

## **PAPEL DO NEUROTRANSMISSOR GABA NO BALANÇO HIDROELETROLÍTICO MODULADO POR ENDOCANABINOIDES**

Alan Barroso Araújo GRISÓLIA

GRISÓLIA, Alan Barroso Araújo. **Papel do neurotransmissor GABA no balanço hidroeletrólítico modulado por endocanabinoides.** Projeto de investigação científica do Curso de Farmácia -- Centro Universitário Fibrá, Belém, 2017.

Avaliar o efeito do meio hipertônico sobre os níveis extracelulares dos neurotransmissores GABA e glutamato em preparações de hipotálamo de ratos foi o objetivo desta pesquisa. Busca-se contribuir esclarecendo a participação do neurotransmissor GABA no comportamento de ingestão de água e sódio modulados pelo sistema endocanabinoide, tema que tem crescente interesse da sociedade, no âmbito nacional e internacional. Apesar de muitas evidências apontarem um importante papel dos sistemas GABAérgicos e glutamatérgicos na regulação da homeostase dos fluidos corporais, ainda não está bem esclarecida a relação desses neurotransmissores com homeostase dos fluidos

corporais. Entender este mecanismo pode esclarecer importantes aspectos de como a relação dos neurotransmissores controlam a fisiologia em condições basais e hiperosmótica. Nas últimas décadas, têm-se assistido a um enorme crescimento no conhecimento sobre o sistema endocanabinoide, um sistema molecular complexo, composto por enzimas de biossíntese/degradação, ligantes endógenos e pelos seus receptores o CB1 e CB2 (FRANCISCHETTI & ABREU, 2006). Entretanto, para consolidação desse conhecimento, são necessários cada vez mais estudos que busquem elucidar os mecanismos intrínsecos envolvidos do sistema endocanabinoides em diferentes processos fisiológicos. O conhecimento detalhado dessa via pode ser o alicerce para prospecção de novos alvos terapêuticos. Entre os processos fisiológicos que têm a participação dos endocanabinoides, estão, por exemplo; a modulação dos eixos endócrinos mediados pelo hipotálamo, a modulação da percepção de dor, regulação da atividade motora, a modulação da resposta inflamatória e imunológica, a ação anti-proliferativa em células tumorais, o controle do sistema cardiovascular. Podemos também destacar seu papel no equilíbrio

hidroeletrolítico, modulando a ingestão de sódio e água, intervindo nos circuitos de recompensa e saciedade mesolímbicos, e no hipotálamo. Recentemente em modelo animal foi demonstrado que o agonista do receptor CB1, administrado por via intraperitoneal, aumenta a ingestão de água e sódio em ratos, privados por 24h, enquanto o antagonista induz o efeito contrário. Em outro estudo, foi demonstrado que a injeção de fitocanabinoides diretamente no hipotálamo também induz aumento da ingestão de sódio e água. Esses estudos mostram que não há dúvida da participação do sistema endocanabinoides na modulação da ingestão hídrica, e, conseqüentemente, sua importância para regulação do volume e pressão arterial. Nessas investigações, não foram descritos os mecanismos pelos quais o sistema endocanabinoide atua, bem como o neurotransmissor envolvido no processo. Apesar dos referidos estudos comportamentais não detalharem os mecanismos envolvidos, estudos *in vitro* indicam a participação do neurotransmissor GABA (MENZIES *et al.*, 2010). O GABA é o principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central, e, no hipotálamo, região responsável pelo controle da ingestão de água e sal, já foi

demonstrada a presença de seus receptores, incluindo o GABA<sub>a</sub> (LI DP & PAN HL *et al.*, 2006). O receptor GABA<sub>a</sub> controla a liberação do hormônio antidiurético, o qual modula o apetite por sódio, e também é capaz de controlar a pressão arterial (LI DP & PAN HL *et al.*, 2006). Estudo recente de Menzies e colaboradores (2010) demonstrou uma interação entre o sistema endocanabinoide e o GABA, uma vez que a ativação do receptor CB1 *in vitro* ocasionou diminuição da liberação do neurotransmissor GABA em um importante núcleo hipotalâmico, relacionado com o equilíbrio hidroeletrólítico. Esses estudos juntos indicam uma interação neuroquímica e farmacológica entre o sistema endocanabinoide e o neurotransmissor GABA na região hipotalâmica, entretanto ainda não é bem estabelecida a participação do GABA no comportamento de ingestão de água e sódio quando modulados pelos endocanabinoides. Na pesquisa aqui realizada, ratos Wistar Machos (260-300g) foram mantidos em condições padrões de biotério, com controle de temperatura ( $23 \pm 2$  °C) e luz ambiente (das 8 às 18h), com água e ração *ad libitum*. Após decapitação o cérebro, foram retirados rapidamente os *explants* hipotalâmicos, os quais foram imediatamente

