

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

**O PAPEL DOS ASTRÓCITOS NO ENVELHECIMENTO CEREBRAL:
AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS GLUTAMATÉRGICOS, OXIDATIVOS E
INFLAMATÓRIOS EM CULTURAS HIPOCAMPAIS DE RATOS WISTAR.**

Bruna Bellaver

Orientador: Prof. Dr. André Quincozes dos Santos

Co-orientador: Prof. Dr. Diogo Onofre Gomes de Souza

Porto Alegre

2015

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

**O PAPEL DOS ASTRÓCITOS NO ENVELHECIMENTO CEREBRAL:
AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS GLUTAMATÉRGICOS, OXIDATIVOS E
INFLAMATÓRIOS EM CULTURAS HIPOCAMPAIS DE RATOS WISTAR.**

Bruna Bellaver

Orientador: Prof. Dr. André Quincozes dos Santos

Co-orientador: Prof. Dr. Diogo Onofre Gomes de Souza

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.

Porto Alegre

2015

*“Não é merecedor do favo de mel aquele
que evita a colmeia porque as abelhas
têm ferrões”*

(William Shakespeare)

Dedico esta dissertação a todos que, de algum modo, me ajudaram a enfrentar as “abelhas”.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Vanderlei e Izete, por serem os maiores incentivadores da minha formação, por me apoiarem incondicionalmente e não medirem esforços para que eu chegasse até aqui.

À minha irmã e iniciação científica, Gabriela, pela companhia, apoio emocional e prático, e por me fazer querer sempre dar o melhor de mim.

Ao meu namorado, Douglas, por me lembrar que eu posso superar até mesmo os obstáculos mais difíceis e por sempre estar comigo para vence-los.

Ao meu orientador, André Quincozes, agradeço não só por todo o auxílio científico que foi fundamental para a conclusão do meu mestrado, mas também pela amizade e pelas palavras de motivação e incentivo em momentos de dúvidas.

Ao meu co-orientador, Diogo Souza, pelas palavras de carinho e todo ensinamento.

À colega e amiga, Débora, por toda a ajuda, parceria de fluxo, conversas, risadas, enfim, por tornar todo trabalho mais prazeroso.

À querida Larissa Bobermin, pela amizade, agradável companhia, pela ajuda e apoio fundamental na reta final desse trabalho.

Aos colegas do lab 28, Priscila, Yasmine, Camila, Bernardo e Gisele, obrigada pelo convívio, risadas, apoio e aprendizado juntos.

Às minhas amigas de longa data, Daiane, Gabriela e Marina, que embora um pouco mais longe sempre torceram por mim e moram no meu coração.

À “Turma Malhação”, meus grandes amigos, um presente que essa universidade me deu e que eu agradeço infinitamente.

Às minhas “tias”, Ivete e Marinez, minhas segundas mães, que torcem tanto quanto a própria para o meu sucesso.

ÍNDICE

PARTE I

RESUMO	2
ABSTRACT	3
LISTA DE ABREVIATURAS	4
INTRODUÇÃO	
1 – SISTEMA NERVOSO CENTRAL – Anatomia	6
1.1 – HEMISFÉRIOS CEREBRAIS	6
1.1.1 – CÓRTEX	6
1.1.3 – AMÍGDALA	6
1.1.3 – NÚCLEOS DA BASE	7
1.1.4 – HIPOCAMPO	7
2 – SISTEMA NERVOSO CENTRAL – Tipos celulares	8
2.1 – OS ASTRÓCITOS	9
2.2 – MARCADORES ASTROCITÁRIOS	12
2.2.1 – PROTEÍNA GLIAL FIBRILAR ÁCIDA E VIMENTINA	12
2.2.2 – TRANSPORTADORES DE GLUTAMATO	13
2.2.3 – GLUTAMINA SINTETASE	13
3 – ESTRESSE OXIDATIVO E DEFESAS ANTIOXIDANTES	14
4 – RESPOSTA IMUNE INFLAMATÓRIA	16
5 – ENVELHECIMENTO E SNC	17
6 – CULTURA DE ASTRÓCITOS	18
7 – OBJETIVOS	20
7.1 – OBJETIVO GERAL	22
7.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22

PARTE II	
CAPÍTULO I – ARTIGO CIENTÍFICO	22
PARTE III	
DISCUSSÃO	75
PERSPECTIVAS	89
REFERÊNCIAS	90

PARTE I

RESUMO

O hipocampo é uma das principais estruturas relacionada aos processos de aprendizado e memória e também ao envelhecimento cerebral. Os astrócitos são células dinâmicas que mantêm a homeostase cerebral, regulando sistemas de neurotransmissores, processamento da informação sináptica, metabolismo energético, liberação de fatores tróficos, defesas antioxidantes e resposta inflamatória. Considerando a relevância dessa estrutura cerebral e também a fundamental importância dos astrócitos para manutenção das condições fisiológicas do sistema nervoso central, nesse trabalho nós aprimoramos o estudo de um modelo de cultura de astrócitos hipocámpais de ratos Wistar adultos (90 dias) e envelhecidos (180 dias), previamente padronizado pelo grupo. Observamos aqui a alteração da expressão dos principais marcadores gliais, em função da idade: proteína glial fibrilar ácida (GFAP), vimentina, transportadores de glutamato (GLAST e GLT-1) e enzima glutamina sintetase (GS). Além disso, também observamos alterações na liberação de GDNF, BDNF, S100B e TGF- β dependente da idade. Esses astrócitos ainda apresentaram parâmetros de estresse oxidativo/nitrosativo aumentados com o envelhecimento cerebral com simultânea disfunção mitocondrial e da enzima NADPH oxidase (NOX). Ainda em relação à homeostase redox, foram observadas disfunções nas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione (GSH) em função da idade. Os astrócitos maduros também desencadearam uma resposta inflamatória distinta dos astrócitos de animais neonatos com aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-18 e MCP-1. Os principais mecanismos associados a alterações gliais em função da idade em cultura de astrócitos hipocámpais envolve as vias de sinalização NF κ B, p38, Nrf-2 e HO-1. Essas vias de sinalização estão relacionadas à homeostase redox e resposta inflamatória. Esses resultados reforçam o papel dos astrócitos hipocámpais como alvo para o entendimento dos mecanismos envolvendo o envelhecimento cerebral bem como desordens neurológicas relacionadas a ele.

ABSTRACT

The hippocampus is one of the structures more closely related to behavior, neurochemical and cellular alterations during aging. Astrocytes are dynamic cells that maintain brain homeostasis by regulating neurotransmitter systems, synaptic information processing, energy metabolism, release of trophic factors, antioxidant defense and inflammatory response. Considering the importance of this brain structure and also the astrocyte importance for maintenance physiological conditions of the central nervous system, in this work we have improved the study of hippocampal astrocytes culture model of adult Wistar rats (90 days) and aged (180 days), previously standardized by the group. Here we see the age-dependent changes of expression of the major glial markers: glial fibrillary acidic protein (GFAP), vimentin, glutamate transporters (GLAST and GLT-1) and glutamine synthetase (GS). The GDNF, BDNF, S100B protein and TGF- β also changed their release with age. Astrocytes showed an age-dependent increase in oxidative/nitrosative stress with significant mitochondrial and NADPH oxidase (NOX) dysfunction. Furthermore, alterations related to age in superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) activities and glutathione (GSH) levels contribute to impaired redox state. Astrocytes also displayed age-dependent inflammatory response with augment of proinflammatory cytokine levels such as TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-18 and chemokine MCP-1. The putative mechanisms associated to age-dependent changes in glial functionality in hippocampal astrocyte cultures involve NF κ B, p38, Nrf-2 and HO-1 pathways. These signaling pathways are critical to interconnect redox homeostasis and inflammatory response. These results reinforce the role of hippocampal astrocytes as target for understanding mechanisms involved in aging and age-related neurological disorders.

LISTA DE ABREVIATURAS

AD: Adulto

ATP: Adenosina Trifosfato

BDNF: Fator Neurotrófico Derivado do Encéfalo (Brain-Derived Neurotrophic Factor)

BSC: Barreira Sangue-Cérebro

CAT: Catalase

EN: Envelhecido

ERO's: Espécies Reativas de Oxigênio

FI: Filamentos intermediários

GABA: Ácido Gama-aminobutírico

GDNF: Fator Neurotrófico Derivado da Glia (Glia-Derived Neurotrophic Factor)

GFAP: Proteína Glial Fibrilar Ácida (Glial Fibrillary Acidic Protein)

GLAST: Transportador Glutamato-Aspartato (Glutamate-Aspartate Transporter)

GLT-1: Transportador de Glutamato - 1

GPx: Glutathione Peroxidase

GS: Glutamina Sintetase

GSH: Glutathione

HO1: Heme-Oxygenase 1

IL-1 β : Interleucina - 1 β

IL-6: Interleucina - 6

IL-10: Interleucina - 10

IL-18: Interleucina - 18

MAPK: Proteína Cinase Ativada por Mitógenos (Mitogen-Activated Protein Kinase)

MCP-1: Proteína Quimiotática de Monócitos - 1 (Monocyte Chemotactic Protein - 1)

NFkB: Fator Nuclear kappa Beta (Nuclear Factor kappa Beta)

NN: Neonato

NOX: NADPH Oxidase

Nrf-2: Fator Nuclear Eritróide Derivado-2 (Nuclear Factor Erythroid-derived 2)

SNC: Sistema Nervoso Central

SOD: Super Óxido Dismutase

TGF- β : Fator de Transformação de Crescimento β (Transforming Growth Factor β)

TNF- α : Fator de Necrose Tumoral (Tumor Necrosis Factor Alpha)

INTRODUÇÃO

1 – SISTEMA NERVOSO CENTRAL – Anatomia

O sistema nervoso central (SNC) é formado por duas grandes regiões: encéfalo e a medula espinhal. O encéfalo, por sua vez, é subdividido em tronco cerebral (bulbo, ponte e mesencéfalo), cerebelo, diencéfalo e hemisférios cerebrais. Além disso, devido à sua fragilidade e importância, o encéfalo é protegido pelos ossos cranianos, pelas meninges e pelo líquido cerebrospinal (Raine 2006; Machado 2013).

1.1– HEMISFÉRIOS CEREBRAIS

Os hemisférios cerebrais possuem quatro componentes maiores, que juntos participam do que há de mais refinado no comportamento humano.

1.1.1 - CÓRTEX

É essencial para o comportamento motor, percepção do tato, dor, propriocepção, percepções sensoriais provenientes da pele, músculos e articulações e percepção visual (Purves 2004).

1.1.2 - AMÍGDALA

Esta estrutura está relacionada não apenas com emoções, mas também com a coordenação de respostas corporais a situações estressantes ou ameaçadoras (Machado 2013).

1.1.3 – NÚCLEOS DA BASE

Participam de diversas funções em cooperação com o córtex cerebral, estando intimamente ligado ao controle de movimentos, emoções e cognição (Raine 2006; Machado 2013);

1.1.4 – HIPOCAMPO

Estrutura que foi primeiramente identificada por Giulio Cesare Aranzi (Gross 1998) é, filogeneticamente, uma das mais antigas áreas cerebrais e está localizada na região temporal medial do cérebro. O seu papel nos processos de aprendizado e memória vem sendo elucidado ao longo dos anos por diversos pesquisadores. Inicialmente, alguns autores observaram uma perda de memória em roedores e humanos, após lesão limitada ao hipocampo, evidenciada quando os mesmos foram submetidos a tarefas que exigissem aptidões de memória e aprendizado (Scoville & Milner 1957; Olton & Papas 1979; Eichenbaum *et al.* 1989). Além disso, mais recentemente, Panegyres e Raine demonstram que o hipocampo é uma estrutura crucial para o armazenamento e a recuperação de certos tipos de informações, além de ser uma estrutura chave em processos relacionados à fisiopatologia de desordens neurodegenerativas (Panegyres 2004; Raine 2006).

Esta estrutura, juntamente com a amígdala e diencéfalo, faz parte do sistema límbico, que desempenha um papel-chave na conduta humana, sendo esse sistema frequentemente associado a disfunções psiquiátricas (Machado 2013). Muitas evidências apontam que esta estrutura também desempenha um papel crítico na memória declarativa, ou seja, em nossa capacidade de recordar fatos e eventos cotidianos. Estudos sugerem que o processamento da

memória, mediado pelo sistema hipocampal, começa durante a aprendizagem e continua contribuindo para a consolidação de memórias por um período de tempo prolongado (Kroes & Fernandez 2012). Em concordância com experimentos realizados em animais, estudos em humanos, que apresentavam problemas de memória já diagnosticados, permitiram, através de técnicas de ressonância magnética, a observação visual de anormalidade hipocampal, uma vez que esta estrutura mostrou-se significativamente diminuída e atrofiada (Squire *et al.* 1990).

Além disso, o hipocampo também está envolvido na gênese de distúrbios convulsivos em humanos e roedores. Quaisquer elevações nos níveis basais de atividade nesta estrutura disparam centenas de mudanças que alteram expressão de fatores de transcrição, de proteínas e receptores nas células e nos circuitos hipocampais (Morimoto *et al.* 2004).

Devido a sua importante funcionalidade, pelo fato de ser uma região altamente reativa a uma variedade de tratamentos e ser uma das estruturas mais relacionadas com alterações eletrofisiológicas, estruturais e morfológicas durante o envelhecimento, o hipocampo tem recebido crescente interesse de pesquisadores (Cerbai *et al.* 2012).

2 – SISTEMA NERVOSO CENTRAL – Tipos celulares

O parênquima do SNC é formado por células nervosas e suas extensões aferentes e eferentes, dendritos e axônios, todos estritamente envolvidos pela neuroglia. A neuroglia, por sua vez, é composta por um grande e heterogêneo número de células e tem como fundamental função a manutenção da

homeostasia do SNC e como componente majoritário o astrócito (Raine 2006; Kettenmann & Verkhratsky 2008).

2.1 – OS ASTRÓCITOS

Os astrócitos, células gliais que representam aproximadamente 50% do número total de células do SNC, têm a maior diversidade funcional do cérebro, além de uma capacidade dinâmica de alterar seu fenótipo no decorrer da vida (Shao & McCarthy 1994). Os astrócitos são divididos em dois grandes subtipos, de acordo com suas diferenças morfológicas e localização anatômica: (a) protoplasmáticos, os mais abundantes, são encontrados na substância cinzenta, exibindo muitas ramificações com uma distribuição globóide e (b) fibrosos, que são encontrados ao longo de toda substância branca e morfológicamente, apresentam menos ramificações e extensões cilíndricas, longas e finas (Sofroniew & Vinters 2010). Inicialmente acreditava-se que os astrócitos eram meros auxiliares da atividade neuronal (Kettenmann & Verkhratsky 2008), porém, ao longo dos anos tornou-se claro que essas versáteis células gliais são responsáveis por uma variedade de funções complexas e essenciais ao SNC (Nedergaard *et al.* 2003; Maragakis & Rothstein 2006; Wang & Bordey 2008).

Os astrócitos são reguladores multifuncionais do acoplamento neurometabólico. Localizados em uma posição chave, na qual seus processos se mantêm em contato tanto com os vasos sanguíneos quanto com os neurônios, eles são capazes de captar substratos energéticos do sangue e com isso fornecer energia para manutenção da atividade neuronal (Stobart & Anderson 2013). Em períodos curtos de hipoglicemia ou de demanda

energética tecidual aumentada, os grânulos de glicogênio armazenados nos astrócitos são capazes de dar o aporte energético necessário para a atividade cerebral adequada (Brown & Ransom 2007). Devido a esse permanente contato e às múltiplas interações bidirecionais dos astrócitos com os vasos sanguíneos, eles também são capazes de controlar o fluxo de sangue do SNC através da produção e liberação de moléculas vasoativas (Gordon *et al.* 2007). Essas células ainda podem ser mediadoras locais primárias do fluxo sanguíneo do SNC em resposta a alterações na atividade neuronal (Koehler *et al.* 2009).

Evidências consistentes demonstraram ainda que a interação neurônio-glia é essencial para a plasticidade sináptica (Ullian *et al.* 2001; Clarke & Barres 2013), com o astrócito sendo primordial na liberação e regulação de moléculas de sinalização que, além de serem particularmente importantes na modulação da plasticidade sináptica, também afetam os processos de aprendizagem e de formação da memória (Fields & Stevens-Graham 2002; Allen & Barres 2005). Estes compostos incluem o glutamato, o ATP, citocinas, e várias outras moléculas de sinalização como a D-serina, a adenosina, e o lactato (Halassa & Haydon 2007; Theodosis *et al.* 2008). Como astrócitos são, em parte, responsáveis por regular a formação de sinapses e também modular a sua atividade, há uma forte possibilidade de que essas células exerçam um papel essencial na memória e na aprendizagem, processos caracteristicamente hipocampais (Ota *et al.* 2013).

Os astrócitos ainda desempenham um papel fundamental na formação e manutenção da barreira sangue-cérebro (BSC) e conseqüentemente, na modulação da resposta imune inflamatória (a seguir). Eles regulam o movimento de eletrólitos, de xenobióticos e a também a passagem de células

do sistema imune entre a circulação sistêmica e o parênquima do SNC, a fim de manter um ambiente adequado para a função neuronal. Além disso, previnem a formação de lesões adicionais durante patologias como acidentes vasculares cerebrais, trauma e isquemia (Zhang & Pardridge 2001; Cabezas *et al.* 2014).

Estas células gliais também liberam fatores tróficos, tais como GDNF (do inglês glial cell line-derived neurotrophic factor) e BDNF (do inglês brain-derived neurotrophic factor) que são capazes de controlar o desenvolvimento, sobrevivência, diferenciação e plasticidade das funções cerebrais ao longo da vida (Tapia-Arancibia *et al.* 2008; Patterson 2015). A proteína S100B também é produzida e liberada primariamente pelos astrócitos, e seus efeitos parácrinos e autócrinos sobre neurônios e glia são dependentes dos seus níveis no SNC. Em baixas concentrações (nanomolar) atua como um fator neurotrófico estimulando o crescimento de neuritos e a captação de glutamato astrocitária para proteger neurônios contra a excitotoxicidade glutamatérgica (Adami *et al.* 2001; Tramontina *et al.* 2006b). Já elevadas concentrações (micromolar) de S100B, são observadas no cérebro maduro e podem produzir efeitos deletérios para o SNC, aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO's) e também a resposta inflamatória (Mrak & Griffinbc 2001; Donato *et al.* 2009). Além disso, os astrócitos também são responsáveis pela liberação de TGF- β (do inglês transforming growth factor β), uma molécula com papel crucial na comunicação intercelular, embriogênese, morfogênese, resposta imune e apoptose em uma variedade de células do SNC (Heinemann *et al.* 2012).

Outra função atribuída a essas versáteis células é a de promover a manutenção do pH e homeostase iônica no SNC. Os astrócitos tamponam as

concentrações extracelulares de potássio que se acumulam com a atividade neural, pois eles expressam canais de potássio nas sinapses e nos processos terminais ao redor dos capilares (Wang & Bordey 2008). Esta atividade é de extrema importância para o equilíbrio eletroquímico dos neurônios, visto que altas concentrações de potássio no meio extracelular resultam em despolarização neuronal, hiperexcitabilidade e convulsões.

2.2 – MARCADORES ASTROCITÁRIOS

2.2.1- PROTEÍNAS DE CITOESQUELETO

O citoplasma das células animais é composto por proteínas de microfilamentos (actina), de microtúbulos (tubulina) e de filamentos intermediários (FI). Ao contrário das outras duas classes de proteínas citadas anteriormente, as proteínas de FI são diferentemente expressas de acordo o tipo e grau de diferenciação do tecido às quais se encontram, sugerindo a possível existência de funções específicas para cada uma delas. As duas principais proteínas de FI de astrócitos são a proteína glial fibrilar ácida (GFAP) e vimentina (Pekny 2001; Bramanti *et al.* 2010). No início do desenvolvimento cerebral, os astrócitos imaturos expressam principalmente vimentina que, progressivamente, vai sendo substituída por GFAP, com o amadurecimento astrocitário (Bramanti *et al.* 2010). Cabe ressaltar que a GFAP tem sido amplamente reconhecida como um marcador de diferenciação de astrócitos, constituindo a principal proteína de filamentos intermediários em astrócitos maduros (Bramanti *et al.* 2010).

2.2.2 – TRANSPORTADORES DE GLUTAMATO

Como dito anteriormente, os astrócitos desempenham um papel-chave na regulação da transmissão sináptica. Em particular, eles controlam indiretamente a transmissão de glutamato através da captação eficiente e específica deste neurotransmissor excitatório, sendo capazes de captar até 90% do glutamato liberado na fenda sináptica (Anderson & Swanson 2000; Schousboe *et al.* 2013). A captação de glutamato envolve uma variedade de transportadores de membrana específicos deste aminoácido, sendo que GLAST e GLT-1 são os principais transportadores de glutamato do SNC e exclusivamente expressos em astrócitos (Danbolt 2001). Em se tratando do cérebro adulto, GLT-1 demonstrou ser o maior responsável pela remoção de glutamato da fenda sináptica, evitando assim o dano neuronal devido à elevada atividade excitatória deste neurotransmissor (Huang & Bergles 2004).

