

PAPEL DO SISTEMA GABAÉRGICO NA LIBERAÇÃO DE OCITOCINA DE CÉLULAS HIPOTALÂMICAS SOB CONDIÇÕES HIPERÓSMICAS

Alan Barroso Araújo GRISÓLIA

GRISÓLIA, Alan Barroso Araújo. **Papel do sistema gabaérgico na liberação de ocitocina de células hipotalâmicas sob condições hiperósmicas**. Projeto de investigação científica do Curso de Farmácia -- Centro Universitário Fibra, Belém, 2018.

Os primeiros estudos anatômicos apontaram para o hipotálamo como órgão central responsável pela regulação do volume e osmolalidade dos compartimentos corporais (GROSSAN, 1969), onde ocorre ativação de estruturas que são capazes de detectar as variações na osmolalidade, resultando no recrutamento de vários mediadores químicos: angiotensina II, serotonina, óxido nítrico (GOMES *et al.*, 2010), adenosina, neuropeptídeos, como a ocitocina (BRENNAN *et al.*, 1984; Balment *et al.*, 1980), e também os dois principais neurotransmissores excitatório e inibitório do sistema nervoso central (SNC), glutamato e ácido gama aminobutírico (GABA) respectivamente (GROSSAN,

1969).No hipotálamo, entre as estruturas responsáveis pela detecção e manutenção da osmolalidade, destaca-se a região anteroventral do terceiro ventrículo (AV3V), local onde encontramos os órgãos circunventriculares (OCVs), regiões desprovidas de barreira hematoencefálica, consideradas verdadeiras “janelas cerebrais”. Essas estruturas são precocemente expostas às variações na osmolalidade plasmática, e os principais núcleos são: o órgão subfornical (SFO), núcleo mediano preóptico (MnPO) e o órgão vascular da lâmina terminal (OVLT). A Ocitocina (OT), um peptídeo formado por nove aminoácidos, com peso molecular de 1007 KDa, apresenta a capacidade do extrato da pituitária posterior em provocar contração uterina em gatas grávidas. Sua ação foi descrita na lactação. Embora não se soubesse que ambos os efeitos eram oriundos do mesmo hormônio, esses achados definiram as duas principais ações periféricas da OT (CARSON *et al.*, 2013). Após essas descobertas, a OT tornou-se um dos neuropeptídios mais estudados no sistema nervoso de mamíferos (CARSON *et al.*, 2013). Novos estudos mostraram uma ampla participação em outros processos fisiológicos (BURNS *et al.*, 1997), incluindo a regulação do balanço hídrico e

regulação da osmolalidade plasmática (FAVARETTO *et al.*, 1997). Apesar de não ser considerado seu principal papel na fisiologia, a OT exerce importantes efeitos relacionados às alterações no balanço hídrico, por exemplo, inibindo o apetite por sal sem alterar a ingestão de água, e aumentando a excreção renal de sódio (FAVARETTO *et al.*, 1997). A participação dos aminoácidos na liberação de OT, induzida pela hiperosmolalidade, ainda não é bem estudada, porém algumas evidências apontam neste sentido, como a capacidade do sistema glutamatérgico em induzir aumento na liberação de OT (BUSNARDO *et al.*, 2012). Tão complexa, quanto a relação do glutamato com a OT, é a interação deste peptídeo com o “antagonista fisiológico” do sistema glutamatérgico no SNC, o neurotransmissor GABA. Este aminoácido parece agir como um potente modulador do sistema ocitocinérgico. Trabalhos demonstraram que a inervação GABAérgica diminui atividade de neurônios ocitocinérgicos em condições basais (DECAVEL & VAN DEN POL, 1990), sugerindo que o GABA exerça uma inibição tônica sobre essas células (DECAVEL & VAN DEN POL 1990). Poucos estudos ainda buscam entender os fenômenos

fisiológicos que envolvem esses mediadores químicos relacionados com a homeostase dos fluidos corporais, bem como os efeitos da osmolalidade elevada sobre esses sistemas. Em linhas gerais, as respostas endócrinas hipotalâmicas, descritas em detalhes no campo do conhecimento em fisiologia, vão gerar uma cascata de eventos, os quais incluem: liberação de hormônios, alteração da atividade simpática, modificação da função renal e mudança de comportamentos, que buscam manter o equilíbrio interno e o funcionamento adequado dos diferentes órgãos e sistemas. Em concordância com a literatura atual, aparentemente todas essas respostas podem ser controladas e desencadeadas por mediadores neuroquímicos. Portanto conhecer e estudar a neuroquímica dessa estrutura do sistema nervoso central resulta não somente em descrever mecanismos de gatilho na resposta neuroendócrina, mas permite desbravar muito além do conhecimento em neuroquímica, permeando por regiões de fronteira na ciência, que envolve o conhecimento da fisiologia, biologia celular, farmacologia, neurociência e neuroendocrinologia. Em vista disso, o objetivo desta “Papel do sistema gabaérgico na liberação de ocitocina

