

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

Matheus Sinhorelli Cioccarì

**AVALIAÇÃO DA REMODELAÇÃO CELULAR EM CULTURAS DE ASTRÓCITOS  
HIPOTALÂMICOS**

Porto Alegre

2023

#### CIP - Catalogação na Publicação

Sinhorelli Ciocari, Matheus  
AVALIAÇÃO DA REMODELAÇÃO CELULAR EM CULTURAS DE  
ASTRÓCITOS HIPOTALÂMICOS / Matheus Sinhorelli  
Ciocari. -- 2023.  
74 f.  
Orientador: André Quincozes dos Santos.

Coorientadora: Larissa Daniele Bobermin.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da  
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2023.

1. Astrócitos. 2. Cultura de astrócitos. 3.  
Envelhecimento. 4. Hipotálamo. 5. Remodelação celular.  
I. Quincozes dos Santos, André, orient. II. Bobermin,  
Larissa Daniele, coorient. III. Título.

Matheus Sinhorelli Cioccarì

**AVALIAÇÃO DA REMODELAÇÃO CELULAR EM CULTURAS DE ASTRÓCITOS  
HIPOTALÂMICOS**

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

Orientador: Prof. Dr. André Quincozes dos Santos  
Coorientadora: Dra. Larissa Daniele Bobermin

Porto Alegre

2023

*“Deus não joga dados”*

Albert Einstein

*“Deus não só joga dados, como é dono de um grande cassino”*

Stephen Hawking

## **AGRADECIMENTOS**

A palavra que eu faço questão de levar para a vida é “gratidão”. Eu gostaria de começar agradecendo a professora Cláudia Funchal que foi minha professora de bioquímica na graduação e acreditou em mim e sempre me ajudou ao máximo no que podia e inclusive me indicou para o professor André para a realização do mestrado.

Durante a graduação, eu li livros que me fizeram romantizar a ciência enquanto cientista, livros como “a dupla hélice” do Watson, “o que é a vida?” do Schrödinger, entre outros. Eu comecei a olhar o cientista como algo maior do que eu já via. Quando eu olho para a Lari, eu vejo EXATAMENTE essa representação. Eu fico impressionado quão grande cientista e pessoa a Lari é. Diversas vezes eu cheguei com problemas e ela me deu as soluções, até quando eu achei que não tinha mais o que fazer, ela SEMPRE conseguia. Já me deu conselhos de leituras, de como abordar temas em sala de aula, de parte prática, enfim, a Lari, de fato, é uma das minhas maiores referências enquanto professora e cientista e eu fico muito feliz de ela ter sido minha coorientadora. Sempre serei grato pela pessoa que a Lari é!

O LABGLIO foi minha casa por um ano e meio e a forma como essa casa me abraçou foi incrível, nunca esperaria ser melhor recebido como fui e nunca esperaria ter colegas de trabalho tão especiais quanto os que eu tive. Sou muito grato por ter eles do meu lado me fazendo rir, dando suporte, conselhos, ajudando na parte prática diária e a lidar com as questões do mestrado. MUITO OBRIGADO POR TUDO!

Professor André, o que dizer da pessoa que abriu as portas para mim? Eu não sei se eu teria a coragem que ele teve de abraçar uma pessoa que nunca tinha estado dentro do laboratório de bioquímica (especificamente) e que deixou muito claro que não conhecia praticamente NADA sobre astrócitos e nunca tinha trabalhado com cérebro. O professor André mudou a minha vida, me deu uma oportunidade que eu

sempre quis ter e me deu todas as condições para fazer o meu melhor e sempre me deu apoio. Às vezes eu pareço até chato de tanto que eu agradeço, mas é porque eu não consigo achar formas melhores de demonstrar toda minha gratidão pelo que ele fez por mim. A mudança na minha vida para um cientista melhor e uma pessoa melhor, com toda certeza, tem a mão dele, uma referência dentro da ciência e dentro da sala de aula. Obrigado por mudar minha vida.

Aos meus amigos que tiveram do meu lado nessa jornada, que comemoraram quando eu disse que passei, que me abraçaram quando eu precisei e que são meus irmãos(ãs) para sempre. Tudo com vocês é mais especial.

Eu estudei muito para entrar no mestrado e na época eu namorava a Carol. Quando entrei, busquei cada vez estudar mais e mais e quem sempre pagou o preço das minhas escolhas de não sair, ficar em casa, perder o final de semana, foi ela. Noventa por cento do processo todo do mestrado ela estava junto e sofreu até nas minhas reclamações e apesar de não estarmos mais juntos, preciso agradecer por tudo, pois não seria justo eu não citar ela nesse processo e nessa conquista.

Por fim, meus pais! Eu tenho certeza absoluta que eu não seria nada sem eles, sempre que eu caí, eles estavam lá, me incentivaram de todas as formas e sempre acreditaram em todos os meus sonhos e com o mestrado não foi diferente. Obrigado por tudo que vocês fizeram por mim ontem, hoje e sempre. Amo vocês!

## SUMÁRIO

<b>PARTE I</b> .....	1
RESUMO .....	2
ABSTRACT .....	4
LISTA DE ABREVIATURAS .....	5
1 INTRODUÇÃO.....	7
1.1 HIPOTÁLAMO.....	7
1.2 ASTRÓCITOS.....	9
1.3 ENVELHECIMENTO.....	14
2 JUSTIFICATIVA .....	19
3 OBJETIVOS.....	20
3.1 OBJETIVO GERAL.....	20
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
<b>PARTE II</b> .....	21
4 METODOLOGIA.....	22
4.1 ANIMAIS.....	22
4.2 CULTURA PRIMÁRIA DE ASTRÓCITOS .....	22
4.3 DESENHO EXPERIMENTAL .....	23
4.4 VIABILIDADE, INTEGRIDADE E MORFOLOGIA CELULAR.....	25
4.5 DETERMINAÇÃO DE LACTATO .....	26
4.6 EXTRAÇÃO DE RNA E RT-PCR QUANTITATIVO .....	26
4.7 ATIVIDADE DA GLUTAMINA SINTETASE (GS).....	26
4.9 NÍVEIS DE TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-10.....	27
4.10 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS .....	27
5 RESULTADOS .....	29
5.1 EFEITOS DA TROCA DE MEIO DE CULTIVO ENTRE CULTURAS DE ASTRÓCITOS HIPOTALÂMICOS DE ANIMAIS NEONATOS E ADULTOS SOBRE PARÂMETROS METABÓLICOS E MITOCONDRIAS.....	29
5.2 EFEITOS DA TROCA DE MEIO ENTRE CULTURAS DE ASTRÓCITOS HIPOTALÂMICOS DE ANIMAIS NEONATOS E ADULTOS SOBRE PARÂMETROS ASTROGLIAIS.....	31
5.3 ALTERAÇÕES NO PROCESSO INFLAMATÓRIO DECORRENTES DA REMODELAÇÃO ASTROCITÁRIA.....	32
5.4 EFEITOS DA TROCA DE SOBRENADANTE SOBRE MECANISMOS DE SINALIZAÇÃO CELULAR ASTROCITÁRIOS .....	36
5.5 TROCA DE SOBRENADANTE MODULA A EXPRESSÃO DO MARCADOR DE SENESCÊNCIA p21 .....	38