2.2.3 – GLUTAMINA SINTETASE

O glutamato, após ser captado pelos seus transportadores astrocitários, poderá ser convertido à glutamina pela enzima glutamina sintetase (GS). Essa enzima, exclusivamente astrocitária no SNC (Norenberg & Martinez-Hernandez 1979), proporciona a essas células gliais uma importante via de comunicação com os neurônios, através do ciclo glutamato-glutamina. A glutamina gerada nos astrócitos por essa enzima é lançada de volta para terminais pré-sinápticos para ser utilizada na síntese *de novo* do neurotransmissor glutamato nos neurônios (Schousboe *et al.* 2013). Van Gassen e colaboradores demonstraram a fundamental importância dessa enzima na depuração do glutamato, uma vez que animais *knockout* heterozigotos para GS apresentaram

elevado número de crises convulsivas, enquanto que a total ausência dessa enzima demonstrou não ser compatível com a vida (van Gassen *et al.* 2009).

3 – ESTRESSE OXIDATIVO E DEFESAS ANTIOXIDANTES

O cérebro possui um grande potencial oxidativo devido ao fato de ser um tecido altamente consumidor de oxigênio, sendo assim, *in vivo*, constantemente estão sendo produzidas espécies reativas de oxigênio (ERO's), contudo, em condições normais, existe um equilíbrio entre oxidantes e antioxidantes (Halliwell 2007). A maior parte das ERO's produzidas pelas células resulta de um desvio de elétrons das suas funções fisiológicas em locais específicos no interior da célula. Estes locais incluem: a cadeia respiratória mitocondrial, a enzima NADPH oxidase (NOX), a enzima xantina-oxidase e, em menor grau, o metabolismo do ácido araquidônico e auto-oxidação de catecolaminas ou hemoproteínas (Calabrese *et al.* 2004; Nayernia *et al.* 2014). Quando a taxa de geração de ERO's excede a capacidade de defesas antioxidantes, fato comum em se tratando de envelhecimento cerebral, se instala o estresse oxidativo, e esse quadro segue causando extensos danos ao DNA, proteínas e lipídios (Calabrese *et al.* 2004). Quando os níveis de ERO's excede a capacidade de detoxificação celular e mitocondrial pode haver a abertura de poros de permeabilidade mitocondrial transitórios permitindo a livre difusão de moléculas de baixo peso molecular entre o citosol e a matriz mitocondrial. Isso resulta em colapso do gradiente eletroquímico transmembrana, perda de solutos da matriz, liberação de fatores de iniciação de apoptose, além de outros fatores que juntos iniciarão à morte celular programada (Emerit *et al.* 2004).

No entanto, os sistemas de defesa antioxidantes, subdivididos em enzimático e não-enzimático servem para controlar o aumento da geração de ERO's. Em relação à defesa antioxidante não enzimática cabe enfatizar o papel da glutathiona (GSH), um tripeptídeo formado por glicina, glutamato e cisteína que exerce seu efeito antioxidante reagindo diretamente com ERO's, ou sofrendo oxidação pela ação da enzima glutathiona peroxidase (Dringen 2000; Pope *et al.* 2008). No que se refere à defesa antioxidante enzimática, as principais enzimas presentes nos astrócitos são: (a) superóxido dismutase (SOD), capaz de dismutar o radical superóxido a peróxido de hidrogênio, (b) catalase (CAT) que detoxifica o peróxido de hidrogênio a oxigênio e água (c), glutathiona peroxidase (GPx), que tem sua ação inativando peróxidos orgânicos e é de extrema importância na diminuição dos níveis de GSH que é a principal defesa antioxidante não enzimática do SNC.

Outra enzima envolvida na resposta ao estresse oxidativo é a heme-oxigenase, mais especificamente sua isoforma induzível, 1 (HO1). Em resposta a um dano oxidativo, a indução de HO1 pode proteger as células através da catálise de metaloporfirinas, que são moléculas pró-oxidantes, tais como o grupamento heme, convertendo-as em pigmentos biliares, biliverdina e bilirrubina, ambos com potencial antioxidante (Quincozes-Santos *et al.* 2014). O hipocampo torna-se um importante alvo de estudo para essa proteína uma vez que os níveis de HO1 encontrados nessa estrutura cerebral (e no cerebelo) são fisiologicamente elevados quando comparados com os baixos, e muitas vezes indetectáveis, níveis da proteína encontrados no restante do encéfalo (Calabrese *et al.* 2002; Scapagnini *et al.* 2002). O estresse oxidativo também tem sido demonstrado como um estímulo capaz de aumentar a expressão e a

ligação ao DNA de inúmeros fatores de transcrição relacionados à resposta oxidativa, como o fator nuclear eritróide derivado-2 (Nrf2), que tem se demonstrado potencializador da expressão de HO1 (Wakabayashi *et al.* 2010). A proteína HO1 também é capaz de modular, através dos seus produtos de catálise e da inibição da enzima óxido nítrico sintase, a translocação do fator nuclear kappa beta (NFkB). Além disso, para que haja a translocação do NFkB para o núcleo há a necessidade da ativação da via p38 da proteína cinase ativada por mitógenos (MAPK) (Patterson 2015).

4 – RESPOSTA IMUNE INFLAMATÓRIA

Inflamação e estresse oxidativo são dois fatores que estão intimamente relacionados e os astrócitos são células-chave em ambos os processos. Há uma sobreposição das vias de sinalização que medeiam as cascatas de eventos intracelulares, visto que a liberação de mediadores inflamatórios está associada a fatores de transcrição, como Nrf2 e NFkB, que, como mencionado anteriormente também são reguladores do estado redox. A inflamação no SNC é um fator conhecido na patogênese de diversas doenças neurodegenerativas e psiquiátricas, e ao mesmo tempo é um evento que ocorre naturalmente com o envelhecimento cerebral (Sparkman & Johnson 2008; Frank-Cannon *et al.* 2009; Jensen *et al.* 2013). O primeiro papel do astrócito na resposta imune, como falado anteriormente, é sua contribuição para a BSC vetando a passagem de moléculas grandes e polares, como anticorpos e o sistema complemento, da corrente sanguínea para o parênquima cerebral. Em condições normais, o SNC é fortemente anti-inflamatório estando principalmente sob a influência da interleucina - 10 (IL-10) e do TGF- β (Jensen

et al. 2013); citocinas pró-inflamatórias são expressas apenas em níveis basais, que são requeridos para o correto funcionamento cerebral, principalmente no que se refere a mecanismos moleculares e celulares responsáveis pelos processos de aprendizado e memória (McAfoose *et al.* 2009; Santello *et al.* 2011). Durante o processo inflamatório os astrócitos liberam uma gama de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias com o objetivo de atrair leucócitos e aumentar sua proliferação no local da inflamação. Dentre as principais citocinas pró-inflamatórias liberadas pelos astrócitos estão: TNF- α (do inglês “tumor necrosis factor α ”), interleucina - 1 β (IL-1 β), interleucina - 6 (IL-6) e interleucina - 18 (IL-18) (Jensen *et al.* 2013). Quando secretadas por astrócitos, elas estimulam a liberação de enzimas proteolíticas e prostaglandinas, a produção de mais ERO’s e também a síntese e liberação de citocinas secundárias que vão recrutar novas células gliais (astrócitos e microglia) de modo a exacerbar a resposta inflamatória (Cannon 2000).

5 – ENVELHECIMENTO E SNC

Como dito anteriormente, estresse oxidativo e resposta inflamatória estão relacionados não só entre si, mas também com a idade, tendo em vista seus níveis aumentados com o envelhecimento cerebral normal. Com esse desbalanço no equilíbrio cerebral, funções básicas dos astrócitos ficam comprometidas, afetando, portanto, toda a homeostase do SNC. O estudo de modelos de envelhecimento se torna de suma importância devido ao aumento da expectativa de vida populacional, um fenômeno mundial com significativa alteração na sociedade, e que tem como consequência uma maior incidência de doenças cerebrais, chegando a afetar um bilhão de pessoas em todo o

mundo (Hoppitt *et al.* 2011; Jeon *et al.* 2011). Ao contrário do que se acreditou por muito tempo, estudos realizados nos últimos 30 anos fornecem evidências convincentes de que o envelhecimento não é um processo determinístico e irreversível, mas sim um processo plástico, potencialmente passível à manipulação por meios disponíveis no campo da ciência (Libert & Pletcher 2007; Kenyon 2010; Jeong *et al.* 2012). A maleabilidade do processo de envelhecimento levanta a possibilidade excitante de explorar meios de retardar ou até mesmo reverter o processo de envelhecimento e rejuvenescer sistemas fisiológicos.

Essencialmente, o envelhecimento pode ser considerado como um evento sistêmico, uma vez que não ocorre de maneira isolada e direcionada, alterando funcionalmente tecidos em todo o corpo e com diferentes níveis de resistência e sensibilidade (Rando 2006; Lopez-Otin *et al.* 2013). Nesse sentido, evidências sugerem que o SNC é particularmente vulnerável aos efeitos do envelhecimento (Mattson & Magnus 2006), demonstrando uma perda gradual da capacidade de adaptação física e funcional a novas experiências advindas da idade (Mahncke *et al.* 2006). Por conseguinte, o envelhecimento no SNC resulta na diminuição da capacidade regenerativa (Rando 2006) e na manutenção deficiente das funções sinápticas e cognitivas (Morrison & Baxter 2012). Esta influência prejudicial do envelhecimento no SNC é particularmente preocupante quando se considera o seu papel na homeostase global.

6 – CULTURA DE ASTRÓCITOS

Devido ao fato de que os astrócitos são responsáveis pelas inúmeras e distintas funções já citadas, a cultura dessas células gliais é amplamente

utilizada para caracterizar propriedades bioquímicas, farmacológicas e morfológicas do SNC (Pertusa *et al.* 2007; Skytt *et al.* 2010). Culturas gliais também são adequadas para o estudo de novos tratamentos com compostos que atuam sobre os receptores de glutamato astrocitários (Gallo & Russell 1995; Cauley *et al.* 1997) ou que induzam vias neuroprotetoras em astrócitos (Girardi *et al.* 2004). Muito do conhecimento sobre a funcionalidade astrocitária foi descoberto com a utilização de cultura de células de animais neonatos, porém, as disfunções anteriormente citadas afetam o cérebro adulto. Como característica do cérebro em maturação, animais neonatos apresentam células neurais com maior capacidade plástica e menor grau de diferenciação que animais adultos, dessa forma, quando submetidas a estímulos podem responder de forma menos fidedigna do que o tecido maduro em se tratando do estudo de patologias que acometem o cérebro adulto (Skytt *et al.* 2010). Desta forma, a utilização de cultura de astrócitos de ratos adultos pode possibilitar o melhor entendimento das bases fisiopatológicas das doenças cerebrais relacionadas ao envelhecimento já que estas culturas apresentam diferenciação celular e conexões melhor estabelecidas quando comparada a cultura de animais neonatos (Souza *et al.* 2013; Bellaver *et al.* 2014).

7 – OBJETIVOS

7.1 – OBJETIVO GERAL

Avaliar alterações relacionadas ao envelhecimento cerebral em parâmetros glutamatérgicos, oxidativos e inflamatórios, bem como as vias de sinalização envolvidas, em culturas de astrócitos hipocâmpais de ratos Wistar.

7.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos deste estudo foram desenvolvidos comparando culturas de três diferentes idades, neonatos, adultos (90 dias) e envelhecidos (180 dias):

- Observar alterações no citoesqueleto astrocitário através da avaliação de GFAP e vimentina;
- Avaliar alterações de proteínas relacionadas ao metabolismo glutamatérgico: GLAST, GLT-1 e GS;
- Determinar variações na liberação dos seguintes fatores tróficos: GDNF, BDNF, S100B e TGF- β ;
- Avaliar parâmetros de estresse oxidativo: produção de ERO's, potencial de membrana mitocondrial, geração de nitritos, radical superóxido e atividade da NOX;
- Analisar alterações nas defesas antioxidantes: SOD, CAT, GPx e GSH;
- Avaliar a resposta inflamatória através da determinação de citocinas e quimiocinas liberadas por astrócitos: TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-18 e MCP-1;
- Determinar mecanismos celulares relacionados ao estresse oxidativo e resposta inflamatória: Nrf-2, HO1, NFkB e p38 MAPK.

PARTE II

Artigo a ser submetido ao periódico Neurobiology of aging

Age-dependent changes in glial functionality in hippocampal astrocytes: the putative role of NF κ B, p38, Nrf-2 and HO-1 pathways in redox homeostasis and inflammatory response.

Bruna Bellaver, Débora Guerini Souza, Diogo Onofre Souza, André Quincozes-Santos

**Age-dependent changes in glial functionality in hippocampal astrocytes:
the putative role of NFκB, p38, Nrf-2 and HO-1 pathways in redox
homeostasis and inflammatory response**

Bruna Bellaver, Débora Guerini Souza, Diogo Onofre Souza, André Quincozes-
Santos

Biochemistry Department, Graduate Program in Biology – Biochemistry,
Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

André Quincozes-Santos, Ph.D.
Departamento de Bioquímica
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Rua Ramiro Barcelos, 2600 – Anexo
Bairro Santa Cecília
90035 –003 Porto Alegre, RS, Brazil
Fax: +55 51 3308 5535; Phone: +55 51 3308 5567
E-mail: andrequincozes@ufrgs.br

Abstract

Astrocytes are dynamic cells that maintain brain homeostasis, regulating neurotransmitter systems, synaptic information processing, energy metabolism, antioxidant defenses and inflammatory response. Additionally, these cells secrete neurotrophic factors, including glia-derived neurotrophic factor (GDNF), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), S100B protein and transforming growth factor- β (TGF- β). In line with this, aging is closely associated with changes in glial functionality. Thus, this study introduces a routine protocol for hippocampal primary astrocyte cultures from newborn (NB), adult (AD) and aged (AG) Wistar rats as tool for aging studies. Although behavior alterations were not observed between AD and AG rats, significant age-dependent changes in glial responses were found. Classical cytoskeleton proteins such as glial fibrillary acidic protein (GFAP) and vimentin as well as glutamate transporters and glutamine synthetase (GS) were detected and changed their expressions with age. The GDNF, BDNF, S100B protein and TGF- β also changed in an age dependent manner. Astrocytes showed an age-dependent increase in oxidative/nitrosative stress with significant mitochondrial and NADPH oxidase (NOX) dysfunction. Furthermore, alterations related to age in superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) activities and glutathione (GSH) levels contribute to impaired redox state. Astrocytes also displayed age-dependent inflammatory response with augment of proinflammatory cytokine levels such as TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-18 and chemokine MCP-1. The putative mechanisms associated to age-dependent changes in glial functionality in hippocampal astrocyte cultures involve NF κ B, p38, Nrf-2 and HO-1 pathways. These signaling pathways are critical to

interconnect redox homeostasis and inflammatory response. These results reinforce the role of hippocampal astrocytes as target for understanding mechanisms involved in aging and age-related neurological disorders.

1. Introduction

Astrocytes are the most abundant glial cells in the mammalian central nervous system (CNS) and they have many critical functions in the physiological and pathological conditions of the brain (Belanger et al., 2011; Maragakis and Rothstein, 2006; Parpura et al., 2012). Astrocytes are dynamic cells that maintain brain homeostasis, regulating neural survival and development (Fuente-Martin et al., 2012; Hartline, 2011; Rodriguez-Arellano et al., 2015). In line with this, the pathophysiological function of astrocytes has become a primary focus in the investigation of numerous diseases, including age-related neurological disorders such as stroke, Alzheimer's and Parkinson's diseases (Rodriguez-Arellano et al., 2015).

Astrocytes regulate neurotransmitter systems, synaptic information processing (as part of the tripartite synapse), ionic homeostasis, development and maintenance of the blood-brain barrier, brain cholesterol levels, energy metabolism, antioxidant defenses and inflammatory response (Farina et al., 2007; Kettenmann and Verkhratsky, 2008; Maragakis and Rothstein, 2006; Ransom and Ransom, 2012; Wang and Bordey, 2008). They produce and release glutathione (GSH), the main antioxidant of the brain, and enzymatic antioxidant defenses, like superoxide dismutase (SOD), which in turn support neuronal activity (Halliwell, 2001; Hertz and Zielke, 2004; Pope et al., 2008). Additionally, these cells release anti- and proinflammatory cytokines in regenerative or protective processes and secrete an enormous array of neurotrophic factors, including glia-derived neurotrophic factor (GDNF), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), S100B protein and transforming growth

factor- β (TGF- β) (Donato, 2003; Maragakis and Rothstein, 2006; Markiewicz and Lukomska, 2006).

Although astrocytes have an essential role for brain functionality, it is known that they decrease their neuroprotective capacity during aging, thereby playing critical roles in age-related neurological disorders (Alarcon-Aguilar et al., 2014; Jiang and Cadenas, 2014; Rodriguez-Arellano et al., 2015). Aging, in essence, is the main risk factor for neurodegenerative diseases, being accompanied by changes in glial functions, such as redox homeostasis and inflammatory response (Jiang and Cadenas, 2014; Miller and O'Callaghan, 2005). Astrocytes are key cells in both events, since they sense and amplify inflammatory signals from microglia and/or initiate inflammatory mediators release that are closely associated to transcriptional factors, such as nuclear factor erythroid-derived 2-like 2 (Nrf-2) and nuclear factor kappa B (NF κ B), which are the master regulators of redox state (Farina et al., 2007; Gloire et al., 2006; Gorina et al., 2011; Vargas and Johnson, 2009). In this sense, Nrf-2 controls the biosynthesis of antioxidant systems like GSH and heme oxygenase 1 (HO-1) and also regulates the transcriptional activity of NF κ B, which stimulate proinflammatory cytokines release and oxidative/nitrosative species production (Vargas and Johnson, 2009; Wakabayashi et al., 2010). Furthermore, the NF κ B translocation into the nucleus requires activation of p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway (Gorina et al., 2011).

The association between oxidative stress, inflammation and aging is based on complex molecular and cellular changes that have only just begun to understand (Chung et al., 2001; Jiang and Cadenas, 2014; Rodriguez-Arellano et al., 2015). The hippocampus is one of the structures more closely related to

behavior, neurochemical and cellular alterations during aging (Miller and O'Callaghan, 2005). The present report shows that the comparison between adult (90 days old) and aged (180 days old) Wistar rats in control conditions did not present behavior alterations, although the hippocampal primary astrocytes from these animals exhibited significant age-dependent glial responses, indicating that changes in glial activity contribute to aging. Classical cytoskeleton proteins such as glial fibrillary acidic protein (GFAP), vimentin and actin as well as glutamate transporters and glutamine synthetase (GS) changed their expressions with age. This study also assessed the age-dependent neurotrophic factors secretion, redox homeostasis and inflammatory response. The results suggest age-dependent changes in glial functionality in hippocampal astrocyte cultures through NF κ B, p38, Nrf-2 and HO-1 pathways.

2. Materials and Methods

2.1. Reagents

DNase, 2'-7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA), propidium iodide, γ -glutamylhydroxamate, GSH standard, o-phthaldialdehyde, NADP/NADPH, lucigenin, superoxide anion assay kit, anti-GS and anti-vimentin, anti- β -tubulin III, peroxidase-conjugated anti-rabbit immunoglobulin (IgG) and p38 MAPK ELISA kit were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). JC-1, monoclonal anti-CD11 and ELISA kits for NF κ B p65 and MCP-1, Dulbecco's Modified Eagle's Medium/F12 (DMEM/F12) and other materials for cell cultures were purchased from Gibco/Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Polyclonal anti-

GFAP was purchased from Dako (Carpinteria, CA, USA). Monoclonal anti-GAPDH, anti-NeuN and 4',6'-diamino-2-phenylindole (DAPI) were purchased from Millipore (Billerica, MA, USA). Anti-GLAST and anti-GLT-1 were obtained from Alpha Diagnostic (San Antonio, TX, USA). Anti-HO1 antibody was purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Nrf-2 ELISA kit were purchase from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA). Alexa Fluor® 488 ($A_{\max} = 493$; $E_{\max} = 519$) or 594 ($A_{\max} = 591$; $E_{\max} = 614$)-conjugated AffiniPure antibodies were purchase from Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA, USA). Nitrocellulose membranes, and enhanced chemiluminescence kits were purchased from Amersham (Buckinghamshire, UK). GDNF and BDNF ELISA kits were purchased from Promega (Madison, WI, USA). S100B and TGF- β ELISA kits were purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). RANSOD and RANSEL were purchased from Randox (Autrim, UK). ELISA kit for TNF- α was purchased from PeproTech (Rocky Hill, NJ, USA). ELISA kits for interleukins were purchase from eBioscience (San Diego, CA, USA). All other chemicals were purchased from common commercial suppliers.

2.2. Animals

Male Wistar rats (1, 90 and 180 days old) were obtained from our breeding colony (Department of Biochemistry, UFRGS, Porto Alegre, Brazil), maintained under controlled environment (12 h light/12 h dark cycle; 22 ± 1 °C; *ad libitum* access to food and water). All animal experiments were performed in accordance with the National Institute of Health (NIH) Guide for the Care and

Use of Laboratory Animals and Brazilian Society for Neuroscience and Behavior recommendations for animal care. The experimental protocols were approved by the Federal University of Rio Grande do Sul Animal Care and Use Committee (process number 21215).