de células hipotalâmicas sob condições hiperósmicas” foi avaliar o efeito do meio hipertônico sobre os níveis extracelulares dos neurotransmissores GABA e sua relação com a liberação de ocitocina em preparações de hipotálamo de ratos. Ratos Wistar Machos (260-300g) foram mantidos em condições padrões de biotério, com controle de temperatura (23 ± 2 °C) e luz ambiente (08 às 18h), com água e ração *ad libitum*. Após decapitação, o cérebro foi retirado rapidamente, os *explants* hipotalâmicos foram imediatamente dissecados em gelo como descrito por Gomes e colaboradores (2010), e imediatamente colocado em meio de incubação gelado; Krebs-Ringer Bicarbonato-Glicose(KRBG) isotônico com 1% de glicose (118.46 mM NaCl, 5 mM KCl, 2.5 mM CaCl₂, 1.18 mM NaH₂PO₄, 1.18 mM MgSO₄, 24.88 mM NaHCO₃, pH 7.4, 280 mOsm/kg H₂O) (GOMES *et al.*, 2010), para posteriormente serem transferidos para câmaras individuais no sistema de perinfusão com solução KRBG isotônica a uma temperatura de $37 \pm 0,5$ °C (a qual teve por finalidade não somente nutrir e manter viável o tecido, mas também foi o veículo para as drogas usadas no presente estudo) e foi estabelecido um fluxo de 0,5-0,1 ml/min, e, após estabilização de vinte minutos,

foram feitas as coletas, do lavado tecidual, com intervalo de um minuto, durante o período que transcorreu o experimento. O estímulo hipertônico foi realizado com solução de KRBG hipertônica, pela adição de NaCl (340 mOsm/Kg H₂O). No final de cada experimento, o tecido foi exposto a 60 mM de KCl, para testar a capacidade de resposta do tecido. O sistema de perinfusão consiste num tipo de microdiálise, adaptado ao monitoramento e quantificação das concentrações de fármacos, substâncias endógenas e metabólitos em fluidos biológicos, baseando-se na difusão passiva de substâncias através de um gradiente de concentração. O equipamento é composto de um banho-maria contendo água destilada com temperatura em torno de 37°C, distribuidor de fluxo de um para cinco canais, cinco câmaras de acrílico forradas com filtro, para acomodar o hipotálamo e permitir que apenas a solução que banha o tecido seja difusa por capilares. Esses capilares estão conectados nas câmaras, e interligados a uma bomba de microinfusão, que perfunde o líquido a fluxo constante. A solução de estímulo fica em um béquer suspenso por uma estante adaptada ao banho-maria. Dessa forma, a bomba promove sucção da solução de estímulo contida

no béquer, perpassa pelos capilares, banha o tecido nas câmaras por um tempo determinado de acordo com o protocolo experimental, então o líquido que lava o tecido hipotalâmico é armazenado no tubo coletor e mensurado por técnicas de detecção do analito de interesse. O volume de água do banho-maria deve estar no nível da câmara contendo o tecido e do béquer contendo a solução de estímulo, com temperatura de 37°C, mimetizando a temperatura corpórea. Quando a solução de estímulo for trocada, apenas será substituído o béquer por outro contendo a nova solução, espera-se a solução antiga ser difundida e põe-se a nova solução no sistema, iniciando então um novo tratamento. Tal sistema foi previamente calibrado com uma análise temporal de aproximadamente sessenta minutos, medindo-se cada fluxo da bomba e a respectiva vazão proporcionada por ele, verificando-se então o fluxo ótimo para os experimentos. Todos os reagentes e padrões usados no presente estudo foram grau de pureza CLAE (99 % de pureza), acetato de sódio, ácido acético, ácido bórico, o-phthaldehyde (OPA), N-acetilcisteína, L-glutamato, Ácido gama-aminobutírico, Acetato de Ocitocina, Muscimol, Cloridrato de baclofen e L-homoserina foram obtidos de

Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), Metanol foi comprado da TEDIA Co (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura (Millipore). Foram adotadas as seguintes condições operacionais: coluna cromatográfica Shimadzu, Shim-Pack VP-ODS, dimensão 250 x 4,6 mm, com partículas de 5 µm; vazão da fase móvel 1,2 mL/min. A eluição da fase móvel foi realizada por gradiente composto por fase A tampão acetato de sódio 50 µM, metanol e propanol (95% de tampão acetato com pH 5,67; 5% de metanol e 12 mL de propanol para cada litro de fase A), e fase B metanol 70 %; tempo total da corrida foi de 25 minutos; volume injetado foi de 40 µL; detector fluorescência, comprimento de onda de excitação 340 nm e emissão de 460 nm; A homosserina foi usada como padrão interno. Foram adotadas as seguintes condições operacionais: coluna cromatográfica Shimadzu, Shim-Pack VP-ODS, dimensão 250 x 4,6 mm, com partículas de 5 µm; vazão da fase móvel 1 mL/min; Eluição isocrática, com fase móvel composta por metanol 70 %, pH 3.1; tempo total da corrida foi de 10 minutos; volume injetado foi de 40 µL; detector UV-vis, comprimento de onda de 280 nm. As amostras do lavado do tecido coletadas no sistema de

perinfusão (bem como os padrões submetidos ao ensaio de recuperação) foram submetidas ao processo de preparação, o qual consistiu em adição do padrão interno (somente usado na dosagem de aminoácidos); exposição ao ácido tricloroacético (TCA 1%); agitação em vórtex durante 1 minuto, centrifugação a 10000 RPM por 5 minutos, retirada do sobrenadante, este foi novamente agitado por 1 minuto, para então ser realizada a derivatização. Todos os dados foram expressos em média $\pm$ E.P.M. As comparações dentro do grupo experimental foram feitas por meio de análise de variância (ANOVA) com Newman-Keuls pós-teste. Comparações entre grupos foram feitas utilizando ANOVA de duas vias, com Bonferroni pós-teste. $P < 0.05$ foi considerado significativo. Com intuito de avaliar o efeito da hiperosmolalidade sobre os níveis do neurotransmissor GABA, colocamos o hipotálamo em meio hiperosmótico (340 mOsm/Kg H_2O) durante três minutos. Em relação ao aminoácido GABA, os resultados mostraram os níveis basais (quando o tecido foi exposto ao meio isotônico) em torno de 3.9 ± 0.72 nmol/mg ptn, este nível foi imediatamente diminuído (redução de $\approx 80\%$) durante a hiperosmolalidade (0.7 ± 0.25 nmol/mg ptn).

($P < 0.01$), 1.4 ± 0.33 nmol/mg ptn ($P < 0.05$) e 1.3 ± 0.37 nmol/mg ptn ($P < 0.05$), no primeiro, segundo e terceiro minuto do estímulo hipertônico respectivamente), retornando aos valores basais após o fim do estímulo. Com objetivo de mostrar que o modelo de estudo também é adequado para avaliar a liberação de ocitocina no hipotálamo, tentamos demonstrar a capacidade da hiperosmolalidade em aumentar a liberação de OT. Para tal, o hipotálamo foi exposto ao meio hipertônico durante 5 minutos. Os resultados mostraram um aumento na liberação de OT no quinto minuto de estímulo ($p \leq 0.01$ quando comparado com valor basal) que se sustentou por mais um minuto após o fim da hiperosmolalidade (nono minuto $p \leq 0.05$ quando comparado com valor basal). Esses níveis retornaram ao valor basal nos minutos seguintes. Realizamos o experimento colocando o tecido hipotalâmico diante do meio hipertônico na presença de GABA ($3 \mu\text{M}$) exógeno durante cinco minutos, e quantificamos a ocitocina liberada pelo tecido. O resultado mostrou que o GABA exógeno foi capaz de bloquear a liberação de OT induzida por hiperosmolalidade no minuto 8 e 9. Mantendo os níveis iguais aos valores basais, minuto 8 (3.5 ± 1.0 ng/mg ptn)