<b>PARTE III</b> .....	39
6 DISCUSSÃO .....	40
7 CONCLUSÕES .....	50
8 RESUMO DOS RESULTADOS .....	52
9 REFERÊNCIAS .....	54



## **PARTE I**

## RESUMO

Os astrócitos são células gliais extremamente versáteis, que possuem diversas funções no sistema nervoso central (SNC), como por exemplo: manutenção da homeostase iônica, captação e liberação de diversos neurotransmissores, como o glutamato e o ácido gama-aminobutírico (GABA), liberação de mediadores inflamatórios, participação nos sistemas de defesa antioxidante, bem como fazem parte da barreira hematoencefálica, entre outras funções. Para caracterizar propriedades bioquímicas, farmacológicas e morfológicas das células gliais, frequentemente utiliza-se a metodologia de cultura de células. Neste sentido, astrócitos de animais neonatos e adultos respondem de formas diferentes a estímulos, sendo que astrócitos no cérebro adulto são mais organizados e possuem conexões bem estabelecidas, enquanto os astrócitos de neonatos são extremamente plásticos e possuem um baixo grau de diferenciação, além de serem bastante sensíveis a estímulos tóxicos e/ou protetores. Com base nisso, culturas de animais em diferentes idades e estágios de maturação ajudam a elucidar o papel dos astrócitos nos processos do envelhecimento cerebral e/ou da fisiologia do cérebro adulto. O hipotálamo é uma região fundamental responsável pela termorregulação e atividades homeostáticas, como o balanço energético. Assim, inúmeros estudos têm mostrado o importante papel que os astrócitos possuem nas funções do hipotálamo, tais como suporte metabólico e trófico aos neurônios, defesa imunológica e detecção de nutrientes. O processo de envelhecimento caracteristicamente pode perturbar a homeostase do organismo, envolvendo respostas inflamatórias e, conseqüentemente, possui relação com as disfunções dos astrócitos hipotalâmicos. A remodelação astrocitária corresponde a modificações celulares, fazendo com que a célula mude suas características metabólicas e funcionais, a partir disso, avaliamos a possível remodelação astrocitária em culturas de astrócitos hipotalâmicos provenientes de ratos Wistar neonatos e adultos, mediante a troca de meio extracelular entre elas, com foco em possíveis alterações funcionais, celulares e moleculares nestas células. Nossos resultados mostraram alterações significativas em parâmetros metabólicos e mitocondriais, como liberação de lactato e expressão da enzima citrato sintase (CS), bem como na resposta inflamatória, particularmente em relação à liberação e expressão do fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucina-1 beta (IL-1 $\beta$ ) e interleucina-10 (IL-10). Outros efeitos modulatórios também foram identificados na expressão de ciclo-oxigenase 2 (COX-2), fator eritroide nuclear 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2), heme oxigenase 1 (HO-1), sirtuína 1 (SIRT1), proteína cinase ativada por AMP (AMPK) e coativador-1 alfa do receptor gama ativado por proliferador de peroxissomo (PGC-1 $\alpha$ ), tal como no marcador de senescência p21. Com base nisso, concluímos que a troca de meio extracelular entre as culturas de astrócitos hipotalâmicos provenientes de animais neonatos e adultos pode modular diferentes parâmetros neuroquímicos, celulares e moleculares relacionados ao processo de envelhecimento. Esta possível remodelação astrocitária pode contribuir no entendimento dos processos de envelhecimento no SNC e para o desenvolvimento de futuras estratégias protetoras.

PALAVRAS-CHAVE: Astrócitos; Cultura de astrócitos; Envelhecimento; Hipotálamo; Remodelação celular.

## ABSTRACT

Astrocytes are versatile glial cells, which have several functions in the central nervous system (CNS), such as: maintenance of ionic homeostasis, uptake and release of several neurotransmitters, such as glutamate and gamma-aminobutyric acid (GABA), release of inflammatory mediators, participation in antioxidant defense systems, as well as being part of the blood-brain barrier, among other functions. To characterize biochemical, pharmacological, and morphological properties of glial cells, cell culture methodology is often used. In this regard, astrocytes from neonatal and adult animals can respond differently to stimuli, since astrocytes in adult brain are more organized and have well-established connections, while neonatal astrocytes are extremely plastic and have a low degree of differentiation, in addition to being sensitive to toxic and/or protective stimuli. Based on this, astrocyte cultures from animals at different ages and stages of maturation help to elucidate the role of astrocytes in brain aging processes and/or adult brain physiology. The hypothalamus is a fundamental region responsible for thermoregulation and homeostatic activities such as energy balance. Thus, numerous studies have shown the important role that astrocytes play in hypothalamic functions, such as metabolic and trophic support to neurons, immune defense, and nutrient detection. The aging process can characteristically disturb the body's homeostasis, involving inflammatory responses and, consequently, is related to dysfunctions in hypothalamic astrocytes. Astrocyte remodeling corresponds to cellular modifications, causing the cell to change its metabolic and functional characteristics, based on this, we evaluated the possible astrocyte remodeling in hypothalamic astrocyte cultures from neonatal and adult Wistar rats, through the exchange of extracellular medium between them, focusing on possible functional, cellular and molecular changes in these cells. Our results showed significant alterations in metabolic and mitochondrial parameters, such as lactate release and citrate synthase (CS) expression, as well as in the inflammatory response, particularly regarding the release and expression of tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 beta (IL-1 $\beta$ ) and interleukin-10 (IL-10). Other modulatory effects were also identified in the expression of cyclooxygenase 2 (COX-2), nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), heme oxygenase 1 (HO-1), sirtuin 1 (SIRT1), AMP-activated protein kinase (AMPK), and peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 alpha (PGC-1 $\alpha$ ), as well as in the senescence marker p21. Based on this, we conclude that the exchange of extracellular medium between hypothalamic astrocyte cultures from neonatal and adult animals can modulate different neurochemical, cellular and molecular parameters related to the aging process. This astrocyte remodeling may contribute for understanding the aging processes in the CNS as well as to future protective strategies.