2.3. Cognitive evaluation

Wistar rats from 90 and 180 days old were submitted to training in the Morris water maze. The apparatus consisted of a circular pool (180 cm diameter, 60 cm high) filled with water (depth 30 cm; 24 ± 1 °C), placed in a room with consistently located spatial cues. An escape platform (10 cm diameter) was placed in the middle of one of the quadrants, 1.5 cm below the water surface, equidistant from the sidewall and the middle of the pool. The platform provided the only escape from the water and was located in the same quadrant every trial. Four different starting positions were equally spaced around the perimeter of the pool. On each training, all four start positions were used once in a random sequence, i.e., four training trials per day. A trial began by placing the animal in the water facing the wall of the pool at one of the starting points. If the animal failed to escape within 60 s it was gently conducted to the platform by the experimenter. The rat was allowed to stay there for 20 s. The intertribal interval was 10 min. After each trial, the rats were dried and returned to their cages at the end of the session. Animals were trained for 5 days. 24 h after the last training session, the rats were submitted to a test session. Before this session, the submerged platform was removed. The retention test consisted of placing the animals in the water for 1 min. The

number of crossings over the original position of the platform and time spent in the target quadrant compared to the opposite quadrant were measured.

2.4. Hippocampal primary astrocyte cultures from newborn, adult and aged Wistar rats

Male Wistar rats groups (1, 90 and 180 days old) had their cerebral hippocampi aseptically dissected, on the same day, and meninges removed. During the dissection, this cerebral tissue was kept in HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) containing 0.05% trypsin and 0.003% DNase and was kept at 37 °C for 8 min. The tissue was then mechanically dissociated for 7 min using a Pasteur pipette and centrifuged at 100 g for 5 min. The pellet was resuspended in a solution of HBSS containing only 0.003% DNase and again gently mechanically dissociated for 5 min with a Pasteur pipette and left for decantation for 20 min. The supernatant was collected and centrifuged for 7 min (400 g). The cells from supernatant were resuspended in DMEM/F12 [10% fetal bovine serum (FBS), 15 mM HEPES, 14.3 mM NaHCO₃, 1% fungizone and 0.04% gentamicin], plated in 6- or 24-well plates pre-coated with poly-L-lysine and cultured at 37 °C in incubator with 5% CO₂. The cells were seeded at 3–5x10⁵ cells/cm². The first medium exchange occurred 24 h after obtaining a culture. During the 1st week, the medium change occurred once every two days and, from the 2nd week on, once every four days. The cultures obtained from newborn rats, the cells reached the confluence around 2nd week. Hippocampal astrocytes from 90 and 180 days old, from the 3rd week on, the cells received medium supplemented with 20% FBS. Around the 4th to 5th week, the cells

reached the confluence and were used for the experiments. No dibutyryl cAMP was added in the culture medium.

2.5. Immunocytochemistry and actin analyses

Immunocytochemistry was performed as described previously by our group. Briefly, cell cultures were fixed with 4% paraformaldehyde for 20 min and permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS for 5 min at room temperature. After blocking overnight with 4% albumin, the cells were incubated overnight with anti-GFAP (1:400), anti-vimentin (1:800), anti-GLT-1 (1:400), anti-GLAST (1:400), anti-GS (1:10,000), anti-NeuN (1:50), anti- β -tubulin III (1:500) or anti-CD11 (1:400) at 4 °C, followed by PBS washes and incubation with a specific secondary antibody conjugated with Alexa Fluor® 488 (green staining) or 594 (red staining) for 1 h at room temperature. For all the immunostaining-negative controls, the reactions were performed by omitting the primary antibody. No reactivity was observed when the primary antibody was excluded. For actin-labeling analyses, the cells were incubated with 10 mg/ml rhodamine-labeled phalloidin in PBS for 45 min and two washes with PBS. Cell nuclei were stained with 0.2 mg/ml of 4',6'-diamino-2-phenylindole (DAPI). Astrocytes were analyzed and photographed with a Nikon microscope and TE-FM Epi-Fluorescence accessory.

2.6. Western blot analysis

Astrocytes were solubilized in SDS sample buffer, separated by SDS/PAGE, and transferred to nitrocellulose membranes, which were then incubated overnight (4 °C) with one of the following antibodies: anti-GFAP (1:1000), anti-vimentin (1:3000), anti-GLT-1 (1:200), anti-GLAST (1:2000), anti-GS (1:20,000), anti-HO1 (1:1000) and anti-GAPDH (1:3000). GAPDH was used as a loading control. Then, the membranes were washed and incubated with a peroxidase-conjugated anti-rabbit immunoglobulin (IgG) (for anti-GFAP, anti-GLT-1, anti-GLAST, anti-GS e anti-HO1) or with peroxidase-conjugated anti-mouse IgG (for anti-vimentin, anti-GAPDH) at a dilution of 1:3000 for 2 h. Chemiluminescence signals were detected in an Image Quant LAS4010 system (GE Healthcare) using an ECL kit. The results are expressed as percentages relative to hippocampal primary astrocytes from newborn Wistar rats.

2.7. GS activity

The enzymatic assay was performed as described previously (Bellaver et al., 2014). Briefly, 0.1 mL of the cell lysate, suspended in 140 mM KCl, was added to 0.1 mL of the reaction mixture containing (in mM): 10 MgCl₂, 50 L-glutamate, 100 imidazole-HCl buffer (pH 7.4), 10 2-mercaptoethanol, 50 hydroxylamine-HCl, and 10 ATP, and incubated for 15 min at 37 °C. The reaction was stopped by the addition of 0.4 mL of a solution containing (in mM): 370 ferric chloride, 670 HCl, and 200 trichloroacetic acid. After centrifugation, the absorbance of the supernatant was measured at 530 nm and compared to the absorbance generated using standard quantities of γ -glutamylhydroxamate treated with a ferric chloride reagent. The results are expressed as percentages relative to hippocampal primary astrocytes from newborn Wistar rats.

2.8. Trophic factor measurement

The GDNF, BDNF, S100B and TGF- β levels were measured in an extracellular medium, using commercial ELISA kits from Promega for GDNF and BDNF and R&D Systems for S100B and TGF- β . The results are expressed as percentages relative to hippocampal primary astrocytes from newborn Wistar rats.

2.9. Mitochondrial membrane potential– $\Delta\Psi_m$ (JC-1 assay)

To determine the $\Delta\Psi_m$, astrocytes were incubated for 30 min with JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide, 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Reers et al., 1995). Cells were then homogenized and centrifuged, washed once with HBSS, and transferred to a 96-well plate. Fluorescence was measured using an excitation wavelength of 485 nm and emission wavelengths of 540 and 590 nm. The $\Delta\Psi_m$ was calculated using the ratio of 590 nm (red fluorescent J-aggregates) to 540 nm (green monomers). The results are expressed as percentages relative to hippocampal primary astrocytes from newborn Wistar rats.

2.10. DCFH oxidation

Intracellular ROS production was detected using DCFH-DA (Souza et al., 2013). DCFH-DA was added to the medium at a concentration of 10 μM and cells were incubated for 30 min at 37 °C. Following DCFH-DA exposure, the

cells were scraped into phosphate-buffered saline with 0.2% Triton X-100. The fluorescence was measured in a plate reader (Spectra Max GEMINI XPS, Molecular Devices, USA) with excitation at 485 nm and emission at 520 nm. The results are expressed as percentages relative to hippocampal primary astrocytes from newborn Wistar rats.

2.11. Superoxide levels

Superoxide levels were determined using the superoxide anion assay kit from Sigma. The kit method is based on the oxidation of luminol by superoxide anions resulting in the formation of chemiluminescence light. The chemiluminescence measurement in lysed cells increases with superoxide formation. The control cells were arbitrarily set at 100%. The kit includes a superoxide anion producing system (xanthine/xanthine oxidase) for a positive control and the superoxide dismutase enzyme for the repression of the system, used as a negative control. The results are expressed as percentages relative to hippocampal primary astrocytes from newborn Wistar rats.

2.12. NOX activity

NADPH oxidase (NOX) activity was measured in cell lysate suspended in a sodium phosphate buffer with 140 mM KCl and protease mixture inhibitor using a modified assay (Quincozes-Santos et al., 2014). Briefly, this luminescence assay used lucigenin as the electron acceptor generated by the NADPH oxidase complex. NOX assay solution with 5 μ M of lucigenin was used and the concentration of NADPH (1 μ M to 1 mM), used as the substrate, fell

well within the linear range of the assay. The data were converted to relative light units/min/mg of protein, using a standard curve generated with xanthine/xanthine oxidase. Lucigenin activity (light units/min/mg of protein) of control cells was arbitrarily set at 100%. The results are expressed as percentages relative to hippocampal primary astrocytes from newborn Wistar rats.

2.14. Nitrite levels

NO levels were determined by measuring the amount of nitrite (a stable oxidation product of NO), as indicated by the Griess reaction (Quincozes-Santos et al., 2014). The Griess reagent was prepared by mixing equal volumes of 1% sulfanilamide in 0.5 M HCl and 0.1% N-(1-naphthyl) ethylenediamine in deionized water. Briefly, the Griess reagent was added directly to the cell culture, which was incubated in the dark for 15 min, at 22 °C. Samples were analyzed at 550 nm on a microplate spectrophotometer. Nitrite concentrations were calculated using a standard curve prepared with concentrations of sodium nitrite ranging from 0 μ M to 50 μ M. The results are expressed as percentages relative to hippocampal primary astrocytes from newborn Wistar rats.

2.15. Cellular membrane integrity

Membrane integrity was assessed by fluorescent image analysis (Nikon inverted microscope using a TE-FM Epi-Fluorescence accessory) of propidium iodide (PI) incorporation (at 7.5 mM) at 37 °C in an incubator with 5% CO₂. The

results are expressed as percentages relative to hippocampal primary astrocytes from newborn Wistar rats.

2.16. Superoxide dismutase (SOD) activity

SOD activity was determined using the RANSOD kit from Randox (Autrim, UK). The SOD activity (measured by the degree of inhibition of formazan dye formation) in lysed cells was assayed spectrophotometrically at 505 nm. The inhibition of the produced chromogen is proportional to the activity of SOD present in the sample. The results are expressed as percentages relative to hippocampal primary astrocytes from newborn Wistar rats.

2.17. Catalase (CAT) activity

CAT activity was assayed by the method described by Aebi (Aebi, 1984). The decrease absorbance at 240 nm was measured in cell lysate suspended in a reaction medium containing 20 mM H₂O₂, 0.1% Triton X-100, 10 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0, and 50 µg protein. One unit (U) of enzyme activity is defined as 1 µmol of H₂O₂ consumed per minute. The results are expressed as percentages relative to hippocampal primary astrocytes from newborn Wistar rats.

2.18. Glutathione peroxidase (GPx) activity

GPx activity was measured using the RANSEL kit from Randox (Autrim, UK). The concentration of GPx in lysed cells is assessed by measuring the

decrease in absorption at 340 nm owing to the oxidation of NADPH to NADP⁺, which occurs during the conversion of GSH to GSSG. The results are expressed as percentages relative to hippocampal primary astrocytes from newborn Wistar rats.

2.19. Glutathione (GSH) levels

GSH levels were assessed as described previously (Bellaver et al., 2014). Cell lysate suspended in a sodium phosphate buffer with 140 mM KCl was diluted with a 100 mM sodium phosphate buffer (pH 8.0) containing 5 mM EDTA, and the protein was precipitated with 1.7% meta-phosphoric acid. The supernatant was assayed with o-phthaldialdehyde (at a concentration of 1 mg/mL methanol) at 22 °C for 15 min. Fluorescence was measured using excitation and emission wavelengths of 350 nm and 420 nm, respectively. A calibration curve was performed with standard GSH solutions at concentrations ranging from 0 µM to 500 µM. The results are expressed as percentages relative to hippocampal primary astrocytes from newborn Wistar rats.

2.20. Inflammatory response measurement

The TNF- α levels were carried out in an extracellular medium, using a rat TNF- α ELISA from Peprtech. The levels of interleukins were carried out in an extracellular medium, using ELISA kits for IL-1 β , IL-6, IL-10 and IL-18 from eBioscience as well as MCP-1 levels by ELISA kit from Invitrogen. The results

are expressed as percentages relative to hippocampal primary astrocytes from newborn Wistar rats.

2.21. p38 MAPK levels measurement

p38 MAPK levels were performed using a rat p38 MAPK ELISA from Sigma (USA). The levels were evaluated in cell lysate suspended in a specific buffer from ELISA kit. The results are expressed as percentages relative to hippocampal primary astrocytes from newborn Wistar rats.

2.22. NFkB levels

The levels of NFkB p65 in the nuclear fraction, which had been isolated from lysed cells with Igepal CA-630 and centrifugation (following manufacturer's instructions), were measured using an ELISA commercial kit from Invitrogen. The results are expressed as percentages relative to hippocampal primary astrocytes from newborn Wistar rats.

2.23. Nrf-2 levels

The levels of Nrf-2-ARE binding activity in the nuclear fraction, which had been isolated from Cayman's nuclear extraction kit and centrifugation (following manufacturer's instructions), were measured using an ELISA commercial kit from Cayman Chemical. The results are expressed as percentages relative to hippocampal primary astrocytes from newborn Wistar rats.

2.24. Protein determination

Protein content was measured using Lowry's method with bovine serum albumin as a standard (Lowry et al., 1951).

2.25. Statistical analyses

All data are presented as mean \pm S.E.M. Comparisons between hippocampal astrocytes from newborn, adult and aged Wistar rats were analyzed statistically by one-way analysis of variance (ANOVA). Tukey's test was employed for pos-hoc analysis. P-values < 0.05 were considered significant. a indicates significant differences from newborn astrocytes and b indicates significant differences from adult astrocytes.

3. Results

3.1. Behavioral effects

The Morris water maze was used to evaluate reference memory, which is intimately associated to hippocampus, in adult (AD) and aged (AG) Wistar rats. Time to find the platform did not decline (Fig. 1A) as well as time spent in the target quadrant (Fig. 1B). The number of crossing over the platform location did not also alter between AD and AG rats (Fig. 1C).

3.2. Astrocytes from adult and aged rats presented classical cytoskeleton proteins

Classically, cultured rat astrocytes show a polygonal to fusiform and flat morphology. In line with recent data (Bellaver et al., 2014), hippocampal primary astrocytes from newborn (NB), AD and AG Wistar rats presented this specific cell morphology until confluence (Fig. 2A). To simplify terminology, from this point on, hippocampal astrocytes derived from newborn Wistar rats will be abbreviated as NB, whereas astrocytes from adult and aged Wistar rats will be termed as AD and AG, respectively.

Additionally, the purity of the astrocyte cultures was assessed by cytoskeletal protein GFAP. Immunocytochemical analysis showed an intense cytoplasmic immunolabeling for GFAP (98% GFAP positive, Fig. 2B), it is consistent with our previous reports (Bellaver et al., 2014; Souza et al., 2013). Astrocyte cultures also presented approximately 2% of the cells stained positive for OX-42 (CD11b/c, a specific microglial protein), and neither β -tubulin III nor NeuN were detected (data not shown). Moreover, in primary cultured astrocytes, vimentin is coexpressed with GFAP. Thus, Fig. 2C displays that vimentin staining exhibited a meshwork extending across the cytoplasm. However, the immunoblotting showed a decrease in the expression of GFAP and vimentin in astrocytes from AD and AG rats compared to NB control conditions (Fig. 2D and E).

Actin cytoskeleton is the major determinant of the cell morphology (Guasch et al., 2003) and astrocytes from NB, AD and AG rats presented parallel arrangement stress fiber organization of actin filaments (Fig. 2F).

Furthermore, already at 7 days *in vitro*, primary cultures from NB, AD and AG rats were indeed astrocytes, because presented staining for GFAP and stress fibers of actin (Fig. 2G).

3.3. Age-related changes in glutamate transporters and glutamine synthetase in astrocytes

Astrocytes are responsible for clearing extracellular glutamate, due to their high-affinity glutamate transporters: GLAST and GLT-1 (Benarroch, 2010). Thus, the immunocytochemistry of astrocytes from NB, AD and AG rats showed a high immunoreactivity for GLAST and GLT-1 (Fig. 3A). In addition, astrocytes from AD and AG displayed an age-dependent decrease for GLAST expression levels (Fig. 3B). The expression of GLT-1 also presented a reduction in astrocytes from AD rats, however, there was an increase in the GLT-1 expression in AG astrocytes (Fig. 3B).

Once taken up by astrocytes, glutamate is converted into glutamine by GS, which is constitutively expressed by astrocytes. Fig. 3A shows the immunofluorescence of GS for astrocytes from NB, AD and AG rats. The western blotting analysis indicated that GS expression decreased with age in astrocyte cultures (Fig. 3B). As expected GS activity also decreased with age (25% and 40% decreases in astrocytes from AD and AG, respectively, compared to NB, Fig. 3C).

3.4. Changes in trophic factors in astrocytes with age

Astrocytes can play a protective role by releasing trophic factors, including GDNF, BDNF, S100B protein and TGF- β (Markiewicz and Lukomska, 2006). In this sense, GDNF and BDNF levels decreased with age in astrocytes from AD and AG rats when compared to NB (Fig. 4A, B, respectively). Opposite trends were observed for S100B and TGF- β levels, which increased in an age dependent manner (Fig. 4C, D, respectively).

3.5. Oxidative stress increased with age in astrocytes

Astrocytes aged *in vitro* as well astrocytes derived from adult rats are known to be more susceptible to redox homeostasis disruption (Gottfried et al., 2002; Klamt et al., 2002; Souza et al., 2013). Mitochondria are the primary site of reactive oxygen species (ROS) production and mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) dysfunction is closely associated to aging. In this sense, Fig. 5A shows the age-dependent decrease in $\Delta\Psi_m$ dysfunction (15% and 25% decreases in astrocytes from AD and AG rats, respectively). To further, as consequence of mitochondrial dysfunction, the intracellular ROS production was measured and was observed an increase in AD (25%) and AG (35%) astrocytes compared to NB in an age dependent manner (Fig. 5B).

Moreover, increasing evidence suggests that superoxide anion radicals produced via superoxide-generating enzyme, NADPH oxidase (NOX), might play a role in ROS production (Brennan et al., 2009). Thus, the substantial increase with age (AD: 30% and AG: 40%) in superoxide levels (Fig. 5C) and

NOX activity (AD: 45% and AG: 60%, Fig. 5D) were observed in astrocytes. The nitrosative stress was measured as nitrite levels in the medium in basal conditions also increased with aging (AD: 20% and AG: 25%, compared to NB astrocytes, Fig. 5E). Although prominent changes in redox homeostasis were observed with aging, there was not change in cellular membrane integrity in AD and AG astrocytes, measured by PI incorporation (Fig. 5F).

3.6. Changes in antioxidant enzymatic and non-enzymatic defenses in astrocytes

Astrocytes through GSH content may confer protection against age-related neurological diseases (Lee et al., 2010). Additionally, astrocytes have the main enzymatic defenses SOD, CAT and GPx. In line with this, the SOD and CAT activities presented an age-dependent decrease in astrocytes from AD and AG rats compared to NB condition (Fig. 6A, B, respectively). As shown in Fig. 6C, AD and AG astrocytes increased GPx activity approximately 20 and 30% compared to NB condition. Elevation of GPx activity may produce reduction in GSH content. Thus, GSH levels decreased with age, with 25% decrease in AD and 45% decrease in AG compared with those astrocytes from NB rats (Fig. 6D).

3.7. Age-dependent inflammatory response in astrocytes

Astrocytes actively participate in inflammatory response releasing chemokine and anti- and proinflammatory cytokines (Farina et al., 2007). To

characterize the inflammatory response in astrocytes from AD and AG rats, classical anti- and proinflammatory cytokines were measured. As shown in Fig. 7, levels of TNF- α (7A), IL-1 β (7B), IL-6 (7C), IL-18 (7D) were significantly enhanced in an age-dependent manner in astrocytes. The anti-inflammatory IL-10 levels did not alter in different astrocyte-age cultures (Fig. 7E). Compared to NB astrocytes, the levels of chemokine MCP-1 were increased 20% and 34% from AD and AG astrocytes respectively (Fig. 7F).

3.8. Age-dependent mechanisms associated to oxidative/nitrosative stress and inflammation in astrocytes

MAPK pathway is associated to oxidative/nitrosative stress and inflammatory response and p38 MAPK controls the transcriptional activity of NF κ B (Gorina et al., 2011). In line with this, p38 MAPK levels were 1.5 fold higher in AD and 2.2 fold higher in AG astrocytes compared to NB control values (Fig. 8A). Furthermore, constitutive p65 NF κ B levels in the nucleus of astrocytes increased with age, with 40% increase in AD and 65% increase in AG compared to NB (Fig. 8B).

As shown in Fig. 8C, the transcription factor Nrf-2, an upstream signal of NF κ B, was measured in the nucleus and decreased levels were observed in an age-dependent manner. Nrf-2 also regulates HO-1, which may mediate neuroprotection against stressful conditions. The immunoblotting studies for HO-1 indicated a reduction expression levels only in AG astrocytes (Fig. 8D).