versus basal (3.3 ± 0.8 ng/mg ptn) $p > 0.05$, minuto 9 (2.8 ± 0.6 ng/mg ptn) *versus* basal (3.3 ± 0.8 ng/mg ptn) $p > 0.05$. E diferença significativa quando comparamos os níveis de OT do estímulo osmótico sem adição de GABA, minuto 8 hiper (7.7 ± 1.1 ng/mg ptn) *versus* minuto 8 hiper+GABA (3.6 ± 1.0 ng/mg ptn) $p \leq 0.01$, e minuto 9 hiper (6.3 ± 1.0 ng/mg ptn) *versus* minuto 9 hiper+GABA (2.8 ± 0.5 ng/mg ptn) $p \leq 0.05$. Para avaliar a participação do receptor GABA_a, utilizamos o agonista específico, Muscimol ($1 \mu\text{M}$) durante a hiperosmolalidade, e quantificamos o neuropeptídeo ocitocina. O resultado mostrou que ativação do receptor GABA_a foi capaz de bloquear o aumento da liberação de OT induzido por meio hipertônico, mantendo os níveis iguais aos valores basais. No sentido de avaliar a participação do receptor GABA_b, utilizamos o agonista específico, baclofeno ($3 \mu\text{M}$) durante a hiperosmolalidade, e quantificamos a ocitocina. O resultado mostrou que ativação do receptor GABA_b não foi capaz de bloquear o aumento da liberação de ocitocina induzida por meio hipertônico. Os valores durante a hiperosmolalidade foram significativamente maiores que os níveis basais. Os achados descritos permitem descrever uma sequência de eventos

neuroquímicos desencadeados pela hipertonicidade, os quais culminam com a liberação de OT. Primeiramente, no ambiente isotônico, encontramos concentrações de GABA suficientes para manter uma inibição tônica, mediada pelo receptor GABA_A, sem participação do receptor GABA_B. Este estudo contribui com evidências *in vitro* que suportam a hipótese de que a liberação de ocitocina estimulada por hipertonicidade depende da diminuição de GABA. Uma vez instalada a condição de hiperosmolalidade, observamos a diminuição imediata dos níveis do neurotransmissor GABA, que consequentemente elimina/diminui a inibição tônica presente no estado basal.

PALAVRAS-CHAVE: Sistema gabaérgico. Ocitocina. Condições hiperósmicas.

REFERÊNCIAS

BURNS PD., TSAI SJ., WILTBANK MC., HAYES SH., GRAF GA., SILVIA WJ. Effect of oxytocin on concentrations of prostaglandin H synthase-2 mRNA in ovine endometrial tissue in vivo. **Endocrinology**. 138: 5637-5640. 1997.

BUSNARDO C.,CRESTANI CC.,RESSTEL LB.,TAVARES RF.,ANTUNES-RODRIGUES J.,CORRÊA FM. Ionotropic glutamate receptors in hypothalamic paraventricular and supraoptic nuclei mediate vasopressin and oxytocin release in unanesthetized rats. **Endocrinology**. 153 (5): 2323-31. 2012.

BRENNAN TJ., MORRIS M., HAYWOOD JR. GABA agonists inhibit central sodium-induced vasopressin-dependent increases in arterial pressure. **Eur. J. Pharmacol**. 103: 223–234. 1911.

CARSON DS., GUASTELLA AJ., TAYLOR ER., MCGREGOR IS. A brief history of oxytocin and its role in modulating psychostimulant effects. **J Psychopharmacol**. 27: 231-47. 2013.

DECAVELC& VAN DEN POL AN. GABA: a dominant neurotransmitter in the hypothalamus. **Journal of Comparative Neurology**.302: 1019-1037. 1990.

FAVARETTO AL., BALEEJO GO., ALBUQUERQUE-ARAÚJO WI., GUTKOWSKA J., ANTUNES-RIDRIGUES J., MCCANN SM.Oxytocin releases atrial natriuretic peptide from rat atria in vitro that exerts negative inotropic and chronotropic action. **Peptides**.18(9): 1377-81. 1997.

GOMES DA.,GIUSTI-PAIVA A.,VENTURA RR.,ELIAS LL.,CUNHA FQ.,ANTUNES-RODRIGUES J. Carbon monoxide and nitric oxide modulate hyperosmolality-induced oxytocin secretion by the hypothalamus in vitro. **Biosci Rep.** 30: 351-357. 2010.

GROSSMAN SP. A neuropharmacological analysis of hypothalamic and extrahypothalamic mechanisms concerned with the regulation of food and water intake. **Ann N Y Acad Sci.** 157; 902-917, 1969.