dissecados em gelo e imediatamente colocados 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 CaCl<sub>2</sub>, 1.18 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.18 mM MgSO<sub>4</sub>, 24.88 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 7.4, 280 mOsm/kg H<sub>2</sub>O), para posteriormente serem transferidos para câmaras individuais, no sistema de perinfusão, com solução KRBG isotônica, a uma temperatura de 37 ± 0,5 °C (a qual teve por finalidade não somente nutrir e manter viável o tecido, mas também servir de veículo para as drogas usadas no estudo) e foi estabelecido um fluxo de 0,5-0,1 ml/min. 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 H<sub>2</sub>O). No final de cada experimento, o tecido foi exposto a 60 mM de KCl, para testar a sua capacidade de resposta. 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 por meio 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 são 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. O sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) usado no estudo foi composto por Bomba (Shimadzu, LC20AT), detector de fluorescência (Shimadzu, RF-10Ax1), detector de UV/VIS (Shimadzu, SPD-20A), desgaseificador (Shimadzu, DGA-20A5), módulo comunicador (Shimadzu, CBM-20A), injetor de amostras Rheodyne com alça de injeção de 20 microlitros, forno (Shimadzu, CTO-20A), coluna cromatográfica Shimadzu, Shim-Pack VP-ODS, dimensão 250 x 4,6 mm, com partículas de 5 µm. Acoplado a um microcomputador com software de integração *Lab Solution*. Com intuito de avaliar o efeito da hiperosmolalidade sobre os níveis dos

neurotransmissores glutamato e GABA, colocamos o hipotálamo em meio hiperosmótico (340 mOsm/Kg H<sub>2</sub>O) 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  $3.9 \pm 0.72$  nmol/mg ptn. Este nível foi imediatamente diminuído (redução de  $\approx 80\%$ ) durante a hiperosmolalidade ( $0.7 \pm 0.25$  nmol/mg ptn ( $P < 0.01$ ),  $1.4 \pm 0.33$  nmol/mg ptn ( $P < 0.05$ ) e  $1.3 \pm 0.37$  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. Simultaneamente, foram feitas as dosagens de glutamato, apresentando níveis basais em torno de  $2.4 \pm 0.22$  nmol/mg ptn, porém a resposta do sistema glutamatérgico, frente à osmolalidade elevada, ocorreu com atraso de um minuto (quando comparado com a resposta GABAérgica), pois o nível basal de glutamato foi elevado somente a partir do segundo minuto de exposição ao meio hipertônico ( $4.3 \pm 0.21$  nmol/mg ptn ( $P < 0.01$ ) e  $6.1 \pm 0.47$  nmol/mg ptn ( $P < 0.001$ ), segundo e terceiro minuto de estímulo osmótico, respectivamente). Após o fim do estímulo os valores retornaram aos níveis basais. Com intuito de confirmar a hipótese da