4. Discussion

Brain aging is accompanied by changes in astrocyte functionality, strongly associated with oxidative stress and inflammatory response (Jiang and Cadenas, 2014; Miller and O'Callaghan, 2005). Aging involves a complex set of reciprocal interactions between neurons and glia, where both cells lose their normal activities (Miller and O'Callaghan, 2005). Concerning to astrocytes, they are in close proximity to neurons and synapses, so they directly affect the brain functions (Markiewicz and Lukomska, 2006). This study introduces a routine protocol for hippocampal primary astrocyte cultures as tool for aging studies. Age-dependent alterations in astrocyte functionality were evidenced by changes in redox homeostasis, inflammatory response and signaling pathways. Interestingly, there were no cognitive deficits between AD and AG rats. However, significant modifications in the cellular, molecular and neurochemical parameters were observed in AD and AG astrocytes compared to NB astrocytes.

The decrease in synaptic activity occurs by age 60 and arises without indication of neurodegenerative disorders. Concurrently with synapse declines there is glial activation or glial degeneration/atrophy (Rodriguez et al., 2014). Here, classical astrocyte markers were observed and their expressions changed with age. Astrocytic GFAP expression can increase during aging in primary astrocyte cultures as consequence of glial activation (Rodriguez et al., 2014). Moreover, there is not a consensus about an increase or decrease in GFAP positive astrocytes for primary cultures (Desclaux et al., 2009; Menet et al., 2001; Rodriguez-Arellano et al., 2015). Thus, age-dependent decrease in

GFAP expression can also reflect astroglial degeneration, which has been detected at the early stages of age-related neurodegenerative diseases (Rodriguez et al., 2014; Rodriguez-Arellano et al., 2015). Thus, AD and AG hippocampal astrocyte cultures described here showed less GFAP than NB astrocytes. Vimentin expression decreases with age, being progressively replaced by GFAP (Menet et al., 2001; Pertusa et al., 2007). However, astrocyte cultures coexpressed vimentin and GFAP (Pertusa et al., 2007; Souza et al., 2013). AD and AG astrocytes showed a decreased levels of vimentin expression, attesting our culture model for study aging. Additionally, GFAP and vimentin appear to be involved in cell shape maintenance, CNS cytoarchitecture, mechanical stability and synaptic function and these properties are strongly affected with age (Menet et al., 2001). Regarding to actin cytoskeleton network, AD and AG astrocytes presented classical arrangement stress fiber organization of actin since 7 days *in vitro* up to confluence (~30 days *in vitro*, Fig. 2E, F). Actin may have important implications on various critical astrocyte functions, such as protein trafficking, calcium signaling, ionic homeostasis and glutamate transport (Sergeeva et al., 2000; Souza et al., 2013).

Astrocytes perform the majority of glutamate uptake in the brain through the glutamate transporters GLAST and GLT-1, which are expressed almost exclusively in astrocytes (Danbolt, 2001). However, expression patterns vary during development with GLAST expression predominating at early stages and progressively more GLT-1 expression observed with maturity (Anderson and Swanson, 2000). The pathophysiology of age-related neurological disorders involves selective alterations in glutamate transporters expression and

significant decrease in GLT-1 content was observed in Alzheimer's disease *in vivo* and *in vitro* models (Schallier et al., 2011). In line with this, our hippocampal primary astrocyte cultures provide a means of assessing these influences.

Astrocytes also metabolized glutamate to glutamine via GS. In the CNS, GS is an enzyme expressed only in astrocytes and it is also essential for maintaining glutamate-glutamine cycle for glutamate/GABA-based neurotransmission (Rodriguez-Arellano et al., 2015). The age-dependent decrease in the GS expression and activity may affect both excitatory and inhibitory neurotransmission (Rodriguez-Arellano et al., 2015). Additionally, GS activity is very sensitive to oxidative and nitrosative stress, which increased with aging (Rodriguez-Arellano et al., 2015). Moreover, oxidative metabolism in aged astrocytes may limit the ability of astrocytes to supply neurons with metabolic substrates and impairment in GS directly contributes for this condition (Jiang and Cadenas, 2014).

Trophic factors secreted by astrocytes are essential for the proliferation, survival and maturation of neural cells (Markiewicz and Lukomska, 2006). Astrocytes may influence brain development via trophic factors release and adult astrocytes from the hippocampus are specific cells that can promote neurogenesis. In this sense GDNF, BDNF, S100B and TGF- β can play protective, reparative or biomarker role when secreted by astrocytes. Other studies have found that GDNF and BDNF decrease with age and this reduction may be associated with pathophysiology of neurodegeneration (Markiewicz and Lukomska, 2006). Regarding to GDNF, the increase in its basal levels protect neurons from metabolic and excitotoxic insults (Davila et al., 2013). Moreover,

BDNF is an essential survival factor for oligodendrocytes and neurons, and the reduction in its levels may lead to demyelination, contributing to neurodegenerative process. Additionally, the expressions of BDNF and GDNF in astrocytes are modulated by HO-1 (Hung et al., 2010), which operates as a fundamental defensive mechanism for cells exposed to an oxidant/inflammatory challenge (Sakata et al., 2010). Supporting this data, in our hippocampal astrocytes its expression reduced with age (Fig. 8D, see discussion below).

The S100B protein exerts both intracellular and extracellular functions. Indeed, intracellular S100B acts as a stimulator of cell proliferation, migration and differentiation during brain development (Donato, 2003). As an extracellular factor S100B may be a biomarker for Alzheimer's disease and neuropsychiatric disorders (Goncalves et al., 2008). Nevertheless, in astrocyte cultures, S100B is decreased by high glucose and high glutamate concentrations (Nardin et al., 2007). Additionally, GDNF and BDNF are able to increase S100B levels and HO-1 may be involved in its mechanism of release. These observations reinforce our findings that showed an age-dependent increase in S100B secretion in basal conditions from hippocampal astrocytes. Both S100B and TGF- β have been considered cytokines. In this sense, TGF- β may mediate initiation and regulation of CNS immune responses and also may control neural proliferation (Teeling and Perry, 2009). This mediator may have a role in neuroprotection and also participates in glial scar. Its increase associated to aging may accelerate neurological disorders.

Classically, oxidative stress is a major cause of brain aging (Miller and O'Callaghan, 2005). The free radical hypothesis of aging has gained attention because it serves as a common feature associated with excitotoxicity and

inflammation, processes linked with aging and neurodegenerative diseases. Mitochondria and NOX are the primary sites of ROS production in the CNS, and there is increasing evidence supporting the association between mitochondrial dysfunction/NOX and aging (Brennan et al., 2009). Moreover superoxide generated by NOX activation can lead to severe oxidative damage and neural death (Brennan et al., 2009; Suh et al., 2008a; Suh et al., 2008b). Furthermore, elevated nitrite levels may predict mitochondrial damage and nitrite derived from astrocytes resulted in glia-induced neuronal death (Bal-Price and Brown, 2001; Esposito et al., 2008; Jiang and Cadenas, 2014). This study showed that nitrite released from astrocytes as well as superoxide production increased substantially with age, without causing loss of cellular membrane integrity. Our data corroborated with Harman free radicals theory of aging, which postulates that the decrease in the biochemical and physiological functions correlated to aging are because of an increase in oxidative damage (Harman, 2003).

Conversely, the oxidative damage during aging may be related to a decrease in antioxidant and repair systems. In this sense, enzymes such as SOD, CAT and GPx, can determine the clearance of free radicals (Droge, 2002). The age-dependent decrease in SOD and CAT activities observed in hippocampal astrocytes may induce an overproduction of superoxide and H₂O₂, molecules that cause severe cellular injury, suggesting senile animals are more susceptible to oxidative damage (Alarcon-Aguilar et al., 2014; Droge, 2002; Jiang and Cadenas, 2014). In addition, the increase in GPx activity may compensate for the increase in endogenous H₂O₂ and decreased levels of GSH. Moreover, SOD from astrocytes is hypothesized to protect GSH by reducing the production of superoxide (Pope et al., 2008). The decrease in

cellular levels of GSH is directly associated with aging and age-related neurodegeneration. In particular, low levels of GSH are the earliest reported biochemical indicator of nigrostriatal degeneration in Parkinson's disease (Lee et al., 2005).

GSH is an important link between oxidative stress, excitotoxicity and inflammation, typical processes found in aging. Concerning to excitotoxicity, the astrocytic glutamate transporters are vulnerable to the action of biological oxidants, and the decrease in GSH content strongly contributes for this condition (Trotti et al., 1998). Moreover, the depletion of GSH induces excessive inflammatory response in age-related brain diseases (Lee et al., 2005). ROS production also plays a critical role in inflammatory response, increasing TNF- α levels. TNF- α induces astrocytes activation and potentiates NO production (Tanabe et al., 2011). TNF- α is the first signal to enhance proinflammatory cytokines like IL-1 β , which act since acute inflammatory response and both proinflammatory cytokines are essential for the production and release of IL-6 (de Rivero Vaccari et al., 2014). Furthermore, IL-18 (a member of IL-1 superfamily) induces inflammatory processes and is strictly associated to neurodegenerative diseases (Bossu et al., 2010). It has been shown that the levels of TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-18 increase in cerebral cortex and hippocampus during aging (Xie et al., 2003). Moreover, the anti-inflammatory effect of IL-10 is related to inhibition of TNF- α secretion and we did not observed modification in IL-10 levels in hippocampal astrocytes (Tukhovskaya et al., 2014). IL-10 is also capable to exert rapid neuroprotection through delayed NF κ B activation (Xie et al., 2003). This pathway was found to account for increased chemokine MCP-1 that is a crucial regulator of

inflammatory neurotoxicity in brain aging (Kerschensteiner et al., 2009). MCP-1 likewise activates the p38 MAPK pathway in CNS.

Characteristically, NFκB is considered the major inflammatory mediator in the CNS, regulating the release of pro-inflammatory cytokines, and consequently, neuroinflammatory disorders. Both NFκB and cytokines showed an age-dependent increase in our hippocampal astrocytes. There is ample evidence that NFκB increase with aging and the most determining signal for this activation is the elevation of NFκB p65 levels in the nucleus (Jiang and Cadenas, 2014; Miller and O'Callaghan, 2005). Moreover, NFκB activation controls the redox homeostasis and may be a link between inflammatory response and oxidative/nitrosative stress. p38 MAPK regulates NFκB translocation and may be an early event for this activation (Gorina et al., 2011). In this sense, NFκB and p38 MAPK can be implicated in oxidative stress mediated inflammatory response including those occurring in the CNS.

Nrf-2 is known to activate the cellular antioxidant defense system, like GSH, and therefore, mediate neuroprotection (Johnson et al., 2008). Data from Nrf-2 indicate that reduced translocation to the nucleus may be a primary response to change in redox homeostasis and inflammation (Motohashi and Yamamoto, 2004). Our findings corroborated with most of the reports where Nrf-2 transcriptional activity decreases with age. Nrf-2 regulates HO-1 expression, a fundamental defense mechanism for cells exposed to oxidant challenges (Wakabayashi et al., 2010). HO-1 also counteracts NO production by inhibiting nitric oxide synthase activity (Wakabayashi et al., 2010). Another important regulation of Nrf-2 and HO-1 pathways is the control of NFκB. In line with this, the age-related changes in oxidative stress and inflammatory

response in hippocampal astrocytes from adult and aged Wistar rats may be explained by alterations in NFκB, p38, Nrf-2 and HO-1 pathways. Thus, these signaling are critical for aging processes and neurodegenerative disorders.

It is currently that astrocytes have a significant role in the brain aging. Therefore, the culture model described in this report elucidates biochemical, physiological and molecular properties of the hippocampal astrocytes from adult and aged rats. In line with this, our results showed that age-dependent changes in the astrocytes functionality associated to glial markers, glutamate metabolism, trophic factors, mitochondrial function, oxidative/nitrosative stress and inflammatory response are interconnect probably through NFκB, p38, Nrf-2 and HO-1 pathways. Taken together, our findings reinforce the role of hippocampal astrocytes from adult and aged Wistar rats as target for understanding mechanisms involved in aging and age-related neurological disorders as well as submit Wistar rats to *in vivo* experimental models of neurotoxicity and neuroprotection with subsequent perform of hippocampal astrocyte cultures.

Acknowledgements

This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) – IBN Net (Instituto Brasileiro de Neurociências) 01.06.0842-00, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS) and Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Excitotoxicidade e Neuroproteção (INCTEN/CNPq).

References

- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105, 121-126.
- Alarcon-Aguilar, A., Luna-Lopez, A., Ventura-Gallegos, J.L., Lazzarini, R., Galvan-Arzate, S., Gonzalez-Puertos, V.Y., Moran, J., Santamaria, A., Konigsberg, M., 2014. Primary cultured astrocytes from old rats are capable to activate the Nrf2 response against MPP+ toxicity after tBHQ pretreatment. *Neurobiol Aging* 35, 1901-1912.
- Anderson, C.M., Swanson, R.A., 2000. Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia* 32, 1-14.
- Bal-Price, A., Brown, G.C., 2001. Inflammatory neurodegeneration mediated by nitric oxide from activated glia-inhibiting neuronal respiration, causing glutamate release and excitotoxicity. *J Neurosci* 21, 6480-6491.
- Belanger, M., Allaman, I., Magistretti, P.J., 2011. Brain energy metabolism: focus on astrocyte-neuron metabolic cooperation. *Cell Metab* 14, 724-738.
- Bellaver, B., Souza, D.G., Souza, D.O., Quincozes-Santos, A., 2014. Resveratrol increases antioxidant defenses and decreases proinflammatory cytokines in hippocampal astrocyte cultures from newborn, adult and aged Wistar rats. *Toxicol In Vitro* 28, 479-484.
- Benarroch, E.E., 2010. Glutamate transporters: diversity, function, and involvement in neurologic disease. *Neurology* 74, 259-264.
- Bossu, P., Ciaramella, A., Salani, F., Vanni, D., Palladino, I., Caltagirone, C., Scapigliati, G., 2010. Interleukin-18, from neuroinflammation to Alzheimer's disease. *Curr Pharm Des* 16, 4213-4224.
- Brennan, A.M., Suh, S.W., Won, S.J., Narasimhan, P., Kauppinen, T.M., Lee, H., Edling, Y., Chan, P.H., Swanson, R.A., 2009. NADPH oxidase is the

primary source of superoxide induced by NMDA receptor activation. *Nat Neurosci* 12, 857-863.

Chung, H.Y., Kim, H.J., Kim, J.W., Yu, B.P., 2001. The inflammation hypothesis of aging: molecular modulation by calorie restriction. *Ann N Y Acad Sci* 928, 327-335.

Danbolt, N.C., 2001. Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* 65, 1-105.

Davila, D., Thibault, K., Fiacco, T.A., Agulhon, C., 2013. Recent molecular approaches to understanding astrocyte function in vivo. *Front Cell Neurosci* 7, 272.

de Rivero Vaccari, J.P., Dietrich, W.D., Keane, R.W., 2014. Activation and regulation of cellular inflammasomes: gaps in our knowledge for central nervous system injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 34, 369-375.

Desclaux, M., Teigell, M., Amar, L., Vogel, R., Gimenez, Y.R.M., Privat, A., Mallet, J., 2009. A novel and efficient gene transfer strategy reduces glial reactivity and improves neuronal survival and axonal growth in vitro. *PLoS One* 4, e6227.

Donato, R., 2003. Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. *Microsc Res Tech* 60, 540-551.

Droge, W., 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82, 47-95.

Esposito, E., Iacono, A., Muia, C., Crisafulli, C., Mattace Raso, G., Bramanti, P., Meli, R., Cuzzocrea, S., 2008. Signal transduction pathways involved in protective effects of melatonin in C6 glioma cells. *J Pineal Res* 44, 78-87.

Farina, C., Aloisi, F., Meinl, E., 2007. Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends Immunol* 28, 138-145.

Fuente-Martin, E., Garcia-Caceres, C., Granado, M., de Ceballos, M.L., Sanchez-Garrido, M.A., Sarman, B., Liu, Z.W., Dietrich, M.O., Tena-Sempere, M., Argente-Arizon, P., Diaz, F., Argente, J., Horvath, T.L., Chowen, J.A., 2012. Leptin regulates glutamate and glucose transporters in hypothalamic astrocytes. *J Clin Invest* 122, 3900-3913.

Gloire, G., Legrand-Poels, S., Piette, J., 2006. NF-kappaB activation by reactive oxygen species: fifteen years later. *Biochem Pharmacol* 72, 1493-1505.

Goncalves, C.A., Concli Leite, M., Nardin, P., 2008. Biological and methodological features of the measurement of S100B, a putative marker of brain injury. *Clin Biochem* 41, 755-763.

Gorina, R., Font-Nieves, M., Marquez-Kisinousky, L., Santalucia, T., Planas, A.M., 2011. Astrocyte TLR4 activation induces a proinflammatory environment through the interplay between MyD88-dependent NFkappaB signaling, MAPK, and Jak1/Stat1 pathways. *Glia* 59, 242-255.

Gottfried, C., Tramontina, F., Goncalves, D., Goncalves, C.A., Moriguchi, E., Dias, R.D., Wofchuk, S.T., Souza, D.O., 2002. Glutamate uptake in cultured astrocytes depends on age: a study about the effect of guanosine and the sensitivity to oxidative stress induced by H₂O₂. *Mech Ageing Dev* 123, 1333-1340.

Guasch, R.M., Tomas, M., Minambres, R., Valles, S., Renau-Piqueras, J., Guerri, C., 2003. RhoA and lysophosphatidic acid are involved in the actin cytoskeleton reorganization of astrocytes exposed to ethanol. *J Neurosci Res* 72, 487-502.

Halliwell, B., 2001. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging* 18, 685-716.

Harman, D., 2003. The free radical theory of aging. *Antioxid Redox Signal* 5, 557-561.

Hartline, D.K., 2011. The evolutionary origins of glia. *Glia* 59, 1215-1236.

Hertz, L., Zielke, H.R., 2004. Astrocytic control of glutamatergic activity: astrocytes as stars of the show. *Trends Neurosci* 27, 735-743.

Hung, S.Y., Liou, H.C., Fu, W.M., 2010. The mechanism of heme oxygenase-1 action involved in the enhancement of neurotrophic factor expression. *Neuropharmacology* 58, 321-329.

Jiang, T., Cadenas, E., 2014. Astrocytic metabolic and inflammatory changes as a function of age. *Aging Cell* 13, 1059-1067.

Johnson, J.A., Johnson, D.A., Kraft, A.D., Calkins, M.J., Jakel, R.J., Vargas, M.R., Chen, P.C., 2008. The Nrf2-ARE pathway: an indicator and modulator of oxidative stress in neurodegeneration. *Ann N Y Acad Sci* 1147, 61-69.

Kerschensteiner, M., Meinel, E., Hohlfeld, R., 2009. Neuro-immune crosstalk in CNS diseases. *Neuroscience* 158, 1122-1132.

Kettenmann, H., Verkhratsky, A., 2008. Neuroglia: the 150 years after. *Trends Neurosci* 31, 653-659.

Klamt, F., Gottfried, C., Tramontina, F., Dal-Pizzol, F., Da Frola, M.L., Jr., Moreira, J.C., Dias, R.D., Moriguchi, E., Wofchuk, S., Souza, D.O., 2002. Time-related increase in mitochondrial superoxide production, biomolecule damage

and antioxidant enzyme activities in cortical astrocyte cultures. *Neuroreport* 13, 1515-1518.

Lee, G., Huang, Y., Washington, J.M., Briggs, N.W., Zuo, Z., 2005. Carbamazepine enhances the activity of glutamate transporter type 3 via phosphatidylinositol 3-kinase. *Epilepsy Res* 66, 145-153.

Lee, M., Cho, T., Jantaratnotai, N., Wang, Y.T., McGeer, E., McGeer, P.L., 2010. Depletion of GSH in glial cells induces neurotoxicity: relevance to aging and degenerative neurological diseases. *FASEB J* 24, 2533-2545.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-275.

Maragakis, N.J., Rothstein, J.D., 2006. Mechanisms of Disease: astrocytes in neurodegenerative disease. *Nat Clin Pract Neurol* 2, 679-689.

Markiewicz, I., Lukomska, B., 2006. The role of astrocytes in the physiology and pathology of the central nervous system. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 66, 343-358.

Menet, V., Gimenez y Ribotta, M., Chauvet, N., Drian, M.J., Lannoy, J., Colucci-Guyon, E., Privat, A., 2001. Inactivation of the glial fibrillary acidic protein gene, but not that of vimentin, improves neuronal survival and neurite growth by modifying adhesion molecule expression. *J Neurosci* 21, 6147-6158.

Miller, D.B., O'Callaghan, J.P., 2005. Aging, stress and the hippocampus. *Ageing Res Rev* 4, 123-140.

Motohashi, H., Yamamoto, M., 2004. Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism. *Trends Mol Med* 10, 549-557.

Nardin, P., Tramontina, F., Leite, M.C., Tramontina, A.C., Quincozes-Santos, A., de Almeida, L.M., Battastini, A.M., Gottfried, C., Goncalves, C.A.,

2007. S100B content and secretion decrease in astrocytes cultured in high-glucose medium. *Neurochem Int* 50, 774-782.

Parpura, V., Heneka, M.T., Montana, V., Oliet, S.H., Schousboe, A., Haydon, P.G., Stout, R.F., Jr., Spray, D.C., Reichenbach, A., Pannicke, T., Pekny, M., Pekna, M., Zorec, R., Verkhratsky, A., 2012. Glial cells in (patho)physiology. *J Neurochem* 121, 4-27.