**KEYWORDS:** Aging; Astrocytes; Astrocyte cultures; Cell remodeling, Hypothalamus.

## LISTA DE ABREVIATURAS

AMPK	Proteína cinase ativada por AMP
ATP	Adenosina trifosfato
BHE	Barreira hematoencefálica
Ca <sup>2+</sup>	Cálcio
CS	Citrato sintase
COX-2	Ciclo-oxigenase 2
ERO	Espécies reativas de oxigênio (do inglês “Reactive oxygen species”)
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GCL	Glutamato-cisteína ligase
GFAP	Proteína glial fibrilar ácida (do inglês “Glial fibrillary acidic protein”)
GLAST	Transportador de glutamato-aspartato (do inglês “Glutamate-aspartate transporter”)
GLT-1	Transportador de glutamato 1 (do inglês “Glutamate transporter 1”)
GLUTs	Transportadores de glicose (do inglês “Glucose transportes”)
GS	Glutamina sintetase
GSH	Glutationa reduzida
HO-1	Heme oxigenase 1
IL-1 $\beta$	Interleucina-1 $\beta$
IL-10	Interleucina-10
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
MCT	Transportador de monocarboxilato
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NF $\kappa$ B	Fator de transcrição nuclear kappa B (do inglês “Nuclear fator kappa B”)
Nrf2	Fator eritroide nuclear 2 relacionado ao fator 2 (do inglês “Nuclear fator erythroid-derived 2-like 2”)

PGC-1 $\alpha$	Coativador-1 alfa do receptor gama ativado por proliferador de peroxissomo (do inglês "Peroxisome proliferator activated receptor-gamma coactivator 1alpha)
SIRT1	Sirtuína 1
SNC	Sistema nervoso central
TCA	Ciclo do ácido tricarbóxico
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral $\alpha$ (do inglês "Tumor necrosis fator $\alpha$ ")

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 HIPOTÁLAMO

Dentre as diversas regiões cerebrais fundamentais para a homeostase do organismo, o hipotálamo, localizado no diencéfalo, possui destaque por ser uma das áreas mais conservadas do cérebro, compreendendo circuitos neurais específicos com importantes funções para a existência da vida (Saper e Lowell, 2014). Dentre algumas de suas funções estão: termorregulação, ritmo circadiano, metabolismo energético e equilíbrio eletrolítico (Saper e Lowell, 2014; Schneeberger, Gomis e Claret, 2014). Todos esses processos estão diretamente ligados à regulação da homeostase e possuem uma alta capacidade de ajuste frente a alterações tanto rápidas, quanto de longo prazo (Chowen et. a., 2016). Esta capacidade adaptativa torna o hipotálamo uma importante região com habilidades plásticas durante o período de desenvolvimento, assim como na idade adulta (Santos et. al., 2018).

Os constantes processos funcionais do hipotálamo derivam da integração de sinais advindos tanto da periferia do organismo, quanto das demais regiões cerebrais e, com base nisso, o hipotálamo responderá com estímulos adequados. As diversas conexões hipotalâmicas fazem com que esta região possua diversos tipos celulares com características funcionais distintas, particularmente neurônios e astrócitos, que regulam diversos processos homeostáticos (Saper e Lowell, 2014). Portanto, as células neuronais e gliais permitem que processos hipotalâmicos possam ocorrer de forma coordenada e ajustada (Coll e Yeo, 2013).

Como mencionado anteriormente, uma das principais funções do hipotálamo é ser um centro regulador do metabolismo, intermediando diversos processos através de uma região específica chamada núcleo arqueado, pela qual regula o balanço energético. Através do núcleo arqueado, o hipotálamo identifica sinais de diversos

hormônios na corrente sanguínea, tais como grelina, insulina e leptina, modificando e regulando o metabolismo, e com isso, os processos de balanço energético a fim de promover os ajustes necessários para manutenção da homeostase (Cornejo et. al., 2016).

Por sua crucial localização, o hipotálamo parece ser a principal área que detecta glicose no cérebro, sendo a primeira área suprida com sangue arterial (Leloup et. al., 2016). Vale destacar que a glicose é o principal substrato energético das células neurais. O catabolismo da glicose, além de proporcionar o pleno funcionamento das funções cerebrais, promove funções protetoras contra diversas situações como estresse oxidativo e produtos tóxicos (Muraleedharan e Dasgupta, 2021). Dentre os sensores metabólicos que atuam na regulação energética, possuindo atuação periférica e central, destacam-se a proteína cinase ativada por AMP (AMPK) e a sirtuína 1 (SIRT1). A ativação da AMPK tem relação direta com a razão AMP/ATP e, conseqüentemente, ativa vias geradoras de ATP enquanto inibe vias consumidoras de ATP (Voss et. al., 2020). No hipotálamo, a AMPK apresenta funções de regulação de ingestão e gasto energético (Muraleedharan e Dasgupta, 2021), ou seja, está diretamente relacionada ao metabolismo, sendo um sensor de energia. Além disso, possui um papel importante na prevenção da senescência, assim como do processo de envelhecimento (Chen et. al., 2020).