necessidade de diminuição dos níveis de GABA antecedendo resposta glutamatérgica, o experimento anterior foi repetido, mas com adição de GABA (3  $\mu$ M) exógeno durante o período em que o tecido foi exposto à hiperosmolalidade. Os resultados mostraram que o GABA foi capaz de bloquear o aumento de glutamato induzido por estímulo osmótico, mantendo os valores em  $1.7 \pm 0.57$  e  $1.8 \pm 0.30$  nmol/mg ptn no segundo e terceiro minuto de hiperosmolalidade, sem diferenças significativas, com os valores basais, sendo esses valores significativamente menores quando comparados à hiperosmolalidade sem adição de GABA (no segundo minuto de hiper+GABA ( $1.7 \pm 0.57$ ) vs hiper ( $4.3 \pm 0.21$  nmol/mg ptn) ( $P < 0.001$ ), e no terceiro minuto de hiper+GABA ( $1.8 \pm 0.30$  nmol/mg ptn) vs hiper ( $6.1 \pm 0.47$  nmol/mg ptn) ( $P < 0.001$ ). Os níveis de glutamato retornaram à faixa de concentração basal após o fim do estímulo. O resultado mostrou que ativação do receptor GABA<sub>b</sub> não foi capaz de bloquear o aumento dos níveis extracelular de glutamato induzido por meio hipertônico. Os valores durante a hiperosmolalidade foram significativamente maiores que os níveis basais, minuto 5 ( $7.2 \pm 1.0$  ng/mg ptn) versus basal ( $2.8 \pm 0.4$  ng/mg ptn)  $p \leq 0.05$ , minuto 6 ( $9.4 \pm 1.9$  ng/mg ptn) versus

basal ( $2.8 \pm 0.4$  ng/mg ptn)  $p \leq 0.05$ . E valores iguais, quando comparamos os níveis de glutamato durante estímulo osmótico sem adição de baclofeno; minuto 5 hiper ( $5.1 \pm 0.2$  nmol/mg ptn) *versus* minuto 5 hiper+baclofeno ( $7.2 \pm 1.0$  nmol/mg ptn)  $p \leq 0.01$ , e minuto 6 hiper ( $7.4 \pm 0.4$  nmol/mg ptn) *versus* minuto 6 hiper+baclofeno ( $9.4 \pm 1.9$  nmol/mg ptn)  $p \leq 0.05$  (figura 3). Após estudar o papel dos receptores (inotrópicos e metabotrópicos) de GABA na liberação de glutamato, buscamos também entender como esses receptores estão relacionados com a liberação de OT durante a hiperosmolalidade. Para avaliar a participação do receptor GABA<sub>A</sub>, 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<sub>A</sub> foi capaz de bloquear o aumento da liberação de OT induzido por meio hipertônico, mantendo os níveis iguais aos valores basais, minuto 8 ( $2.8 \pm 1.5$  ng/mg ptn) *versus* basal ( $3.0 \pm 0.9$  ng/mg ptn)  $p > 0.05$ , minuto 9 ( $3.0 \pm 1.1$  ng/mg ptn) *versus* basal ( $3.1 \pm 0.9$  ng/mg ptn)  $p > 0.05$ . E diferença significativa quando comparamos os níveis de OT durante o estímulo osmótico sem adição de GABA, minuto 8 hiper

( $7.7 \pm 1.1$  ng/mg ptn) *versus* minuto 8 hiper+Muscimol ( $2.8 \pm 1.5$  ng/mg ptn)  $p \leq 0.01$ , e minuto 9 hiper ( $6.3 \pm 1.0$  ng/mg ptn) *versus* minuto 9 hiper+GABA ( $3.0 \pm 1.1$  ng/mg ptn)  $p \leq 0.05$ . Os achados permitem descrever uma sequência de eventos neuroquímicos desencadeados pela hipertonicidade. No ambiente isotônico encontramos concentrações de GABA suficientes para manter uma inibição tônica, mediada pelo receptor GABA<sub>A</sub>, sobre a liberação de glutamato, e, desse modo, a própria excitabilidade hipotalâmica. Essa modulação ocorre via receptor GABA<sub>A</sub>, mas sem participação de GABA<sub>B</sub>.

**PALVRA-CHAVE:** Neurotransmissor GABA; Balanço hidroeletrolítico; Modulação por endocanabinoides.

## REFERÊNCIAS

FRANCISCHETTI EA & ABREU VG. The Endocannabinoid System: A New Perspective for Cardiometabolic Risk Control. **Arq Bras Cardiol**; 87: 548-558. 2006.

LI DP & PAN HL. Plasticity of GABAergic control of hypothalamic presympathetic neurons in hypertension. **Am J Physiol**. 290: 1110-1119. 2006.

Menzies. JRW. Ludwig M, Leng G. Direct and Indirect Effects of Cannabinoids on in vitro GABA Release in the Rat Arcuate Nucleus. **J Neuroendocrinol.** Jun;22(6):585-92. 2010. 11.