Pertusa, M., Garcia-Matas, S., Rodriguez-Farre, E., Sanfeliu, C., Cristofol, R., 2007. Astrocytes aged in vitro show a decreased neuroprotective capacity. *J Neurochem* 101, 794-805.

Pope, S.A., Milton, R., Heales, S.J., 2008. Astrocytes protect against copper-catalysed loss of extracellular glutathione. *Neurochem Res* 33, 1410-1418.

Quincozes-Santos, A., Bobermin, L.D., Souza, D.G., Bellaver, B., Goncalves, C.A., Souza, D.O., 2014. Guanosine protects C6 astroglial cells against azide-induced oxidative damage: a putative role of heme oxygenase 1. *J Neurochem* 130, 61-74.

Ransom, B.R., Ransom, C.B., 2012. Astrocytes: multitalented stars of the central nervous system. *Methods Mol Biol* 814, 3-7.

Reers, M., Smiley, S.T., Mottola-Hartshorn, C., Chen, A., Lin, M., Chen, L.B., 1995. Mitochondrial membrane potential monitored by JC-1 dye. *Methods Enzymol* 260, 406-417.

Rodriguez, J.J., Yeh, C.Y., Terzieva, S., Olabarria, M., Kulijewicz-Nawrot, M., Verkhratsky, A., 2014. Complex and region-specific changes in astroglial markers in the aging brain. *Neurobiol Aging* 35, 15-23.

Rodriguez-Arellano, J.J., Parpura, V., Zorec, R., Verkhratsky, A., 2015. Astrocytes in physiological aging and Alzheimer's disease. *Neuroscience*.

Sakata, Y., Zhuang, H., Kwansa, H., Koehler, R.C., Dore, S., 2010. Resveratrol protects against experimental stroke: putative neuroprotective role of heme oxygenase 1. *Exp Neurol* 224, 325-329.

Schallier, A., Smolders, I., Van Dam, D., Loyens, E., De Deyn, P.P., Michotte, A., Michotte, Y., Massie, A., 2011. Region- and age-specific changes in glutamate transport in the AbetaPP23 mouse model for Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 24, 287-300.

Sergeeva, M., Ubl, J.J., Reiser, G., 2000. Disruption of actin cytoskeleton in cultured rat astrocytes suppresses ATP- and bradykinin-induced $[Ca^{2+}]_i$ oscillations by reducing the coupling efficiency between Ca^{2+} release, capacitative Ca^{2+} entry, and store refilling. *Neuroscience* 97, 765-769.

Souza, D.G., Bellaver, B., Souza, D.O., Quincozes-Santos, A., 2013. Characterization of adult rat astrocyte cultures. *PLoS One* 8, e60282.

Suh, S.W., Hamby, A.M., Gum, E.T., Shin, B.S., Won, S.J., Sheline, C.T., Chan, P.H., Swanson, R.A., 2008a. Sequential release of nitric oxide, zinc, and superoxide in hypoglycemic neuronal death. *J Cereb Blood Flow Metab* 28, 1697-1706.

Suh, S.W., Shin, B.S., Ma, H., Van Hoecke, M., Brennan, A.M., Yenari, M.A., Swanson, R.A., 2008b. Glucose and NADPH oxidase drive neuronal superoxide formation in stroke. *Ann Neurol* 64, 654-663.

Tanabe, K., Kozawa, O., Iida, H., 2011. Midazolam suppresses interleukin-1beta-induced interleukin-6 release from rat glial cells. *J Neuroinflammation* 8, 68.

Teeling, J.L., Perry, V.H., 2009. Systemic infection and inflammation in acute CNS injury and chronic neurodegeneration: underlying mechanisms. *Neuroscience* 158, 1062-1073.

Trotti, D., Danbolt, N.C., Volterra, A., 1998. Glutamate transporters are oxidant-vulnerable: a molecular link between oxidative and excitotoxic neurodegeneration? *Trends Pharmacol Sci* 19, 328-334.

Tukhovskaya, E.A., Turovsky, E.A., Turovskaya, M.V., Levin, S.G., Murashev, A.N., Zinchenko, V.P., Godukhin, O.V., 2014. Anti-inflammatory cytokine interleukin-10 increases resistance to brain ischemia through modulation of ischemia-induced intracellular Ca²⁺(+) response. *Neurosci Lett* 571, 55-60.

Vargas, M.R., Johnson, J.A., 2009. The Nrf2-ARE cytoprotective pathway in astrocytes. *Expert Rev Mol Med* 11, e17.

Wakabayashi, N., Slocum, S.L., Skoko, J.J., Shin, S., Kensler, T.W., 2010. When NRF2 talks, who's listening? *Antioxid Redox Signal* 13, 1649-1663.

Wang, D.D., Bordey, A., 2008. The astrocyte odyssey. *Prog Neurobiol* 86, 342-367.

Xie, Z., Morgan, T.E., Rozovsky, I., Finch, C.E., 2003. Aging and glial responses to lipopolysaccharide in vitro: greater induction of IL-1 and IL-6, but smaller induction of neurotoxicity. *Exp Neurol* 182, 135-141.

Figure legends

Fig. 1. Cognitive performance of AD and AG Wistar rats evaluated by Morris water maze. (A) Performance in the reference memory protocol, based on escape latency. (B) Memory in the probe trial of reference memory, as measured by time spent (in s) in the target quadrant. (C) Number of crossings over the platform position. The data represent the mean \pm S.E.M. (n=10).

Fig. 2. Morphology and expression of classical cytoskeleton markers in NB, AD and AG astrocytes. (A) Representative images of astrocytes morphology at confluence. Immunofluorescence analysis for (B) GFAP and (C) vimentin at confluence. Representative immunoblots of GFAP (D) and vimentin (E). Bar graph corresponds to mean \pm S.E.M. and represents percentages relative to NB astrocytes (adopted as control conditions). The data are performed from four independent experimental determinations, and analyzed statistically by one-way ANOVA followed by Tukey's test. a indicates significant differences from NB astrocytes and b indicates significant differences from AD astrocytes. (F) Representative immunofluorescences of actin. (G) Representative immunostaining for actin and GFAP at 7 days *in vitro*.

Fig. 3. Modification in glutamate transporters and glutamine synthetase in NB, AD and AG astrocytes. (A) Representative immunofluorescences for GLAST, GLT-1 and GS. (B) Representative immunoblots of GLAST, GLT-1 and GS. For immunoblots the bar graph corresponds to mean \pm S.E.M. and represents percentages relative to NB astrocytes (adopted as control conditions). The data are performed from four independent experimental determinations, and

analyzed statistically by one-way ANOVA followed by Tukey's test. a indicates significant differences from NB astrocytes and b indicates significant differences from AD astrocytes. (C) GS activity from NB, AD and AG astrocytes. The data are expressed as percentages relative to NB astrocytes (adopted as control conditions) and represent mean \pm S.E.M. of five independent experimental determinations, performed in triplicate, and analyzed statistically by one-way ANOVA followed by Tukey's test. a indicates significant differences from NB astrocytes and b indicates significant differences from AD astrocytes.

Fig. 4. Changes in trophic factors in NB, AD and AG astrocytes. (A) GDNF, (B) BDNF, (C) S100B and (D) TGF- β levels. The data are expressed as percentages relative to NB astrocytes (adopted as control conditions) and represent mean \pm S.E.M. of five independent experimental determinations, performed in triplicate, and analyzed statistically by one-way ANOVA followed by Tukey's test. a indicates significant differences from NB astrocytes and b indicates significant differences from AD astrocytes.

Fig. 5. Age-dependent increases in oxidative stress parameters in NB, AD and AG astrocytes. (A) Mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$). (B) ROS production. (C) Superoxide levels. (D) NOX activity. (E) Nitrite levels. (F) PI incorporation. The data are expressed as percentages relative to NB astrocytes (adopted as control conditions) and represent mean \pm S.E.M. of five independent experimental determinations, performed in triplicate, and analyzed statistically by one-way ANOVA followed by Tukey's test. a indicates significant

differences from NB astrocytes and b indicates significant differences from AD astrocytes.

Fig. 6. Antioxidant enzymatic and non-enzymatic defenses in NB, AD and AG astrocytes. (A) SOD, (B) CAT and (C) GPx activities. (D) GSH levels. The data are expressed as percentages relative to NB astrocytes (adopted as control conditions) and represent mean \pm S.E.M. of five independent experimental determinations, performed in triplicate, and analyzed statistically by one-way ANOVA followed by Tukey's test. a indicates significant differences from NB astrocytes and b indicates significant differences from AD astrocytes.

Fig. 7. Age-dependent inflammatory response in NB, AD and AG astrocytes. (A) TNF- α , (B) IL-1 β , (C) IL-6, (D) IL-18, (E) IL-10, (F) MCP-1 levels. The data are expressed as percentages relative to NB astrocytes (adopted as control conditions) and represent mean \pm S.E.M. of five independent experimental determinations, performed in triplicate, and analyzed statistically by one-way ANOVA followed by Tukey's test. a indicates significant differences from NB astrocytes and b indicates significant differences from AD astrocytes.

Fig. 8. Signaling pathways involved in age-dependent glial responses in NB, AD and AG astrocytes. (A) p38 MAPK, (B) p65 NF κ B and (C) Nrf-2 levels. (D) HO-1 expression levels. The data are expressed as percentages relative to NB astrocytes (adopted as control conditions) and represent mean \pm S.E.M. of five independent experimental determinations, performed in triplicate, and analyzed statistically by one-way ANOVA followed by Tukey's test. a indicates significant

differences from NB astrocytes and b indicates significant differences from AD astrocytes.

Figura 1.

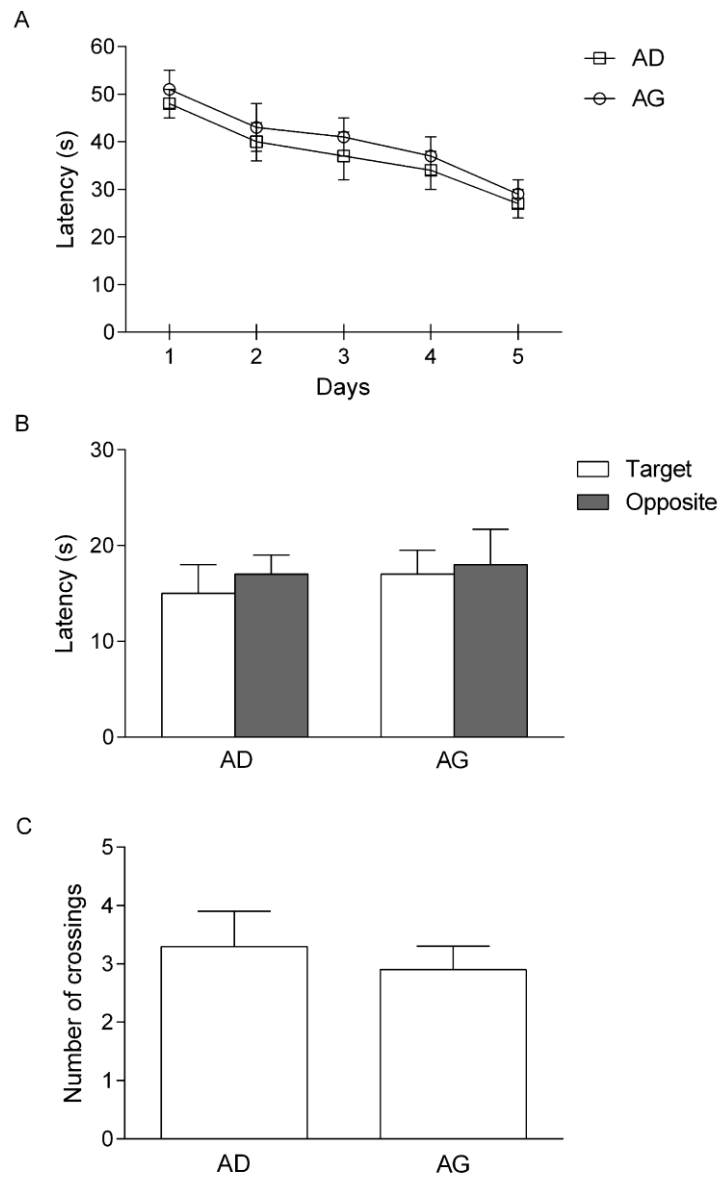


Figura 2.

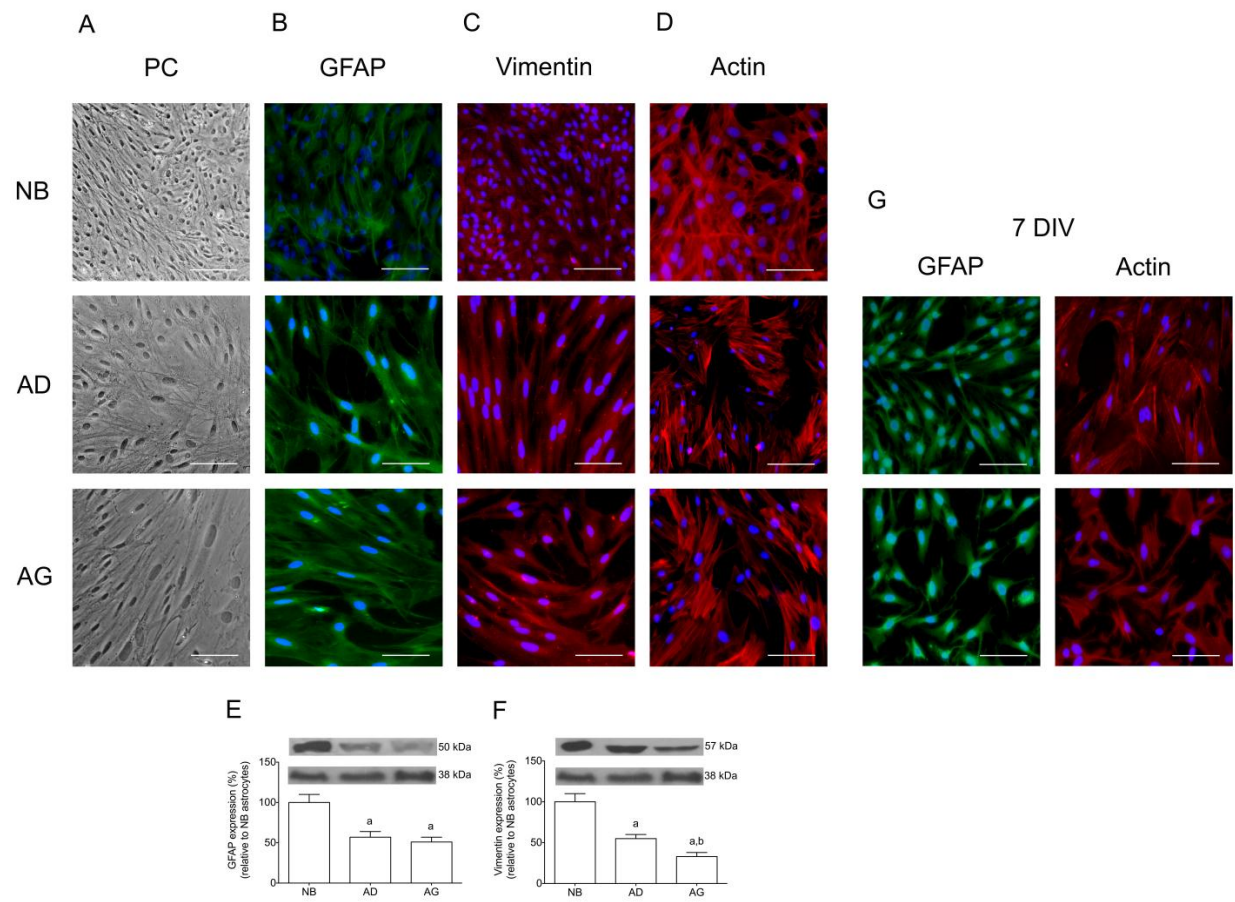


Figura 3.

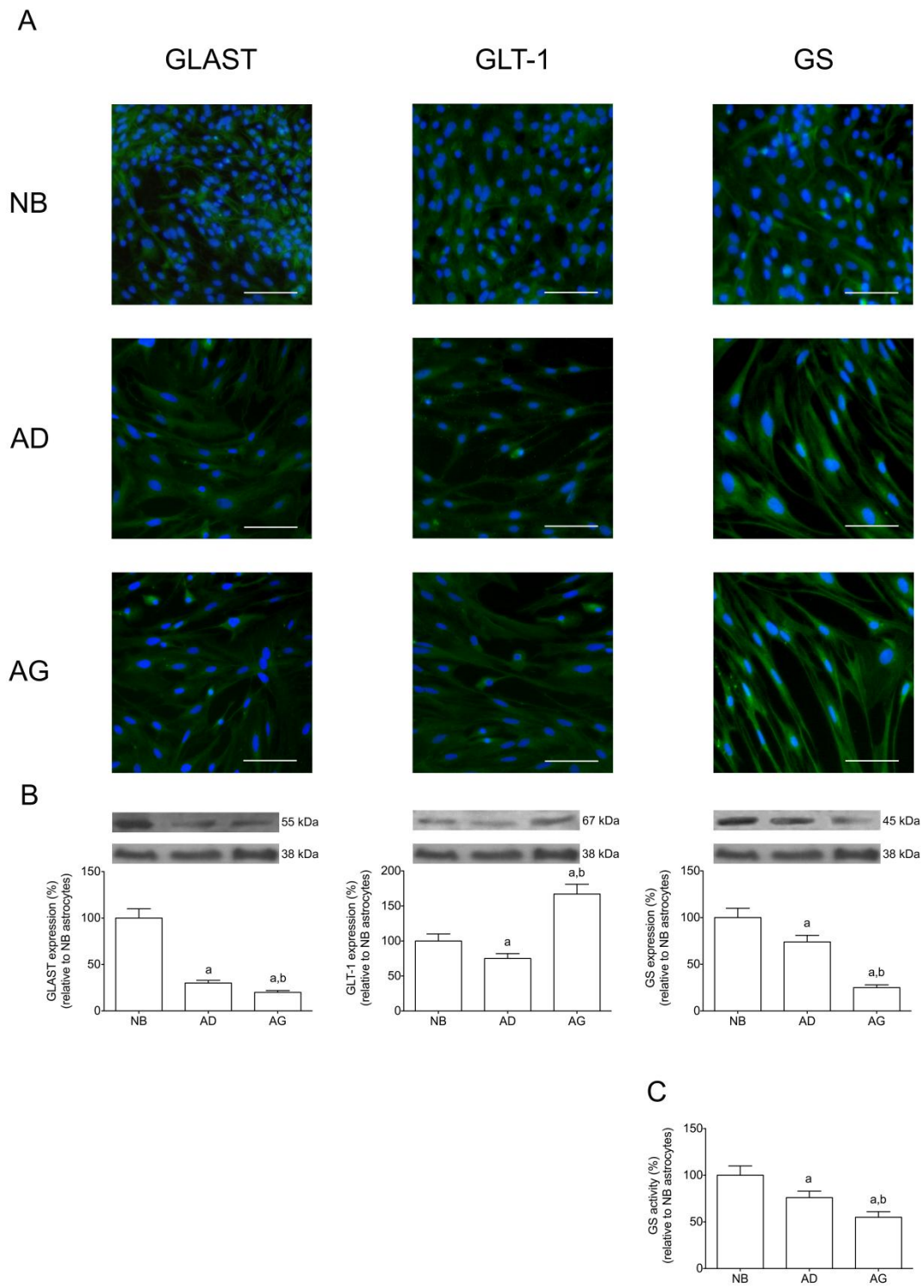


Figura 4.

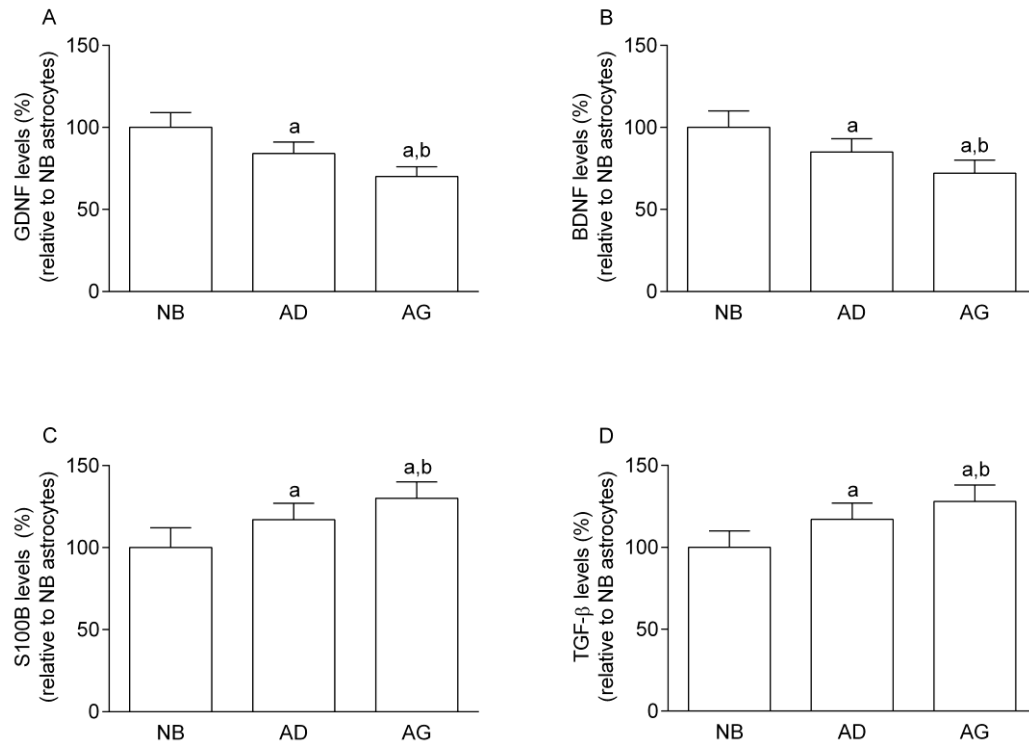


Figura 5.

