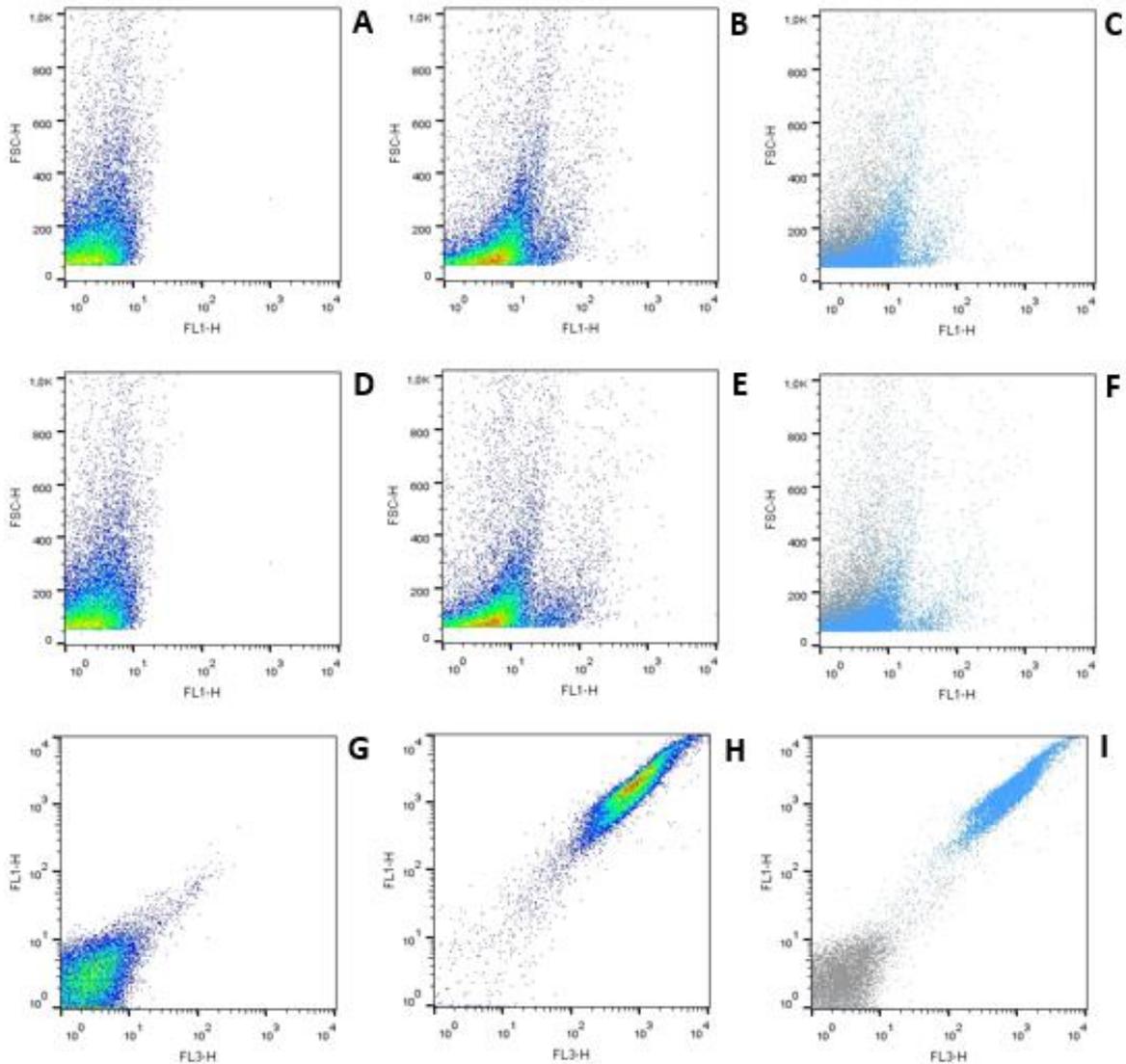


Figura Suplementar C. Gráficos em dot plot representativos da citometria de fluxo das fatias oragnotípicas hipocâmpais de machos do DIV 1. (A) Fatia hipocâmpal do grupo controle utilizando os parâmetros FSC-H e FL1-H. (B) Fatia hipocâmpal marcada para a proteína NeuN (detectada no eixo FL1-H). (C) Sobreposição dos gráfico A e B. (D) Fatia hipocâmpal do grupo controle utilizando os parâmetros FSC-H e FL1-H. (E) Fatia hipocâmpal marcada para a proteína GFAP (detectada no eixo FL1-H). (F) Sobreposição dos gráfico D e E. (G) Fatia hipocâmpal do grupo controle utilizando os parâmetros FL1-H e FL3-H. (H) Fatia hipocâmpal comarcada com os Mitotracker Red FM (MTR) e MitoTracker Green FM (MTG) (detectados nos eixos FL3-H e FL1-H, respectivamente). (I) Sobreposição dos gráfico G e H.