Já a SIRT1 também atua como sensor de energia intracelular sensível à relação  $NAD^+/NADH$ , sendo uma enzima classificada como uma histona desacetilase dependente de  $NAD^+$ . Entre suas funções destacam-se: metabolismo, homeostase mitocondrial, autofagia, reparo do DNA, entre outras. Com relação ao sistema nervoso central (SNC), a SIRT1 é altamente expressa no hipotálamo (Qadir e Anwar, 2017) e também está diretamente relacionada à regulação da senescência e envelhecimento



celular. Em humanos, a expressão da SIRT1 é diminuída com a idade em diversos tecidos, sendo o SNC um deles (Chen et. al., 2020). Assim, o SNC está sujeito a alterações no metabolismo energético durante o processo de envelhecimento, tendo o hipotálamo como influenciador direto neste processo (Tran et. al., 2022).

As alterações no balanço energético são uma das causas da inflamação no hipotálamo (Thuc et. al., 2017) e sabe-se que os processos inflamatórios aumentam com a idade (Santos et. al., 2018). Além disso, a inflamação está diretamente relacionada ao estado redox celular. Neste sentido, vale destacar que até pouco tempo atrás, as células gliais eram negligenciadas no estudo das funções cerebrais, porém, atualmente, acredita-se que tanto a microglia quanto os astrócitos são células fundamentais para os processos regulatórios do hipotálamo (Liu et. al., 2021). Em camundongos envelhecidos, além do aumento da resposta inflamatória, foram identificados astrócitos hipotalâmicos reativos e marcadores de senescência que podem contribuir para diversas patologias no SNC (Suda et. al., 2021). Esses processos são mediados pelo fator nuclear kappa B (NFκB), que induz a produção de citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (Zhang et. al., 2013).

Astrócitos hipotalâmicos podem responder a alguns hormônios metabólicos e neuropeptídeos, por estarem envolvidos em mecanismos fisiopatológicos (Chowen, 2016), sendo também suscetíveis a disfunções relacionadas com a idade (Salas, Burgado e Allen, 2020). Assim, o estudo das alterações no hipotálamo pode contribuir para o esclarecimento de mecanismos de diversas condições neurológicas, devido ao seu importante papel na regulação de funções cerebrais e periféricas.

## 1.2 ASTRÓCITOS

O SNC compreende dois tipos celulares, neurônios e células gliais (astrócitos, oligodendrócitos e microglia) e a interação entre elas é fundamental para a manutenção da homeostasia do SNC (Miller, 2018; Quincozes-Santos et. a., 2021). Entre as células gliais, os astrócitos são as mais abundantes e representam um grupo de células heterogêneas, com propriedades específicas, incluindo morfologia, funcionalidade e perfis de expressão gênica (Clasadonte e Prévot, 2018). Em 1895, Michael Von Lenhossék cunhou o nome astrócito pela morfologia dessas células, que histologicamente apresentam semelhança a uma estrela (Verkhratsky et. al., 2021).

Como funções dos astrócitos destacam-se: a regulação de íons extracelulares e neurotransmissores, como glutamato e ácido gama-aminobutírico (GABA), metabolismo energético, síntese e liberação de fatores tróficos, plasticidade sináptica, defesa antioxidante, resposta inflamatória e suporte metabólico para os neurônios (Bélanger, Allaman e Magistretti, 2011; Souza et. al., 2013; Quincozes-Santos et. al., 2021). Além disso, participam ativamente da comunicação entre células neurais por meio de um processo conhecido como gliotransmissão, o qual está diretamente relacionado com alterações nos níveis de cálcio ( $Ca^{2+}$ ) citosólico nos astrócitos (Chaboub e Deneen, 2013). Estas funções tornam os astrócitos células fundamentais evolutivamente e para o desenvolvimento do cérebro (Falcone, 2022).

Os astrócitos possuem a capacidade de reagir perante a estímulos, os quais podem causar mudanças estruturais e bioquímicas, processo que é comumente chamado de astrogliose reativa (Quincozes-Santos et. al., 2021). A proteína glial fibrilar ácida (GFAP), uma proteína que constitui os filamentos intermediários dos astrócitos, é utilizada como um marcador desse tipo celular, tendo sua expressão aumentada como indicador de astrogliose e correlacionada a doenças e/ou lesões cerebrais (Messing e Brenner, 2020). Além disso, dentre outras funções da GFAP

destacam-se processos de regeneração e plasticidade sináptica (Middeldorp e Hol, 2011). Em astrócitos maduros, a GFAP é considerada a principal proteína constituinte dos filamentos intermediários, sendo um dos principais componentes do citoesqueleto (Sukhorukova, Kruzhevskii e Alekseeva, 2015). No entanto, durante o desenvolvimento, outra proteína de filamentos intermediários, a vimentina, é expressa, porém é gradualmente substituída pela GFAP (Bramanti et. al., 2010). Isto também é identificado no processo de envelhecimento, onde a expressão da GFAP possui um aumento em relação aos astrócitos neonatos (Middeldorp e Hol, 2011).

Ainda referente a sua morfologia celular, os astrócitos possuem um citoesqueleto de actina que está diretamente relacionado a diversos processos, como motilidade, migração e adesão celular (Zigmond, 1996). Acredita-se que rearranjos no citoesqueleto de actina estejam associados a respostas celulares e biológicas relevantes a inúmeros estímulos extracelulares, alterando também funções astrocíticas, incluindo a sinalização do  $Ca^{2+}$ . Por fim, os astrócitos dispõem de uma citoarquitetura própria, permitindo assim, que eles se modifiquem conforme o ambiente com o intuito de melhor desempenhar as suas funções (Souza, 2013).

Com relação ao seu metabolismo, quando comparado aos neurônios, os astrócitos possuem um perfil metabólico considerado mais glicolítico, possuindo uma baixa taxa de metabolismo oxidativo, devido a sua alta captação de glicose pelo transportador de glicose GLUT1 e uma alta expressão de enzimas envolvidas na glicólise. Além disso, a glicose pode também ser direcionada para a síntese de glicogênio, via das pentoses fosfato ou ainda via da hexosamina (Quincozes-Santos et. al., 2017; Gonçalves et. al., 2019). Os astrócitos também possuem uma maior preferência pela conversão de piruvato a lactato, que será liberado no meio extracelular, ao invés da conversão de piruvato em acetil-CoA para a entrada no ciclo

do ácido tricarboxílico (TCA) (Bélanger, Allaman e Magistretti, 2011; Leloup et. al., 2016).