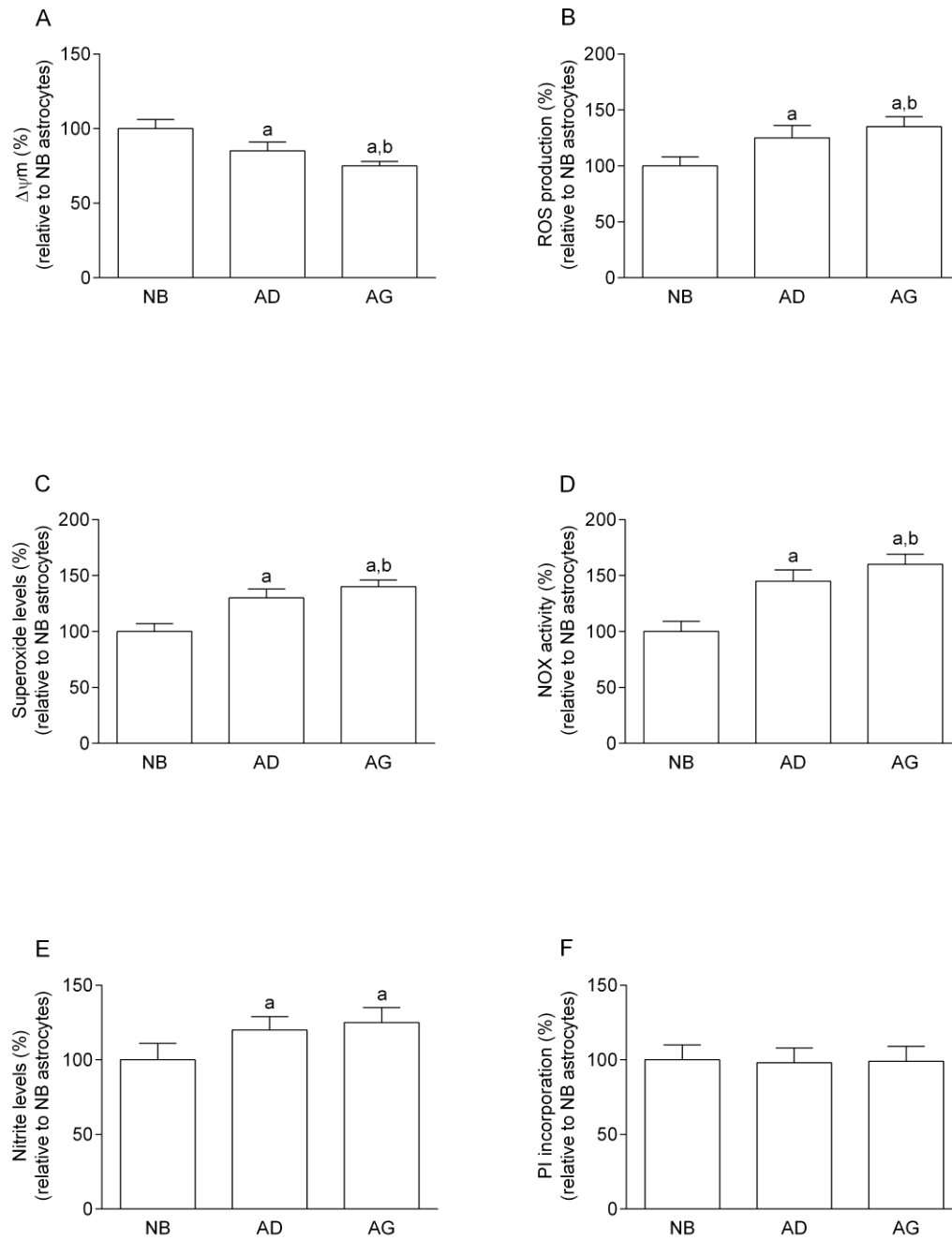


Figura 6.

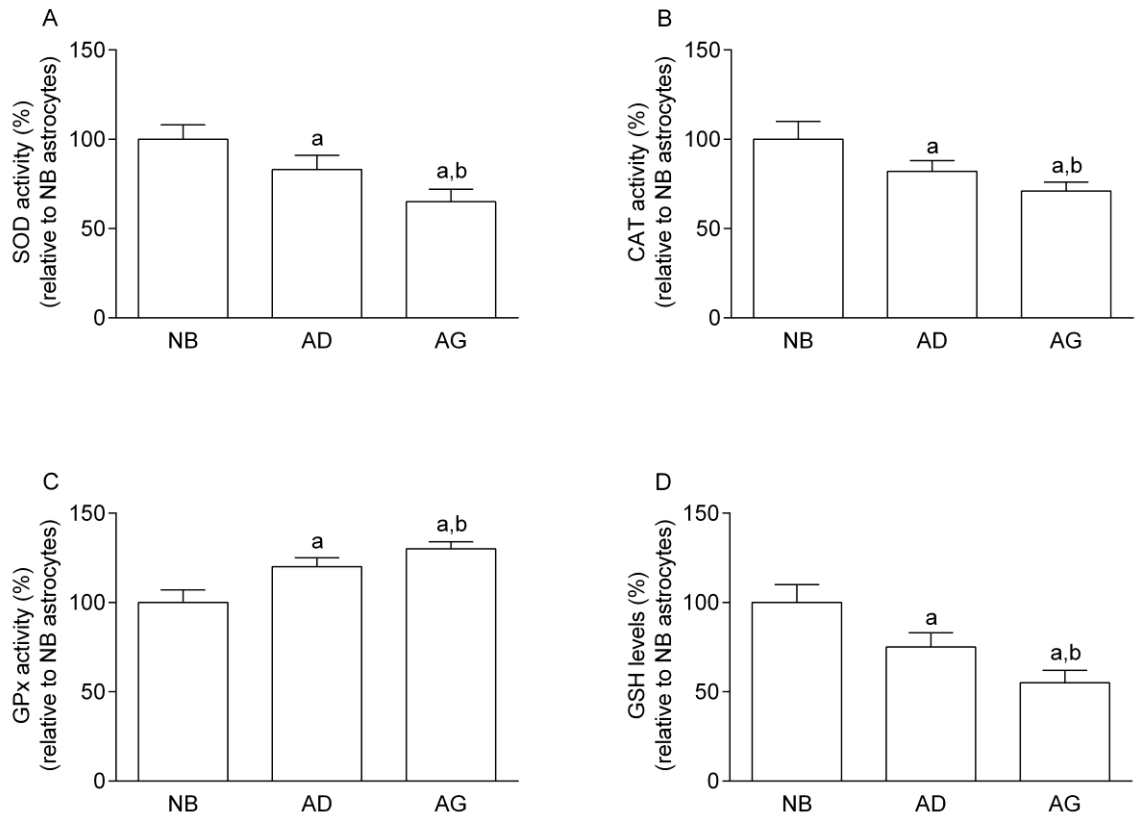


Figura 7.

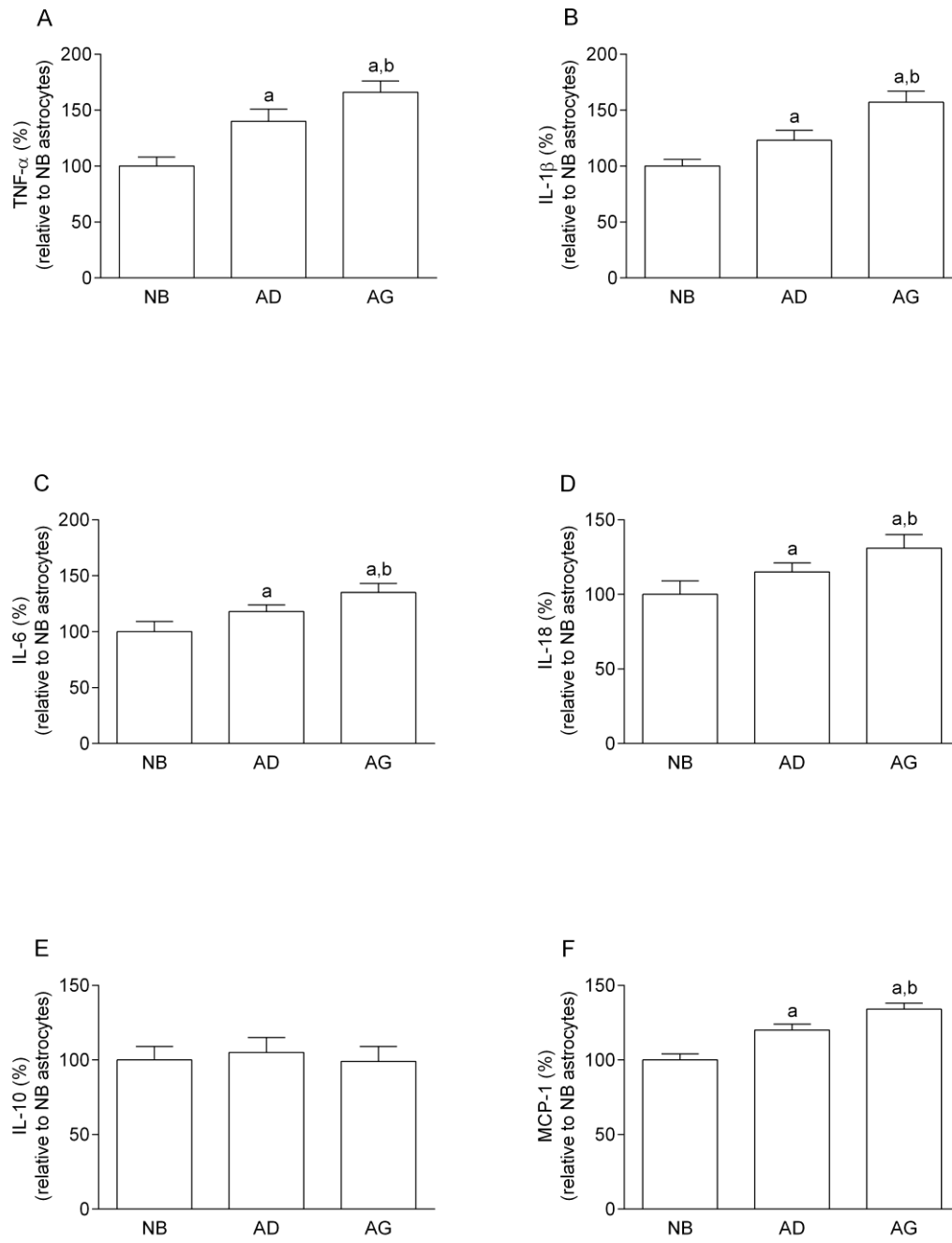
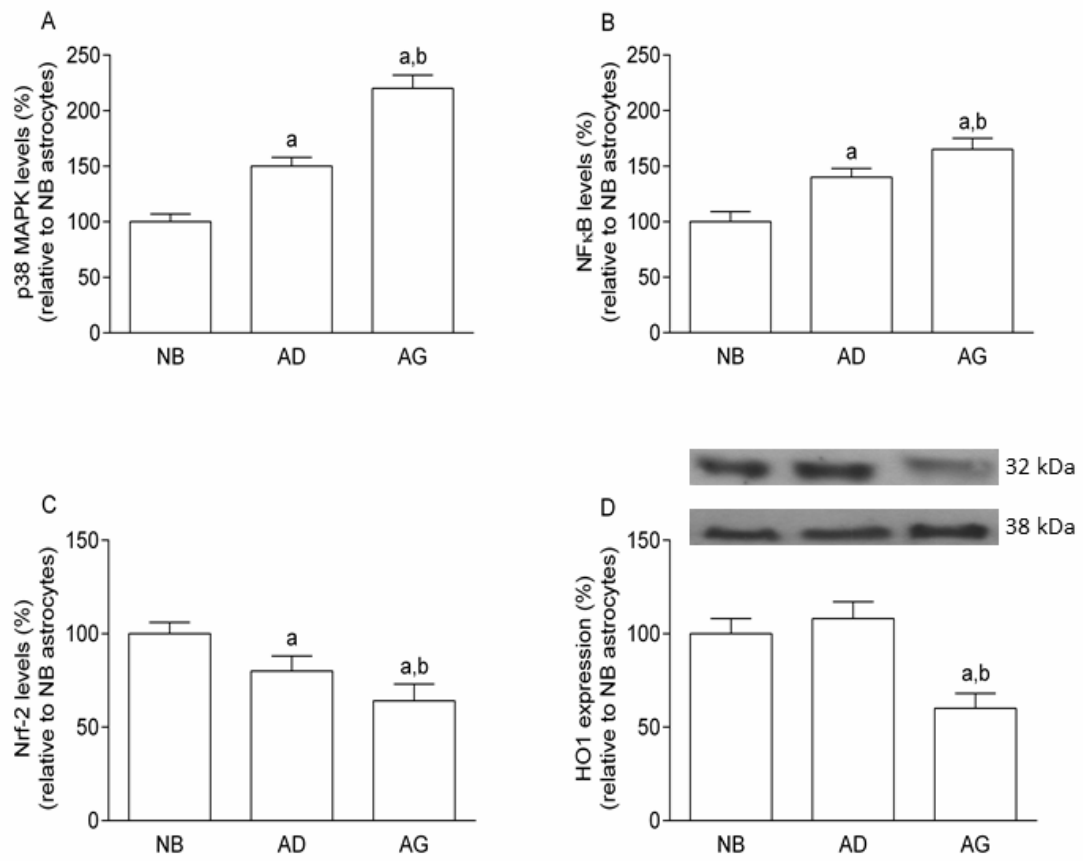


Figura 8.



PARTE III

DISCUSSÃO

O envelhecimento cerebral envolve uma complexa rede de interações entre neurônios e glia, na qual ambas as células alteram sua atividade funcional normal. Ainda que estudos demonstrem que o hipocampo esteja envolvido em tais deficiências, a perda de neurônios hipocampais não é, provavelmente, o fator responsável pelos déficits encontrados nesses processos, uma vez que a perda neuronal em larga escala não é uma característica do envelhecimento nesta área do cérebro, sugerindo assim um importante papel dos astrócitos nesse contexto (Miller & O'Callaghan 2005). Assim, alterações no hipocampo estão frequentemente associadas à fisiopatogenia de doenças neurodegenerativas que, por sua vez, é acompanhada por mudanças na funcionalidade astrocitária, sendo estas fortemente associadas ao estresse oxidativo e resposta inflamatória (Jiang & Cadenas 2014).

Considerando a relevância do hipocampo no envelhecimento fisiopatológico e também a fundamental importância dos astrócitos nos processos fisiopatológicos implicados a ele, neste estudo nós aprimoramos a caracterização de um protocolo de rotina de culturas primárias de astrócitos hipocampais de ratos Wistar adultos e envelhecidos (90 e 180 dias), previamente descrito pelo grupo (Bellaver *et al.* 2014), que servem como ferramenta para estudo do envelhecimento cerebral. Além disso, alterações na funcionalidade astrocitária, dependentes da idade, foram observadas através da avaliação da homeostase redox, resposta inflamatória e vias de sinalização. Interessantemente, ao avaliar o perfil cognitivo de ratos adultos (AD) e envelhecidos (EN) não observamos alterações comportamentais significativas

entre as idades, embora tenham sido detectadas alterações nos parâmetros celulares, moleculares e neuroquímicos avaliados.

A fim de atestar a pureza das culturas obtidas a partir deste protocolo, realizamos marcação imucitoquímica para proteínas caracteristicamente neuronais (NeuN e β -tubulina III) e microgliais (CD11). Não observamos marcação significativa para NeuN, presente no corpo celular de neurônios nem para β -tubulina III, presente nos processos neuronais. Essas proteínas são marcadoras de neurônios diferenciados, ou seja, imunorreativas em neurônios pós mitóticos (Weyer & Schilling 2003). Em relação à microglia, observamos uma marcação positiva para CD11 em aproximadamente 2% das células.

Alguns marcadores gliais clássicos também foram avaliados e alterações nas suas expressões foram observadas. Sabe-se que em astrócitos cultivados existem duas principais proteínas de filamentos intermediários de citoesqueleto, a GFAP e a vimentina, e essas têm suas expressões finamente reguladas durante o desenvolvimento, sendo comumente associadas à diferenciação astrocitária (Desclaux *et al.* 2009). Embora se saiba que o número total de astrócitos não diminua com o envelhecimento, ainda não há um consenso sobre o padrão de expressão de GFAP, relacionado à idade, em astrócitos cultivados (Fabricius *et al.* 2013; Rodriguez-Arellano *et al.* 2015). Em culturas primárias de astrócitos a marcação de GFAP pode aumentar durante o envelhecimento como consequência da ativação glial. Contudo, como demonstrado por Sampedro-Piquero e colaboradores, um aumento dessa expressão em função da idade pode refletir uma plasticidade astrogliar adaptativa, visto que mudanças em astrócitos coincidiram com melhora cognitiva (Sampedro-Piquero *et al.* 2014). A reação oposta, caracterizada por

degeneração e atrofia astrogliais, também pode ter importante relevância patológica, uma vez que os astrócitos atroficos reduzem o suporte às redes neuronais, e esse efeito é detectado nas fases iniciais de várias doenças neurodegenerativas (Rodriguez *et al.* 2014). Assim, as culturas primárias de astrócitos hipocampais de ratos AD e EN aqui descritas apresentam menor expressão de GFAP quando comparadas a astrócitos de neonatos (NN). Com o desenvolvimento cerebral, também observamos uma progressiva e, já relatada, diminuição da expressão de vimentina e em concordância com estudos anteriores, nossos resultados demonstraram uma coexpressão de GFAP e vimentina em cultura de astrócitos hipocampais, sugerindo assim uma adequabilidade do nosso modelo de cultura para o estudo do envelhecimento (Menet *et al.* 2001; Pertusa *et al.* 2007; Souza *et al.* 2013). O papel fisiológico exato de GFAP e de vimentina em astrócitos ainda não está completamente entendido, mas sabe-se que essas proteínas parecem estar envolvidas na manutenção da forma, estabilidade mecânica, citoarquitetura e funções sinápticas do SNC, processos os quais são fortemente afetados com a idade (Menet *et al.* 2001).

O citoesqueleto astrocitário, é uma estrutura altamente dinâmica que se reorganiza continuamente sempre que a célula altera a forma, se divide ou responde ao seu ambiente. As mudanças no citoesqueleto de actina são a chave para a transmissão de sinais que levam a uma resposta celular apropriada, exercendo importante influência em funções críticas de astrócitos, como sinalização de cálcio, homeostase iônica e transporte de glutamato (Alberts *et al.* 2002). Observamos aqui que astrócitos AD e EN apresentam um arranjo clássico de citoesqueleto de actina com fibras de estresse organizadas

na mesma direção e sentido e tal disposição pode ser observada desde os 7 dias de cultivo *in vitro* até a confluência (em torno de 30 dias de cultivo).

A expressão de outros marcadores astrocitários, relacionados ao metabolismo glutamatérgico, também foi investigada. Embora o glutamato seja essencial em processos plásticos cerebrais, como desenvolvimento e envelhecimento (Danbolt 2001; Banerjee *et al.* 2008) e em processos de aprendizado e memória (Segovia *et al.* 2001; Izquierdo *et al.* 2006), a hiperestimulação do sistema glutamatérgico, decorrente de níveis aumentados de glutamato na fenda sináptica, é extremamente prejudicial ao cérebro (Danbolt 2001). Esta situação, chamada excitotoxicidade glutamatérgica, está implicada em doenças como Alzheimer, Parkinson, esclerose múltipla e epilepsia (Gardoni & Di Luca 2006; Eulenburg & Gomez 2010; Pivovarova & Andrews 2010). A captação de glutamato do espaço extracelular é realizada primariamente por transportadores de glutamato, sendo que os principais, GLAST e GLT-1, são expressos por astrócitos (Anderson & Swanson, 2000; Danbolt, 2001). Contudo, padrões de expressão destes transportadores variam durante o desenvolvimento cerebral. A expressão de GLAST predomina em estágios iniciais de desenvolvimento e um progressivo aumento da expressão de GLT-1 pode ser observado na maturidade. A fisiopatologia de desordens neurológicas relacionadas à idade envolve alterações seletivas na expressão de transportadores de glutamato e significativa diminuição no conteúdo de GLT-1 foi observado na doença de Alzheimer *in vivo* e *in vitro* (Schallier *et al.* 2011). Assim, nosso protocolo de culturas primárias de astrócitos hipocâmpais fornece um meio de avaliar essas influências etárias sobre os transportadores de glutamato.