FIGURA SUPLEMENTAR D – Gráficos em dot plot da citometria de fluxo: Fatias hipocâmpais de machos do DIV 28

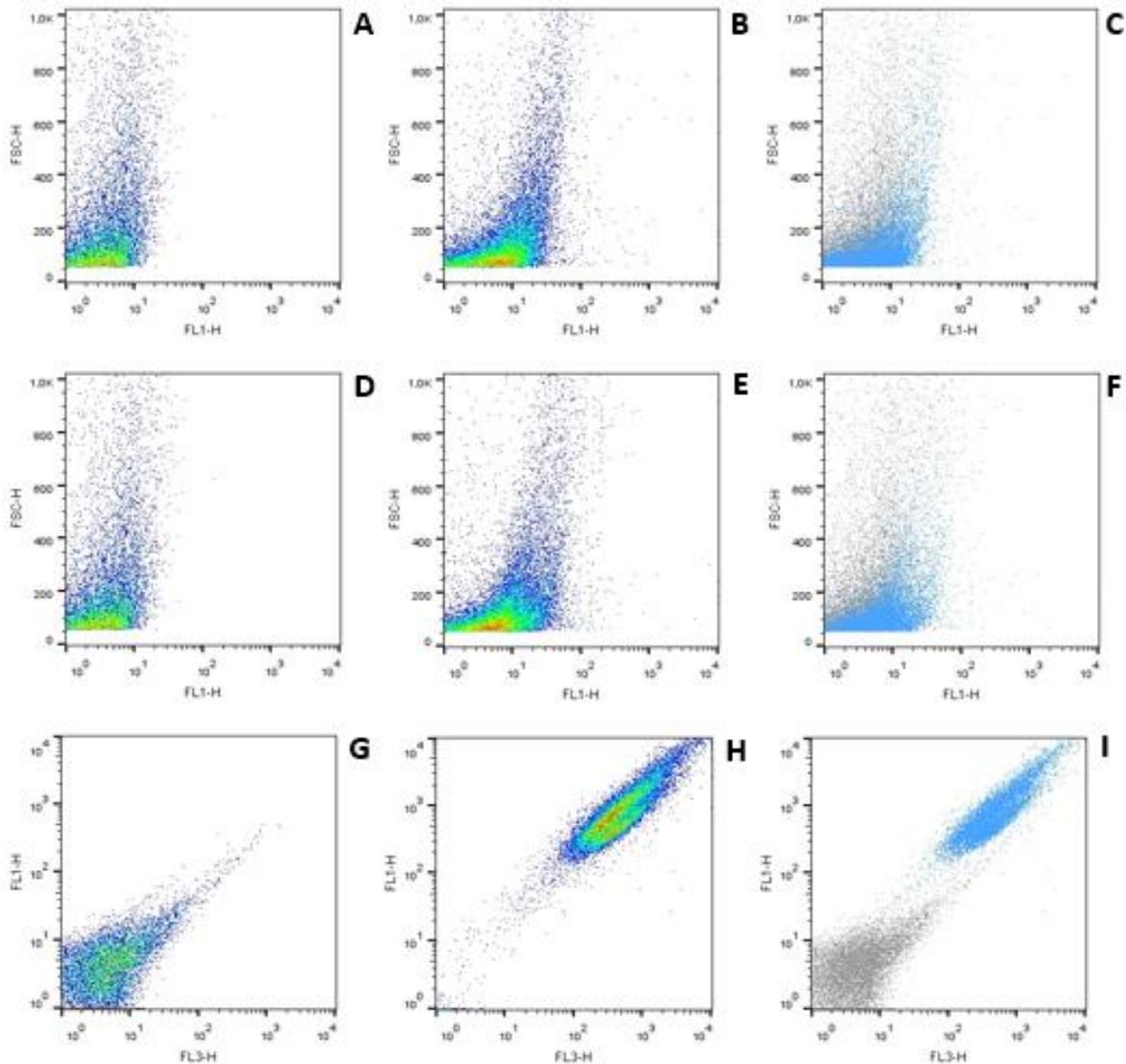


Figura Suplementar D. Gráficos em dot plot representativos da citometria de fluxo das fatias oragnotípicas hipocâmpais de machos do DIV 28. (A) Fatia hipocâmpal do grupo controle utilizando os parâmetros FSC-H e FL1-H. (B) Fatia hipocâmpal marcada para a proteína NeuN (detectada no eixo FL1-H). (C) Sobreposição dos gráfico A e B. (D) Fatia hipocâmpal do grupo controle utilizando os parâmetros FSC-H e FL1-H. (E) Fatia hipocâmpal marcada para a proteína GFAP (detectada no eixo FL1-H). (F) Sobreposição dos gráfico D e E. (G) Fatia hipocâmpal do grupo controle utilizando os parâmetros FL1-H e FL3-H. (H) Fatia hipocâmpal comarcada com os Mitotracker Red FM (MTR) e MitoTracker Green FM (MTG) (detectados nos eixos FL3-H e FL1-H, respectivamente). (I) Sobreposição dos gráfico G e H.