Os astrócitos hipotalâmicos também atuam como sensores metabólicos respondendo a estados nutricionais (Santos et. al., 2018), e em camundongos com superexpressão de SIRT1, identificou-se aumento significativo na ingestão de alimentos, bem como ganho de peso corporal e intolerância à glicose (Choi et. al., 2019).

Em relação a neurotransmissão, os astrócitos possuem papel fundamental na captação de glutamato, o principal neurotransmissor excitatório do SNC, sendo estas células as principais a captarem glutamato através dos transportadores GLAST (transportador glutamato-aspartato) e GLT1 (transportador de glutamato 1). Portanto, o metabolismo do glutamato prevalente nos astrócitos também está diretamente associado à manutenção dos níveis de glutamato no SNC e prevenção da excitotoxicidade (Mahmoud et. al., 2019). Além disso, após sua captação, o glutamato pode ser convertido em glutamina pela enzima glutamina sintetase (GS), um marcador importante do metabolismo astrocítico (Chaboub e Deneen, 2013), em uma reação dependente de ATP. Dessa forma, a enzima GS possui um papel fundamental na manutenção da homeostase do SNC, pois também regula a concentração de amônia, evitando assim a toxicidade e disfunções neurológicas relacionadas à hiperamonemia. Indicando a versatilidade dos astrócitos, a captação de glutamato também está relacionada à manutenção dos níveis de glutathione (GSH) (Souza et. al., 2013; Gonçalves et. al., 2019). Baseado nisso, a função protetora encontrada nos astrócitos contra o estresse oxidativo pode se dar por meio da sua atuação no metabolismo antioxidante da GSH. Essa molécula é conhecida por seu papel antioxidante devido ao grupo sulfidril da cisteína, um dos aminoácidos formadores da molécula, que

exerce papel de doador de elétrons (Quincozes-Santos e Gottfried, 2011). Para a síntese de GSH se faz necessária a enzima glutamato-cisteína ligase (GCL), etapa limitante da via (Guo et. al., 2018).

Durante o processo de envelhecimento, naturalmente ocorre aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e, conseqüentemente, de estresse oxidativo, sendo uma peça importante para doenças associadas à idade, por provocar diversos danos no tecido cerebral (Palmer e Ousman, 2018). Em algumas doenças, os astrócitos possuem a capacidade de produzir diversos mediadores pró-inflamatórios, como moléculas vasoativas, quimioatraentes, de adesão e citocinas (Zhang et. al., 2022). Como descrito anteriormente, acredita-se que os processos inflamatórios são mediados pela ativação do NFκB, que pode induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias, dentre elas TNF-α e interleucina-1β (IL-1β) e, através do aumento da produção destas citocinas, haverá uma estimulação para o aumento da atividade do próprio NFκB (Zhang et. al., 2013). Acredita-se também que o aumento da resposta inflamatória hipotalâmica envolva a microglia (Zhang et. al., 2013); contudo os astrócitos desta região podem provocar mudanças microgliais, resultando em um ciclo de *feedback* negativo (Bhusal, Rahman e Suk, 2022).

Dentre as técnicas mais utilizadas e relevantes para o campo da biologia celular, tem-se a cultura de células. O cultivo de astrócitos é uma importante ferramenta experimental para a identificação das funções bioquímicas, celulares, farmacológicas e moleculares desse tipo celular, contribuindo para o melhor entendimento do SNC (Guttenplan e Liddelow, 2019; Quincozes-Santos et. al., 2021). Muito do conhecimento sobre a funcionalidade astrocitária foi obtido com a utilização de culturas de células de animais neonatos (Souza et. al., 2013). No entanto, como característica do cérebro em maturação, animais neonatos apresentam células

neurais com maior capacidade plástica e menor grau de diferenciação que animais adultos e, dessa forma, quando submetidas a estímulos, podem responder de forma diferente que o tecido adulto (Quincozes-Santos et. al., 2021; Bobermin, 2020; Vizuete et. al., 2022; Santos et. al., 2023). Estas diferenças podem ser observadas, principalmente, em termos de funcionalidade celular. Nesse sentido, a cultura de astrócitos provenientes de cérebros adultos representa uma ferramenta importante no entendimento das funções gliais no cérebro maduro. No entanto, pouco se sabe sobre o papel dos astrócitos hipotalâmicos durante o envelhecimento. Recentemente, nosso grupo de pesquisa padronizou o cultivo de astrócitos hipotalâmicos de ratos Wistar na fase adulta (90 e 180 dias) e no envelhecimento, e várias diferenças na funcionalidade astrocitária foram observadas (Santos et al., 2018; Sovrani et. al., 2021; Santos et. al., 2023).

Baseado nestas diferenças, o meio extracelular proveniente das culturas de neonatos e de adultos pode conter diversos fatores, tanto tóxicos como protetores. Assim, a troca de meio extracelular (sobrenadante celular) entre culturas de neonatos e de adultos pode servir para identificar se estes fatores liberados influenciam parâmetros celulares, bioquímicos e moleculares. Com isso, a utilização da remodelação celular em células do SNC provenientes de animais neonatos e adultos pode contribuir para melhorar a compreensão de mecanismos patofisiológicos de doenças neurológicas (Saporta e Rehen, 2014), bem como a melhor compreensão do processo de envelhecimento.

### 1.3 ENVELHECIMENTO

Com o avanço da tecnologia e da medicina, a expectativa de vida tende a ser cada vez maior, gerando, possivelmente, uma sociedade envelhecida. Porém, a

existência de um número maior de pessoas com o envelhecimento não saudável está crescendo com relação ao número de pessoas com o envelhecimento saudável (Chen et. al., 2020). Até 2050 a estimativa de pessoas acima dos 65 anos irá subir de aproximadamente 8,2% (dados de 2015) para aproximadamente 15,9% (Mather, 2021). O envelhecimento, apesar de ser um processo natural e inevitável, possui características distintas de espécie para espécie nos seres vivos.