A enzima GS também tem um papel crucial para manutenção dos níveis de glutamato cerebral devido a sua capacidade de metabolizar glutamato a glutamina. No SNC essa enzima é expressa exclusivamente em astrócitos e além de ser essencial para a manutenção do ciclo glutamato-glutamina também é importante para regulação da transmissão sináptica excitatória e inibitória, mediada por glutamato e GABA, respectivamente. A diminuição da expressão e atividade da enzima GS, observadas aqui, estão em concordância com estudos em outros modelos que também observaram o padrão de expressão dessa enzima com o envelhecimento cerebral (Olabarria *et al.* 2011; Rodriguez *et al.* 2014). Adicionalmente, a atividade de GS é bastante sensível ao estresse oxidativo/nitrosativo que aumenta com a idade (Bellaver *et al.* 2014). Além disso, o metabolismo oxidativo no envelhecimento astrocitário pode limitar a sua habilidade de suprir neurônios com substratos metabólicos e prejuízos na atividade de GS contribuem diretamente para essa condição (Jiang & Cadenas 2014).

O envelhecimento cerebral normal, bem como o curso de doenças neurodegenerativas, são caracteristicamente marcados pela perda da plasticidade sináptica. Muitos estudos apontam que fatores tróficos são importantes mediadores moleculares dessa plasticidade estrutural e funcional, sendo capazes de auxiliar na proteção neuronal mediante algum tipo de dano cerebral (Arancio & Chao 2007; Lynch *et al.* 2007; Tanaka *et al.* 2008). Nos últimos anos, eles vêm atraindo crescente interesse de pesquisadores devido a seu promissor papel no tratamento de diversas patologias do SNC, como lesão na medula espinhal e doenças neurodegenerativas (Nagahara & Tuszynski 2011; Sun *et al.* 2014). Alguns fatores tróficos são secretados por astrócitos e

são essenciais para proliferação, sobrevivência e maturação de células neuronais, além disso, astrócitos hipocâmpais de animais adultos são células específicas que podem promover a neurogênese (Chen *et al.* 2005). Nesse sentido, GDNF, BDNF, S100B e TGF- β , quando secretados por astrócitos, podem desempenhar um papel protetor, reparador ou mesmo biomarcador no SNC. Em concordância com os resultados obtidos aqui nesse trabalho em culturas de astrócitos hipocâmpais, estudos demonstram que a liberação de GDNF e BDNF diminui com a idade e esta redução pode estar associada com a patofisiologia da neurodegeneração (Markiewicz & Lukomska 2006; Davila *et al.* 2013). Em relação ao GDNF, um aumento nos seus níveis basais é capaz de proteger neurônios contra insultos metabólicos e excitotóxicos (Hanbury *et al.* 2003). Já o BDNF é um fator essencial sobrevivência para oligodendrócitos e neurônios e a redução nos seus níveis basais pode conduzir a desmielinização, contribuindo para processos neurodegenerativos. Além disso, o BDNF tem um importante papel na plasticidade sináptica bem como no processo de formação de potenciais de longa duração, desempenhando uma influência direta nos processos relacionados ao aprendizado e a memória (Cathomas *et al.* 2010). Adicionalmente, a expressão de BDNF e GDNF por astrócitos são moduladas pela proteína HO1, que atua como um fundamental mecanismo defensivo para células expostas a um desafio oxidante/inflamatório (Hung *et al.* 2010; Wakabayashi *et al.* 2010; Quincozes-Santos *et al.* 2014). Tendo em vista a importância desses fatores tróficos para a manutenção das funções cerebrais e ainda, que mudanças em seus níveis basais estão implicadas em uma série de patologias e desordens, torna-se de grande valia, como modelo de estudo, uma ferramenta que seja sensível a essas alterações.

Em relação à proteína S100B, ela desempenha suas funções atuando intra e extracelularmente. A S100B intracelular age estimulando a proliferação, migração e diferenciação celulares durante o desenvolvimento cerebral (Donato *et al.* 2008). Atuando como um fator extracelular, a S100B pode servir como um biomarcador para doença de Alzheimer e outras desordens neuropsiquiátricas (Rothermundt *et al.* 2009; Li *et al.* 2011). A expressão dessa proteína também responde a mudanças no microambiente, uma vez que em culturas de astrócitos foi observado que a liberação de S100B é diminuída por elevados níveis de glicose e altas concentrações de glutamato (Tramontina *et al.* 2006a; Nardin *et al.* 2007). A presença de outros fatores tróficos, como GDNF e BDNF é capaz de aumentar a liberação de S100B e esta proteína ainda parece ter seus níveis regulados positivamente pela liberação de IL-1 β , promovendo o aumento da síntese da proteína precursora amilóide, que serve como fonte adicional para o acúmulo do peptídeo β amilóide na doença de Alzheimer (Li *et al.* 2011). Essas observações estão de acordo com nossos achados que demonstraram um aumento na secreção basal de S100B de maneira dependente da idade, em astrócitos hipocâmpais, reforçando que o aumento da liberação dessa proteína está presente no cérebro maduro, o qual é mais suscetível ao desenvolvimento de doenças neuroinflamatórias/neurodegenerativas.

É importante ressaltar que tanto S100B quanto TGF- β são consideradas citocinas, uma vez que desempenham, também, um papel associado à resposta imune. Nesse sentido, TGF- β pode mediar a iniciação e a regulação da resposta imune no SNC e ainda é capaz de controlar a proliferação neuronal (Teeling & Perry 2009). Após injúria ao SNC também ocorre um aumento

significativo da expressão de TGF- β pelos astrócitos, evento claramente implicado na formação da cicatriz glial (Gomes *et al.* 2005). Além disso, um aumento nos níveis basais dessa citocina é igualmente observado em diversas condições patológicas como esclerose múltipla, doença de Alzheimer e tumores cerebrais (Diniz *et al.* 2014). Com isso, esse aumento de TGF- β associado ao envelhecimento, observado aqui em culturas de astrócitos hipocampais, pode estar envolvido no processo de desencadeamento e aceleração de desordens neurológicas.

O envelhecimento cerebral tem sido apontado como o fator mais importante associado a uma série de doenças neurodegenerativas. A teoria dos radicais livres no envelhecimento, elaborada por Harman em 2003, parte da premissa que um processo único, modificável por fatores genéticos e ambientais, é responsável por fatores associados ao envelhecimento de todos os seres vivos e que este ponto em comum, seria as reações envolvendo radicais livres. Essas reações seriam responsáveis pela deterioração progressiva de sistemas biológicos ao longo do tempo por serem bastante instáveis e imprevisíveis, devido ao caráter altamente reativo das espécies envolvidas (Harman 2003). No que diz respeito às ERO's, a mitocôndria e a enzima NOX são as principais responsáveis pela sua produção no SNC, e existe um grande número de evidências que apoiam uma associação entre disfunção mitocondrial/NOX e envelhecimento cerebral (Suh *et al.* 2008; Brennan *et al.* 2009). Além disso, a geração de radical superóxido, pela ativação de NOX, pode conduzir a um severo dano oxidativo com consequente morte de neurônios. Já elevados níveis de nitritos, além de conduzirem à morte neuronal induzida pela glia, podem predizer dano mitocondrial e estão

envolvidas na alteração dos níveis de citocinas liberados nos SNC (Esposito *et al.* 2008). Estudos também reportam que aumentos na produção de NO são observados em consequência à perda de neurônios em doenças neurodegenerativas (Liu & Hong 2003). Assim, o presente trabalho demonstrou um aumento na liberação de nitritos por astrócitos hipocampais adultos e envelhecidos, quando comparados a neonatos, bem como um aumento substancial na produção de radical superóxido com a idade, sem causar perda de integridade de membrana celular. Com isso, nossos dados corroboram com a teoria dos radicais livres de Harman, que postula que uma diminuição em funções bioquímicas e fisiológicas correlacionadas com a idade se dão devido a um aumento no dano oxidativo.

O estresse oxidativo observado durante o envelhecimento cerebral não pode ser creditado somente a um aumento da produção de ERO's, visto que ele pode estar relacionado também a uma diminuição nos sistemas de defesa antioxidantes. Nesse sentido, enzimas responsáveis pela defesa antioxidante em astrócitos, como SOD, CAT e GPx podem controlar a geração de radicais livres. A diminuição na atividade de SOD e CAT, dependente da idade, aqui observada em astrócitos hipocampais, faz com que este sistema seja incapaz de evitar uma superprodução de radical superóxido e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), moléculas que causam severos danos celulares, sugerindo que animais envelhecidos são mais suscetíveis ao dano oxidativo (Droge 2002; Jiang & Cadenas 2014). Em adição, o aumento na atividade de GPx observado, pode ser explicado como uma forma dos astrócitos compensarem o aumento de H_2O_2 e os níveis diminuídos de GSH. A enzima SOD, presente em astrócitos, parece estar envolvida na manutenção dos níveis de GSH, pois atua na

detoxificação de radicais superóxido, assim, níveis de SOD diminuídos são condizentes com uma diminuição nos níveis de GSH. Cabe ressaltar que a redução nos níveis intracelulares de GSH está diretamente associada com o envelhecimento cerebral e neurodegeneração dependente da idade, baixos níveis de GSH são reportados como indicadores precoces de degeneração nigrostriatal na doença de Parkinson (Lee *et al.* 2010)

O tripeptídeo GSH é um importante elo entre estresse oxidativo, excitotoxicidade e inflamação, processos típicos encontrados no envelhecimento cerebral. Em relação à excitotoxicidade, sabe-se que esse processo é controlado pelos transportadores de glutamato astrocitários e que estes são vulneráveis a ação de oxidantes biológicos, uma diminuição no conteúdo de GSH os torna mais suscetíveis a sofrerem reações oxidativas e, conseqüentemente, perderem sua funcionalidade. Além disso, estudos demonstraram que depleções nos níveis de GSH também são responsáveis por induzir a resposta inflamatória exacerbada em doenças cerebrais relacionadas ao envelhecimento (Lee *et al.* 2010). Em relação a isso, Lee e colaboradores demonstraram também que a diminuição do conteúdo de GSH leva ao aumento da resposta inflamatória celular, com aumento dos níveis de TNF- α e IL-1 β , clássicas citocinas pró-inflamatórias (Lee *et al.* 2010). IL-1 β inclusive é considerada como citocina biomarcadora predominante em resposta a injúrias cerebrais e seus níveis elevados nas fases agudas e crônicas de doenças neurodegenerativas sugerem um importante papel dessa citocina em processos relacionados a doenças neurológicas (Rothwell 2003; Allan *et al.* 2005).

O aumento dos níveis de ERO's no SNC, por diversos estímulos, também tem forte influência na resposta inflamatória, podendo regular positivamente a expressão de mediadores inflamatórios, sobretudo os níveis de TNF- α (Infanger *et al.* 2006). Esta citocina, por sua vez, induz ativação astrocitária, potencializa a produção de NO, aumentando a geração de ERO's. Além disso, TNF- α é o primeiro sinal para o aumento da liberação de outras citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β e essas duas citocinas, por sua vez, são essenciais para produção e liberação de IL-6. Cabe ressaltar que IL-6 também tem sua expressão induzida pelo aumento da secreção da proteína S100B (Ponath *et al.* 2007). Outra citocina responsável pela indução de processos inflamatórios é a IL-18 (um membro da superfamília da IL-1) que em sua liberação estreitamente associada a doenças neurodegenerativas (Ojala *et al.* 2009; Sutinen *et al.* 2014). Foi demonstrado ainda que níveis de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-18 apresentam-se aumentados no hipocampo e córtex durante o envelhecimento cerebral (Xie *et al.* 2003). Por outro lado, os efeitos anti-inflamatórios exercidos pela IL-10 estão relacionados à inibição da secreção de TNF- α . Além disso, a IL-10 pode exercer uma rápida neuroproteção devido à sua capacidade de promover um atraso na ativação de NF κ B (Tukhovskaya *et al.* 2014). Essa via também está envolvida no aumento dos níveis da quimiocina MCP-1 que é uma reguladora primordial da neurotoxicidade inflamatória no envelhecimento cerebral e ativadora da via p38 MAPK no SNC. Os resultados obtidos a partir desse modelo de envelhecimento astrocitário *in vitro*, apresentados nesse trabalho, estão de acordo com estes relatos da literatura, visto que o cérebro envelhecido apresenta níveis elevados de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias.

Caracteristicamente, o fator de transcrição NFkB é considerado o principal mediador inflamatório do SNC, regulando a liberação de citocinas pró-inflamatórias, e conseqüentemente, exercendo um importante papel no desenvolvimento de desordens neuroinflamatórias. Nesse estudo nós observamos que, em astrócitos hipocampais, tanto NFkB quanto citocinas pró-inflamatórias tiveram seus níveis aumentados em função da idade. Uma vez que a resposta inflamatória parece estar exacerbada no cérebro envelhecido e que NFkB está envolvido na modulação dessa resposta, existem evidências consistentes que há uma maior ativação de NFkB com a idade, e o sinal determinante para esta, é a elevação dos níveis de NFkB p65 no núcleo (Miller & O'Callaghan 2005) Além disso, a ativação de NFkB também é responsável pelo controle da homeostase redox, visto que é capaz de modular a síntese de proteínas pró-oxidantes, podendo ser um link entre resposta inflamatória e estresse oxidativo/nitrosativo (Morgan & Liu 2011). A via p38 MAPK, que regula a translocação de NFkB, parece ser um evento precoce na ativação desse fator de transcrição (Gorina *et al.* 2011), e também apresentou seus níveis aumentados no nosso modelo de astrócitos hipocampais de animais AD e EN em comparação a NN. Nesse sentido, NFkB e p38 MAPK podem estar envolvidos na mediação do estresse oxidativo e resposta inflamatória no SNC.

Outro importante fator de transcrição envolvido no controle da resposta inflamatória é o Nrf-2, conhecido por ativar o sistema de defesa antioxidante celular, ele atua, por exemplo, restaurando os níveis de GSH através da indução da transcrição do gene da glutamilsteína sintetase, mediando, portanto, a neuroproteção no SNC (Calabrese *et al.* 2005). Dados indicam que a translocação reduzida de Nrf-2 para o núcleo pode ser a resposta primária a

alterações na homeostase redox e inflamação. Uma vez que esse fator de transcrição é considerado um mediador anti-inflamatório, nossos achados corroboram com estudos que demonstram que a atividade transcripcional de Nrf-2 diminui com envelhecimento cerebral. Nrf-2 ainda regula a expressão de HO1, proteína que é responsável por um fundamental mecanismo de defesa para células expostas a alterações oxidativas, controlando a produção de NO através da inibição da atividade da enzima óxido nítrico sintase induzível (Wakabayashi *et al.* 2010). Nrf-2 e HO1, em conjunto, também desempenham um importante papel na modulação de NFκB, uma vez que os produtos da reação catalisada por HO1, bilirrubina e ferro molecular, inibem a ativação NFκB. Além disso, o monóxido de carbono, é responsável por diminuir a produção de TNF-α e IL-1β e aumentar a produção de IL-10 (Otterbein *et al.* 2000). Nesse sentido, alterações em parâmetros de estresse oxidativo e resposta inflamatória dependentes da idade, em astrócitos hipocâmpais de ratos Wistar AD e EN, podem ser explicadas por alterações nas vias de sinalização de NFκB, p38, Nrf-2 e HO1, demonstrando assim que essas sinalizações são fundamentais para o entendimento dos processos relacionados ao envelhecimento e desordens neurodegenerativas.

Por fim, demonstramos que o modelo de cultura descrito nesse trabalho mostrou-se uma ferramenta adequada para elucidar propriedades bioquímicas, fisiológicas e moleculares de astrócitos hipocâmpais de ratos Wistar adultos e envelhecidos. Nesse sentido, nossos resultados evidenciam que alterações na funcionalidade astrocitária, dependentes da idade, associadas a marcadores gliais, metabolismo glutamatérgico, fatores tróficos, função mitocondrial, estresse oxidativo/nitrosativo e resposta inflamatória estão conectados,

provavelmente, através das vias de sinalização NFκB, p38, Nrf-2 e HO-1. Em conjunto, nossos resultados enfatizam que os astrócitos representam um importante alvo para compreender mecanismos envolvendo envelhecimento e desordens neurológicas relacionadas à idade e que este modelo é adequado para o estudo de patologias que tenham suas bases relacionadas à região hipocampal e ao envelhecimento cerebral, permitindo, futuramente, a realização de experimentos que testem tanto alvos preventivos como terapêuticos em situações neurodegenerativas *in vivo* e *in vitro*.

PERSPECTIVAS

Após o aprimoramento da caracterização de um protocolo de cultivo de astrócitos hipocampais de animais adultos e envelhecidos com a avaliação de parâmetros glutamatérgico, oxidativos e inflamatórios relacionados ao envelhecimento, como perspectivas desse trabalho nós vamos buscar uma correlação de efeitos provocados por estímulos *in vivo* com efeitos observados *in vitro*. Para isso, buscaremos avaliar o efeito da administração de resveratrol, seus mecanismos neuroquímicos, moleculares e celulares, *in vivo*, correlacionando com culturas de astrócitos corticais e hipocampais de ratos Wistar adultos submetidos a um modelo de inflamação/demência por LPS.

REFERÊNCIAS

- Adami C, Sorci G, Blasi E, Agneletti AL, Bistoni F, Donato R (2001). S100B expression in and effects on microglia. *Glia*. **33**, 131-142.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2002). *Molecular Biology of the Cell*.
- Allan SM, Tyrrell PJ, Rothwell NJ (2005). Interleukin-1 and neuronal injury. *Nat Rev Immunol*. **5**, 629-640.
- Allen NJ, Barres BA (2005). Signaling between glia and neurons: focus on synaptic plasticity. *Curr Opin Neurobiol*. **15**, 542-548.
- Anderson CM, Swanson RA (2000). Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia*. **32**, 1-14.
- Arancio O, Chao MV (2007). Neurotrophins, synaptic plasticity and dementia. *Curr Opin Neurobiol*. **17**, 325-330.
- Banerjee R, Vitvitsky V, Garg SK (2008). The undertow of sulfur metabolism on glutamatergic neurotransmission. *Trends Biochem Sci*. **33**, 413-419.
- Bellaver B, Souza DG, Souza DO, Quincozes-Santos A (2014). Resveratrol increases antioxidant defenses and decreases proinflammatory cytokines in hippocampal astrocyte cultures from newborn, adult and aged Wistar rats. *Toxicology in vitro*. **28**, 479-484.
- Bramanti V, Tomassoni D, Avitabile M, Amenta F, Avola R (2010). Biomarkers of glial cell proliferation and differentiation in culture. *Front Biosci (Schol Ed)*. **2**, 558-570.
- Brennan AM, Suh SW, Won SJ, Narasimhan P, Kauppinen TM, Lee H, Edling Y, Chan PH, Swanson RA (2009). NADPH oxidase is the primary source of superoxide induced by NMDA receptor activation. *Nat Neurosci*. **12**, 857-863.
- Brown AM, Ransom BR (2007). Astrocyte glycogen and brain energy metabolism. *Glia*. **55**, 1263-1271.
- Cabezas R, Avila M, Gonzalez J, El-Bacha RS, Baez E, Garcia-Segura LM, Jurado Coronel JC, Capani F, Cardona-Gomez GP, Barreto GE (2014). Astrocytic modulation of blood brain barrier: perspectives on Parkinson's disease. *Front Cell Neurosci*. **8**, 211.
- Calabrese V, Boyd-Kimball D, Scapagnini G, Butterfield DA (2004). Nitric oxide and cellular stress response in brain aging and neurodegenerative disorders: the role of vitagenes. *In Vivo*. **18**, 245-267.
- Calabrese V, Ravagna A, Colombrita C, Scapagnini G, Guagliano E, Calvani M, Butterfield DA, Giuffrida Stella AM (2005). Acetylcarnitine induces heme oxygenase in rat astrocytes and protects against oxidative stress: involvement of the transcription factor Nrf2. *J Neurosci Res*. **79**, 509-521.
- Calabrese V, Scapagnini G, Ravagna A, Fariello RG, Giuffrida Stella AM, Abraham NG (2002). Regional distribution of heme oxygenase, HSP70, and glutathione in brain: relevance for endogenous oxidant/antioxidant balance and stress tolerance. *J Neurosci Res*. **68**, 65-75.
- Cannon JG (2000). Inflammatory Cytokines in Nonpathological States. *News Physiol Sci*. **15**, 298-303.
- Cathomas F, Vogler C, Euler-Sigmund JC, de Quervain DJ, Papassotiropoulos A (2010). Fine-mapping of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene supports an association of the Val66Met polymorphism with episodic memory. *Int J Neuropsychopharmacol*. **13**, 975-980.
- Cauley K, Kukekov V, Young D (1997). Kainate/AMPA receptors expressed on human fetal astrocytes in long-term culture. *J Neurosci Res*. **47**, 311-321.
- Cerbai F, Lana D, Nosi D, Petkova-Kirova P, Zecchi S, Brothers HM, Wenk GL, Giovannini MG (2012). The neuron-astrocyte-microglia triad in normal brain ageing and in a model of neuroinflammation in the rat hippocampus. *PLoS One*. **7**, e45250.