O envelhecimento é comumente associado a alterações em diversos processos homeostáticos, tal como diminuição de funções orgânicas importantes que podem levar a maior risco de morte. Campisi et. al. (2019) listam algumas vias e processos importantes que se alteram durante o processo de envelhecimento, como: via de sinalização semelhante a insulina, sirtuínas e NAD<sup>+</sup>, mitocôndrias e estresse oxidativo, senescência, inflamação crônica e perda de proteostase. Além disso, durante o processo de envelhecimento foi constatado que o cérebro humano apresenta algumas características específicas, como a diminuição da quantidade de oligodendrócitos (Fabricius, Jacobsen e Pakkenberg, 2013), diminuição da função mitocondrial e alteração na função imune (Bishop, Lu e Yankner, 2010), diminuição da regulação do metabolismo energético, da resistência ao estresse, e das funções de autofagia e estado metabólico (Liu et. al., 2019). Diversas doenças descritas como neurodegenerativas são associadas ao envelhecimento, como as doenças de Alzheimer, de Parkinson, de Huntington, entre outras (Azam et. al., 2021).

Neste sentido, a senescência celular caracteriza-se por um processo de parada do crescimento/ciclo celular, identificado no processo de envelhecimento, causando diversas alterações como aumento da inflamação, alteração da plasticidade, alterações metabólicas, declínio cognitivo, entre outras (Kuilman et. al., 2010; Görg et. al., 2014). Assim, a senescência está diretamente relacionada com uma diminuição

da capacidade funcional celular. Conhecida por ser um marcador de senescência, a proteína p21 é acumulada durante esse processo, sendo ativadora de vias relacionadas ao mesmo (Kuilman et. al., 2010). Em culturas de astrócitos adultos e envelhecidos, a p21 aparece sendo mais expressa do que em culturas de neonatos, caracterizando um processo natural durante o envelhecimento (Bobermin et. al., 2020).

A respeito do processo de envelhecimento astrocitário, identificou-se alteração em diversas funções, como o aumento de estresse oxidativo/nitrosativo com consequente aumento da disfunção mitocondrial, aumento da atividade NADPH oxidase (NOX) e aumento dos níveis de óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e superóxido (Bellaver et. al., 2017), bem como alterações nas funções da GFAP (Wu, Zhang e Yew, 2005; Salminen et. al., 2011; Coray, 2016; Clarke et. al., 2018; Palmer e Ousman, 2018). Assim como as alterações dependentes da idade já destacadas em diversos perfis neuroquímicos relacionados à função glutamatérgica, à biossíntese de GSH, ao metabolismo de glicose, ao suporte trófico e à resposta inflamatória (Santos et. al., 2018). Portanto, durante o processo de envelhecimento podem ocorrer significativas mudanças na funcionalidade astrocitária e sua característica heterogênea poderia favorecer o processo de envelhecimento.

Com relação a função astrocitária, existe uma alteração morfológica em indivíduos mais velhos comparados a mais novos (Palmer e Ousman, 2018) mostrada no hipocampo (Cerbai et. al., 2012), bem como alterações em vias de sinalização celular no hipotálamo (Santos et. al., 2018), em proteínas marcadoras de astrócitos e resposta inflamatória (Bellaver et. al., 2016).

Os astrócitos possuem a capacidade de identificar e amplificar sinais inflamatórios, inclusive provenientes da microglia e, a partir disto, desencadear



diversas respostas inflamatórias envolvendo a sinalização mediada pelo NFκB, além dos genes que estão sob seu controle (Zhang et. al., 2013). A neuroinflamação é uma consequência natural no envelhecimento, onde se destacam modificações em diversas vias de sinalização intracelular na promoção destas respostas inflamatórias (Bhusal, Rahman e Suk, 2022). A translocação do NFκB para o núcleo aumenta a expressão de citocinas pró-inflamatórias, e animais envelhecidos possuem maior expressão de NFκB que animais neonatos (Jiang e Cadenas, 2014). A partir do aumento da resposta inflamatória, funções neuroprotetoras anti-inflamatórias e antioxidantes serão induzidos para atenuar o quadro inflamatório.

A heme oxigenase-1 (HO-1) possui funções neuroprotetoras, em condições de estresse, como hipóxia e estresse oxidativo, com importante papel regulador sobre a ativação do NFκB (Quincozes-Santos et. al., 2014; Arús et. al., 2017). O aumento da atividade de HO-1 foi observado em processos de envelhecimento cerebral, bem como doenças neurodegenerativas (Chen, 2014).

Em relação ao hipotálamo, o processo de envelhecimento atua diretamente diminuindo suas funções, característica interessante visto que esta região possui uma conexão direta entre o sistema nervoso e a periferia (Kim e Choe, 2019). Durante o processo de envelhecimento, características como alterações no sono, no ritmo circadiano e na composição corporal estão diretamente associadas com disfunções hipotalâmicas. Nesse sentido, doenças neurodegenerativas associadas ao envelhecimento podem estar ligadas a atrofia na região hipotalâmica, uma vez que alterações no ritmo circadiano e no sono são distúrbios identificados na doença de Alzheimer (Hajdarovic, Yu e Webb, 2022).

Portanto, durante o processo de envelhecimento, o hipotálamo é uma região crucial, e o estudo da funcionalidade dos astrócitos hipotalâmicos pode contribuir para

o entendimento dos mecanismos fisiopatológicos de doenças neurometabólicas e neurodegenerativas associadas à idade (Ahima, 2009).

## 2 JUSTIFICATIVA

A constante busca por estratégias significativas para atenuar disfunções astrocitárias associadas ao processo de envelhecimento é extremamente relevante, uma vez que a manutenção da homeostase destas células é capaz de trazer proteção ao SNC. A utilização de culturas de astrócitos hipotalâmicos para estudar o processo de envelhecimento é uma estratégia metodológica para a melhor compreensão dos mecanismos envolvidos neste evento. A remodelação celular corresponde a modificações celulares, fazendo com que a célula mude suas características metabólicas e funcionais, e tais alterações podem contribuir para a modulação do processo de envelhecimento. Nesse sentido, é importante avaliar a possível remodelação astrocitária hipotalâmica *in vitro*, induzida pela exposição ao meio de cultura proveniente de células de animais mais jovens ou mais velhos, focando nas alterações funcionais e moleculares destas células. Com isso, busca-se identificar se os produtos liberados no meio extracelular por astrócitos neonatos possuem a capacidade de modular funcionalmente astrócitos obtidos de animais adultos, bem como se o meio extracelular de culturas de astrócitos de animais adultos altera a funcionalidade de astrócitos neonatos. Assim, o estudo da remodelação astrocitária hipotalâmica pode contribuir para a compreensão dos mecanismos fisiopatológicos associados ao processo de envelhecimento, bem como para o desenvolvimento de estratégias protetoras focadas na funcionalidade astrocitária.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a possível remodelação astrocitária hipotalâmica dependente da idade, bem como seus mecanismos, em culturas de astrócitos provenientes de ratos Wistar neonatos e adultos, a partir da troca de meio extracelular entre estas culturas.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a viabilidade de culturas de astrócitos frente à troca de meio extracelular, bem como de parâmetros associados ao metabolismo, como a liberação de lactato e a expressão de citrato sintase (CS);
- Avaliar parâmetros neuroquímicos como a expressão de GFAP, a atividade e expressão da enzima GS, os níveis de GSH e a expressão da GCL;
- Investigar a resposta inflamatória através dos níveis extracelulares e/ou da expressão do TNF- $\alpha$ , da IL-1 $\beta$ , e da interleucina-10 (IL-10), bem como da expressão da COX-2 e do NF $\kappa$ B;
- Avaliar a expressão de vias de sinalização como Nfr2, HO-1, SIRT1, AMPK, PGC-1 $\alpha$  e p21.

## **PARTE II**

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar machos neonatos (2 dias de idade) e adultos (90 dias de idade). Os animais neonatos foram provenientes do biotério do Departamento de Bioquímica da UFRGS, enquanto os animais adultos foram provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL), ambos mantidos no biotério do Departamento de Bioquímica da UFRGS. As condições padrão do biotério foram adotadas para a manutenção dos animais, que ficaram alojados em caixas de policarbonato de 365x207x140 mm, forradas com maravalha. A troca destas caixas foi feita 2 vezes por semana pelos funcionários do biotério, tal como o fornecimento de ração padrão para os roedores e água potável, que foi *ad libitum*. A partir da Resolução Normativa número 15 do CONCEA, o alojamento dos animais foi calculado, levando ainda em consideração a área necessária para o bem-estar animal, correlacionando com seu peso. Foram acomodados, por caixa, até 3 animais de 90 dias. A temperatura da sala do biotério é mantida a  $22 \pm 2$  °C e os animais foram mantidos em um ciclo claro/escuro de 12 horas controlado por fotoperíodo. Os cuidados com os animais seguiram as diretrizes governamentais conforme descreve a Federação das Sociedades Brasileiras para Biologia Experimental aprovadas pelo comitê de ética da UFRGS. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFRGS (nº 42857).

### 4.2 CULTURA PRIMÁRIA DE ASTRÓCITOS

As culturas primárias de astrócitos de animais neonatos e adultos foram realizadas com base no protocolo padronizado por Santos et. al. (2018). Os animais foram anestesiados com isoflurano 1-2% por via de administração inalatória (indução) e posteriormente foram decapitados para obtenção do tecido cerebral. O hipotálamo

foi removido e dissecado em condições assépticas em HBSS (Solução salina balanceada de Hanks). Um conjunto de três hipotálamos foi dissociado enzimaticamente em HBSS contendo tripsina (0,05%) a 37 °C por 7 min, dissociado mecanicamente com pipeta Pasteur por 7 min e centrifugado a 100×g por 5 min. O *pellet* foi ressuspendido em HBSS e novamente dissociado mecanicamente com pipeta Pasteur até completa homogeneização. Após nova centrifugação (100×g por 5 min), as células foram ressuspendidas em meio de cultura DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F12) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), HEPES (15 mM), NaHCO<sub>3</sub> (14.3 mM), anfotericina B (2,5 µg/mL) e gentamicina (0,05 mg/mL) e semeadas a uma densidade de 2-4x10<sup>5</sup> células/cm<sup>2</sup> em placas de cultura de 24 ou 6 poços previamente revestidas com poli-L-lisina. Após 24 h, foi realizada a primeira troca de meio. Durante a primeira semana, o meio foi trocado a cada 2 dias, e a partir da segunda semana, a cada 4 dias. Estas trocas de meio de manutenção das culturas eram realizadas removendo-se o meio dos poços e substituindo-o por DMEM/F12 contendo 10% SFB (conforme descrito acima) fresco. As células foram cultivadas em uma incubadora a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> até atingirem a confluência ao redor dos 30 dias de cultivo.

#### 4.3 DESENHO EXPERIMENTAL

Ao atingirem a confluência, foi realizada a última troca de meio de manutenção das culturas de astrócitos de animais neonatos e adultos utilizando DMEM/F12 com 10% de SFB fresco, onde as células foram mantidas por 4 dias. Após esse período, o meio extracelular (sobrenadante) das culturas de astrócitos de ambas as idades foi coletado e reservado. As culturas foram então divididas 4 grupos experimentais:

- **Grupo Controle Neonato:** astrócitos de animais neonatos que tiveram seu meio de cultura trocado normalmente e ficaram expostas ao meio novo por 24 h adicionais. Ao

final deste período, foram realizadas as coletas das amostras em tampões/reagentes específicos para cada técnica.

- **Grupo Controle Adulto:** astrócitos de animais adultos que tiveram seu meio de cultura trocado normalmente e ficaram expostas ao meio novo por 24 h adicionais. Ao final deste período, foram realizadas as coletas das amostras em tampões/reagentes específicos para cada técnica.

- **Grupo Neonato + sobrenadante proveniente das culturas de astrócitos de animais adultos:** astrócitos de animais neonatos que tiveram o seu meio de cultura substituído pelo sobrenadante obtido dos astrócitos de animais adultos, por um período de 24 h. Ao final deste período, foram realizadas as coletas das amostras em tampões/reagentes específicos para cada técnica.