- Chen Y, Ai Y, Slevin JR, Maley BE, Gash DM (2005). Progenitor proliferation in the adult hippocampus and substantia nigra induced by glial cell line-derived neurotrophic factor. *Exp Neurol*. **196**, 87-95.
- Clarke LE, Barres BA (2013). Emerging roles of astrocytes in neural circuit development. *Nat Rev Neurosci*. **14**, 311-321.
- Danbolt NC (2001). Glutamate uptake. *Prog Neurobiol*. **65**, 1-105.
- Davila D, Thibault K, Fiocco TA, Agulhon C (2013). Recent molecular approaches to understanding astrocyte function in vivo. *Front Cell Neurosci*. **7**, 272.
- Desclaux M, Teigell M, Amar L, Vogel R, Gimenez YRM, Privat A, Mallet J (2009). A novel and efficient gene transfer strategy reduces glial reactivity and improves neuronal survival and axonal growth in vitro. *PLoS One*. **4**, e6227.
- Diniz LP, Matias IC, Garcia MN, Gomes FC (2014). Astrocytic control of neural circuit formation: highlights on TGF-beta signaling. *Neurochem Int*. **78**, 18-27.
- Donato R, Sorci G, Riuzzi F, Arcuri C, Bianchi R, Brozzi F, Tubaro C, Giambanco I (2008). S100B's double life: Intracellular regulator and extracellular signal. *Biochim Biophys Acta*.
- Donato R, Sorci G, Riuzzi F, Arcuri C, Bianchi R, Brozzi F, Tubaro C, Giambanco I (2009). S100B's double life: intracellular regulator and extracellular signal. *Biochim Biophys Acta*. **1793**, 1008-1022.
- Dringen R (2000). Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog Neurobiol*. **62**, 649-671.
- Droge W (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*. **82**, 47-95.
- Eichenbaum H, Mathews P, Cohen NJ (1989). Further studies of hippocampal representation during odor discrimination learning. *Behav Neurosci*. **103**, 1207-1216.
- Emerit J, Edeas M, Bricaire F (2004). Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Biomed Pharmacother*. **58**, 39-46.
- Esposito E, Iacono A, Muia C, Crisafulli C, Mattace Raso G, Bramanti P, Meli R, Cuzzocrea S (2008). Signal transduction pathways involved in protective effects of melatonin in C6 glioma cells. *J Pineal Res*. **44**, 78-87.
- Eulenburg V, Gomez J (2010). Neurotransmitter transporters expressed in glial cells as regulators of synapse function. *Brain Res Rev*. **63**, 103-112.
- Fabricius K, Jacobsen JS, Pakkenberg B (2013). Effect of age on neocortical brain cells in 90+ year old human females--a cell counting study. *Neurobiol Aging*. **34**, 91-99.
- Fields RD, Stevens-Graham B (2002). New insights into neuron-glia communication. *Science*. **298**, 556-562.
- Frank-Cannon TC, Alto LT, McAlpine FE, Tansey MG (2009). Does neuroinflammation fan the flame in neurodegenerative diseases? *Mol Neurodegener*. **4**, 47.
- Gallo V, Russell JT (1995). Excitatory amino acid receptors in glia: different subtypes for distinct functions? *J Neurosci Res*. **42**, 1-8.
- Gardoni F, Di Luca M (2006). New targets for pharmacological intervention in the glutamatergic synapse. *Eur J Pharmacol*. **545**, 2-10.
- Girardi E, Ramos AJ, Vanore G, Brusco A (2004). Astrocytic response in hippocampus and cerebral cortex in an experimental epilepsy model. *Neurochem Res*. **29**, 371-377.
- Gomes FC, Sousa Vde O, Romao L (2005). Emerging roles for TGF-beta1 in nervous system development. *Int J Dev Neurosci*. **23**, 413-424.
- Gordon GR, Mulligan SJ, MacVicar BA (2007). Astrocyte control of the cerebrovasculature. *Glia*. **55**, 1214-1221.
- Gorina R, Font-Nieves M, Marquez-Kisinousky L, Santalucia T, Planas AM (2011). Astrocyte TLR4 activation induces a proinflammatory environment through the interplay between MyD88-dependent NFkappaB signaling, MAPK, and Jak1/Stat1 pathways. *Glia*. **59**, 242-255.

- Gross CG (1998). *Brain, Vision, Memory Tales in the History of Neuroscience*: MIT press, Cambridge.
- Halassa MM , Haydon PG (2007). Integrated brain circuits: astrocytic networks modulate neuronal activity and behavior. *Annu Rev Physiol.* **72**, 335-355.
- Halliwell B (2007). Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans.* **35**, 1147-1150.
- Hanbury R, Ling ZD, Wu J , Kordower JH (2003). GFAP knockout mice have increased levels of GDNF that protect striatal neurons from metabolic and excitotoxic insults. *J Comp Neurol.* **461**, 307-316.
- Harman D (2003). The free radical theory of aging. *Antioxid Redox Signal.* **5**, 557-561.
- Heinemann U, Kaufer D , Friedman A (2012). Blood-brain barrier dysfunction, TGFbeta signaling, and astrocyte dysfunction in epilepsy. *Glia.* **60**, 1251-1257.
- Hoppitt T, Pall H, Calvert M, Gill P, Yao G, Ramsay J, James G, Conduit J , Sackley C (2011). A systematic review of the incidence and prevalence of long-term neurological conditions in the UK. *Neuroepidemiology.* **36**, 19-28.
- Huang YH , Bergles DE (2004). Glutamate transporters bring competition to the synapse. *Curr Opin Neurobiol.* **14**, 346-352.
- Hung SY, Liou HC , Fu WM (2010). The mechanism of heme oxygenase-1 action involved in the enhancement of neurotrophic factor expression. *Neuropharmacology.* **58**, 321-329.
- Infanger DW, Sharma RV , Davissou RL (2006). NADPH oxidases of the brain: distribution, regulation, and function. *Antioxid Redox Signal.* **8**, 1583-1596.
- Izquierdo I, Bevilaqua LR, Rossato JI, Bonini JS, Medina JH , Cammarota M (2006). Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. *Trends Neurosci.* **29**, 496-505.
- Jensen CJ, Massie A , De Keyser J (2013). Immune players in the CNS: the astrocyte. *J Neuroimmune Pharmacol.* **8**, 824-839.
- Jeon YH, Sansoni J, Low LF, Chenoweth L, Zapart S, Sansoni E , Marosszeky N (2011). Recommended measures for the assessment of behavioral disturbances associated with dementia. *Am J Geriatr Psychiatry.* **19**, 403-415.
- Jeong DE, Artan M, Seo K , Lee SJ (2012). Regulation of lifespan by chemosensory and thermosensory systems: findings in invertebrates and their implications in mammalian aging. *Front Genet.* **3**, 218.
- Jiang T , Cadenas E (2014). Astrocytic metabolic and inflammatory changes as a function of age. *Aging Cell.* **13**, 1059-1067.
- Kenyon CJ (2010). The genetics of ageing. *Nature.* **464**, 504-512.
- Kettenmann H , Verkhratsky A (2008). Neuroglia: the 150 years after. *Trends Neurosci.* **31**, 653-659.
- Koehler RC, Roman RJ , Harder DR (2009). Astrocytes and the regulation of cerebral blood flow. *Trends Neurosci.* **32**, 160-169.
- Kroes MC , Fernandez G (2012). Dynamic neural systems enable adaptive, flexible memories. *Neurosci Biobehav Rev.* **36**, 1646-1666.
- Lee M, Cho T, Jantaratnotai N, Wang YT, McGeer E , McGeer PL (2010). Depletion of GSH in glial cells induces neurotoxicity: relevance to aging and degenerative neurological diseases. *FASEB J.* **24**, 2533-2545.
- Li C, Zhao R, Gao K, Wei Z, Yin MY, Lau LT, Chui D , Hoi Yu AC (2011). Astrocytes: implications for neuroinflammatory pathogenesis of Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res.* **8**, 67-80.
- Libert S , Pletcher SD (2007). Modulation of longevity by environmental sensing. *Cell.* **131**, 1231-1234.
- Liu B , Hong JS (2003). Role of microglia in inflammation-mediated neurodegenerative diseases: mechanisms and strategies for therapeutic intervention. *J Pharmacol Exp Ther.* **304**, 1-7.

- Lopez-Otin C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M , Kroemer G (2013). The hallmarks of aging. *Cell*. **153**, 1194-1217.
- Lynch G, Rex CS , Gall CM (2007). LTP consolidation: substrates, explanatory power, and functional significance. *Neuropharmacology*. **52**, 12-23.
- Machado A (2013). *Neuroanatomia funcional*: Atheneu.
- Mahncke HW, Bronstone A , Merzenich MM (2006). Brain plasticity and functional losses in the aged: scientific bases for a novel intervention. *Prog Brain Res*. **157**, 81-109.
- Maragakis NJ , Rothstein JD (2006). Mechanisms of Disease: astrocytes in neurodegenerative disease. *Nat Clin Pract Neurol*. **2**, 679-689.
- Markiewicz I , Lukomska B (2006). The role of astrocytes in the physiology and pathology of the central nervous system. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. **66**, 343-358.
- Mattson MP , Magnus T (2006). Ageing and neuronal vulnerability. *Nat Rev Neurosci*. **7**, 278-294.
- McAfoose J, Koerner H , Baune BT (2009). The effects of TNF deficiency on age-related cognitive performance. *Psychoneuroendocrinology*. **34**, 615-619.
- Menet V, Gimenez y Ribotta M, Chauvet N, Drian MJ, Lannoy J, Colucci-Guyon E , Privat A (2001). Inactivation of the glial fibrillary acidic protein gene, but not that of vimentin, improves neuronal survival and neurite growth by modifying adhesion molecule expression. *J Neurosci*. **21**, 6147-6158.
- Miller DB , O'Callaghan JP (2005). Aging, stress and the hippocampus. *Ageing Res Rev*. **4**, 123-140.
- Morgan MJ , Liu ZG (2011). Crosstalk of reactive oxygen species and NF-kappaB signaling. *Cell Res*. **21**, 103-115.
- Morimoto K, Fahnstock M , Racine RJ (2004). Kindling and status epilepticus models of epilepsy: rewiring the brain. *Prog Neurobiol*. **73**, 1-60.
- Morrison JH , Baxter MG (2012). The ageing cortical synapse: hallmarks and implications for cognitive decline. *Nat Rev Neurosci*. **13**, 240-250.
- Mrak RE , Griffinbc WS (2001). The role of activated astrocytes and of the neurotrophic cytokine S100B in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. **22**, 915-922.
- Nagahara AH , Tuszynski MH (2011). Potential therapeutic uses of BDNF in neurological and psychiatric disorders. *Nat Rev Drug Discov*. **10**, 209-219.
- Nardin P, Tramontina F, Leite MC, Tramontina AC, Quincozes-Santos A, de Almeida LM, Battastini AM, Gottfried C , Goncalves CA (2007). S100B content and secretion decrease in astrocytes cultured in high-glucose medium. *Neurochem Int*. **50**, 774-782.
- Nayernia Z, Jaquet V , Krause KH (2014). New insights on NOX enzymes in the central nervous system. *Antioxid Redox Signal*. **20**, 2815-2837.
- Nedergaard M, Ransom B , Goldman SA (2003). New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. *Trends Neurosci*. **26**, 523-530.
- Norenberg MD , Martinez-Hernandez A (1979). Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain. *Brain Res*. **161**, 303-310.
- Ojala J, Alafuzoff I, Herukka SK, van Groen T, Tanila H , Pirttila T (2009). Expression of interleukin-18 is increased in the brains of Alzheimer's disease patients. *Neurobiol Aging*. **30**, 198-209.
- Olabarria M, Noristani HN, Verkhratsky A , Rodriguez JJ (2011). Age-dependent decrease in glutamine synthetase expression in the hippocampal astroglia of the triple transgenic Alzheimer's disease mouse model: mechanism for deficient glutamatergic transmission? *Mol Neurodegener*. **6**, 55.
- Olton DS , Papas BC (1979). Spatial memory and hippocampal function. *Neuropsychologia*. **17**, 669-682.
- Ota Y, Zanetti AT , Hallock RM (2013). The role of astrocytes in the regulation of synaptic plasticity and memory formation. *Neural Plast*. **2013**, 185463.

- Otterbein LE, Bach FH, Alam J, Soares M, Tao Lu H, Wysk M, Davis RJ, Flavell RA , Choi AM (2000). Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nat Med.* **6**, 422-428.
- Panegyres PK (2004). The contribution of the study of neurodegenerative disorders to the understanding of human memory. *QJM.* **97**, 555-567.
- Patterson SL (2015). Immune dysregulation and cognitive vulnerability in the aging brain: Interactions of microglia, IL-1beta, BDNF and synaptic plasticity. *Neuropharmacology.*
- Pekny M (2001). Astrocytic intermediate filaments: lessons from GFAP and vimentin knock-out mice. *Prog Brain Res.* **132**, 23-30.
- Pertusa M, Garcia-Matas S, Rodriguez-Farre E, Sanfeliu C , Cristofol R (2007). Astrocytes aged in vitro show a decreased neuroprotective capacity. *J Neurochem.* **101**, 794-805.
- Pivovarova NB , Andrews SB (2010). Calcium-dependent mitochondrial function and dysfunction in neurons. *FEBS J.* **277**, 3622-3636.
- Ponath G, Schettler C, Kaestner F, Voigt B, Wentker D, Arolt V , Rothermundt M (2007). Autocrine S100B effects on astrocytes are mediated via RAGE. *J Neuroimmunol.* **184**, 214-222.
- Pope SA, Milton R , Heales SJ (2008). Astrocytes protect against copper-catalysed loss of extracellular glutathione. *Neurochem Res.* **33**, 1410-1418.
- Purves D (2004). *Neuroscience.*
- Quincozes-Santos A, Bobermin LD, Souza DG, Bellaver B, Goncalves CA , Souza DO (2014). Guanosine protects C6 astroglial cells against azide-induced oxidative damage: a putative role of heme oxygenase 1. *J Neurochem.* **130**, 61-74.
- Raine CS (2006). *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects.*
- Rando TA (2006). Stem cells, ageing and the quest for immortality. *Nature.* **441**, 1080-1086.
- Rodriguez-Arellano JJ, Parpura V, Zorec R , Verkhratsky A (2015). Astrocytes in physiological aging and Alzheimer's disease. *Neuroscience.*
- Rodriguez JJ, Yeh CY, Terzieva S, Olabarria M, Kulijewicz-Nawrot M , Verkhratsky A (2014). Complex and region-specific changes in astroglial markers in the aging brain. *Neurobiol Aging.* **35**, 15-23.
- Rothermundt M, Ahn JN , Jorgens S (2009). S100B in schizophrenia: an update. *Gen Physiol Biophys.* **28 Spec No Focus**, F76-81.
- Rothwell N (2003). Interleukin-1 and neuronal injury: mechanisms, modification, and therapeutic potential. *Brain Behav Immun.* **17**, 152-157.
- Sampedro-Piquero P, De Bartolo P, Petrosini L, Zancada-Menendez C, Arias JL , Begega A (2014). Astrocytic plasticity as a possible mediator of the cognitive improvements after environmental enrichment in aged rats. *Neurobiol Learn Mem.* **114**, 16-25.
- Santello M, Bezzi P , Volterra A (2011). TNFalpha controls glutamatergic gliotransmission in the hippocampal dentate gyrus. *Neuron.* **69**, 988-1001.
- Scapagnini G, D'Agata V, Calabrese V, Pascale A, Colombrita C, Alkon D , Cavallaro S (2002). Gene expression profiles of heme oxygenase isoforms in the rat brain. *Brain Res.* **954**, 51-59.
- Schallier A, Smolders I, Van Dam D, Loyens E, De Deyn PP, Michotte A, Michotte Y , Massie A (2011). Region- and age-specific changes in glutamate transport in the AbetaPP23 mouse model for Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* **24**, 287-300.
- Schousboe A, Bak LK , Waagepetersen HS (2013). Astrocytic Control of Biosynthesis and Turnover of the Neurotransmitters Glutamate and GABA. *Front Endocrinol (Lausanne).* **4**, 102.
- Scoville WB , Milner B (1957). Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* **20**, 11-21.
- Segovia G, Porras A, Del Arco A , Mora F (2001). Glutamatergic neurotransmission in aging: a critical perspective. *Mech Ageing Dev.* **122**, 1-29.
- Shao Y , McCarthy KD (1994). Plasticity of astrocytes. *Glia.* **11**, 147-155.

- Skytt DM, Madsen KK, Pajacka K, Schousboe A, Waagepetersen HS (2010). Characterization of primary and secondary cultures of astrocytes prepared from mouse cerebral cortex. *Neurochem Res.* **35**, 2043-2052.
- Sofroniew MV, Vinters HV (2010). Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* **119**, 7-35.
- Souza DG, Bellaver B, Souza DO, Quincozes-Santos A (2013). Characterization of adult rat astrocyte cultures. *PLoS One.* **8**, E60282.
- Sparkman NL, Johnson RW (2008). Neuroinflammation associated with aging sensitizes the brain to the effects of infection or stress. *Neuroimmunomodulation.* **15**, 323-330.
- Squire LR, Amaral DG, Press GA (1990). Magnetic resonance imaging of the hippocampal formation and mammillary nuclei distinguish medial temporal lobe and diencephalic amnesia. *J Neurosci.* **10**, 3106-3117.
- Stobart JL, Anderson CM (2013). Multifunctional role of astrocytes as gatekeepers of neuronal energy supply. *Front Cell Neurosci.* **7**, 38.
- Suh SW, Shin BS, Ma H, Van Hoecke M, Brennan AM, Yenari MA, Swanson RA (2008). Glucose and NADPH oxidase drive neuronal superoxide formation in stroke. *Ann Neurol.* **64**, 654-663.
- Sun XL, Chen BY, Duan L, Xia Y, Luo ZJ, Wang JJ, Rao ZR, Chen LW (2014). The proform of glia cell line-derived neurotrophic factor: a potentially biologically active protein. *Mol Neurobiol.* **49**, 234-250.
- Sutinen EM, Korolainen MA, Hayrinen J, Alafuzoff I, Petratos S, Salminen A, Soininen H, Pirttila T, Ojala JO (2014). Interleukin-18 alters protein expressions of neurodegenerative diseases-linked proteins in human SH-SY5Y neuron-like cells. *Front Cell Neurosci.* **8**, 214.
- Tanaka J, Horiike Y, Matsuzaki M, Miyazaki T, Ellis-Davies GC, Kasai H (2008). Protein synthesis and neurotrophin-dependent structural plasticity of single dendritic spines. *Science.* **319**, 1683-1687.
- Tapia-Arancibia L, Aliaga E, Silhol M, Arancibia S (2008). New insights into brain BDNF function in normal aging and Alzheimer disease. *Brain Res Rev.* **59**, 201-220.
- Teeling JL, Perry VH (2009). Systemic infection and inflammation in acute CNS injury and chronic neurodegeneration: underlying mechanisms. *Neuroscience.* **158**, 1062-1073.
- Theodosis DT, Poulain DA, Oliet SH (2008). Activity-dependent structural and functional plasticity of astrocyte-neuron interactions. *Physiol Rev.* **88**, 983-1008.
- Tramontina F, Leite MC, Goncalves D, Tramontina AC, Souza DF, Frizzo JK, Nardin P, Gottfried C, Wofchuk ST, Goncalves CA (2006a). High glutamate decreases S100B secretion by a mechanism dependent on the glutamate transporter. *Neurochem Res.* **31**, 815-820.
- Tramontina F, Tramontina AC, Souza DF, Leite MC, Gottfried C, Souza DO, Wofchuk ST, Goncalves CA (2006b). Glutamate uptake is stimulated by extracellular S100B in hippocampal astrocytes. *Cell Mol Neurobiol.* **26**, 81-86.
- Tukhovskaya EA, Turovsky EA, Turovskaya MV, Levin SG, Murashev AN, Zinchenko VP, Godukhin OV (2014). Anti-inflammatory cytokine interleukin-10 increases resistance to brain ischemia through modulation of ischemia-induced intracellular Ca²⁺(+) response. *Neurosci Lett.* **571**, 55-60.
- Ullian EM, Sapperstein SK, Christopherson KS, Barres BA (2001). Control of synapse number by glia. *Science.* **291**, 657-661.
- van Gassen KL, van der Hel WS, Hakvoort TB, Lamers WH, de Graan PN (2009). Haploinsufficiency of glutamine synthetase increases susceptibility to experimental febrile seizures. *Genes Brain Behav.* **8**, 290-295.
- Wakabayashi N, Slocum SL, Skoko JJ, Shin S, Kensler TW (2010). When NRF2 Talks, Who's Listening? *Antioxid Redox Signal.*
- Wang DD, Bordey A (2008). The astrocyte odyssey. *Prog Neurobiol.* **86**, 342-367.

- Weyer A , Schilling K (2003). Developmental and cell type-specific expression of the neuronal marker NeuN in the murine cerebellum. *J Neurosci Res.* **73**, 400-409.
- Xie Z, Morgan TE, Rozovsky I , Finch CE (2003). Aging and glial responses to lipopolysaccharide in vitro: greater induction of IL-1 and IL-6, but smaller induction of neurotoxicity. *Exp Neurol.* **182**, 135-141.
- Zhang Y , Pardridge WM (2001). Rapid transferrin efflux from brain to blood across the blood-brain barrier. *J Neurochem.* **76**, 1597-1600.