- **Grupo Adulto + sobrenadante proveniente das culturas de astrócitos de animais neonatos:** astrócitos de animais adultos que tiveram o seu meio de cultura substituído pelo sobrenadante obtido dos astrócitos de animais neonatos, por um período de 24 h. Ao final deste período, foram realizadas as coletas das amostras em tampões/reagentes específicos para cada técnica



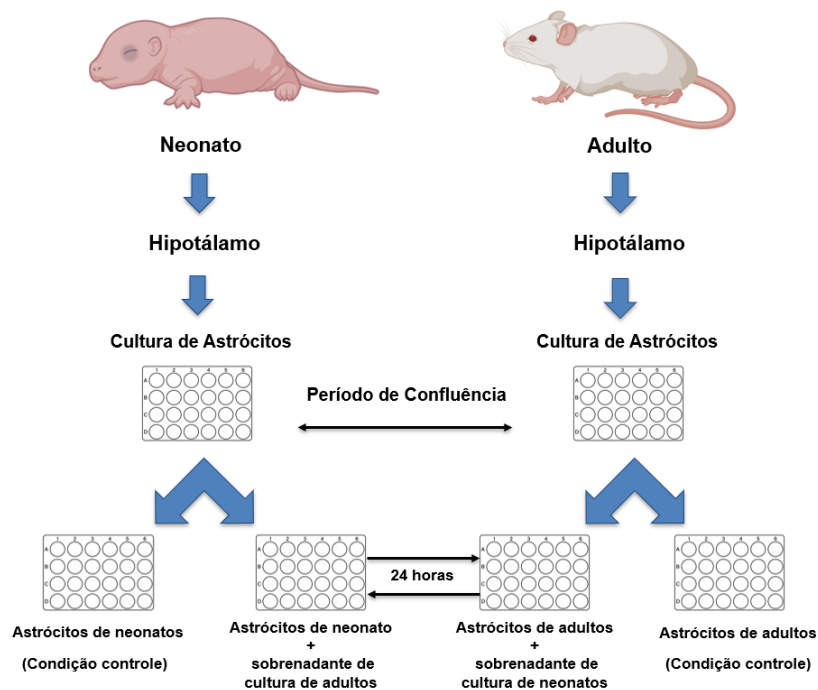


Figura 1. Desenho experimental. A figura foi construída usando o programa BioRender.

#### 4.4 VIABILIDADE, INTEGRIDADE E MORFOLOGIA CELULAR

O ensaio de redução do sal de tetrazólio (MTT), foi utilizado para a avaliação da viabilidade celular das culturas hipotalâmicas. O método visa identificar a viabilidade celular pela atividade de enzimas desidrogenases que estão presentes nas células, principalmente nas mitocôndrias, através da geração de um composto de cor púrpura que é avaliado por espectrofotometria. Resumidamente, 3 h antes do término do período de incubação (protocolo experimental da troca de meio entre as culturas por 24 h), o MTT foi incubado a uma concentração final 50 µg/mL e as células foram mantidas por 3 h a 37 °C e 5% CO<sub>2</sub>. Após, os cristais de Formazan (produtos da redução do MTT) foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO). A absorbância foi medida em 560 e 630 nm e a viabilidade celular foi representada em porcentagem relativa ao respectivo controle.

#### 4.5 DETERMINAÇÃO DE LACTATO

Os níveis de lactato foram avaliados por meio de kit comercial (Bioclin, Brasil) para a quantificação desse metabólito. Foram utilizados 100 µL de meio extracelular coletado após o período de 24 h do protocolo de troca de meio entre as culturas. A absorbância das amostras foi avaliada a 340 nm e, a partir da absorbância do padrão fornecido no kit, as concentrações de lactato foram calculadas.

#### 4.6 EXTRAÇÃO DE RNA E RT-PCR QUANTITATIVO

A partir da cultura de astrócitos, o RNA foi extraído utilizando o reagente TRIzol. A concentração e a pureza do RNA extraído foram determinadas espectrofotometricamente a partir da razão 260:280. Então, 0,15 µg de RNA total foi transcrito reversamente para obtenção do DNA complementar (cDNA) utilizando o kit de Transcrição Reversa de Alta Capacidade da Applied Biosystems. A quantificação do RNA mensageiro (RNAm) de AMPK (Rn00576935\_m1), β-actina (#Rn00667869\_m1), COX-2 (Rn01483828\_m1), CS (Rn01774376\_g1), GCL (Rn00689046\_m1), GFAP (Rn00566603\_m1), GS (Rn01483107\_m1), HO-1 (Rn01536933\_m1), IL-1β (Rn00580432\_m1), IL-10 (Rn00563409\_m1), NFκB p65 (Rn01502266\_m1), Nrf2 (Rn00582415\_m1), PGC-1α (Rn00580241\_m1), p21 (Rn00589996\_m1), SIRT1 (Rn01428096\_m1) e TNF-α (Rn99999017\_m1) foi realizada utilizando-se o sistema PCR em tempo real QuantiStudio 1 e as sondas TaqMan listadas acima, adquiridos da Applied Biosystems. Os níveis de RNAm alvos foram normalizados pelos níveis de β-actina. Os resultados foram analisados empregando o método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  e expressos em relação aos níveis dos respectivos controles.

#### 4.7 ATIVIDADE DA GLUTAMINA SINTETASE (GS)

A técnica foi realizada conforme descrito previamente por Dos Santos et. al. (2006). As células foram lisadas em KCl 0,15 M e ao homogeneizado celular foi adicionada uma mistura de reação contendo: MgCl<sub>2</sub> 10 mM, L-glutamato 50 mM, tampão imidazol-HCl (pH 7,4) 100 mM, 2-mercaptoetanol 10 mM, hidroxilamina-HCl 50 mM e ATP 10 mM. A reação foi incubada por 15 minutos a 37°C e, após, foi parada pela adição de uma solução contendo cloreto férrico 370 mM, HCl 670 mM e ácido tricloroacético 200 mM. Sequencialmente à centrifugação, a absorbância do sobrenadante foi medida a 530 nm. Uma curva-padrão preparada com  $\gamma$ -glutamilhidroxamato tratada com cloreto férrico foi realizada e utilizada para o cálculo da atividade da GS nas amostras, expresso em  $\mu\text{mol/mg}$  proteína/h.

#### 4.8 CONTEÚDO DE GLUTATIONA (GSH)

Utilizou-se o protocolo de Browne & Armstrong (1998). Em suma, as células foram homogeneizadas em 100 mM tampão fosfato de sódio (pH 8,0) contendo EDTA 5 mM e as proteínas foram, então, precipitadas com ácido metafosfórico a 1,7%. Após, a centrifugação, o sobrenadante foi incubado com o-ftaldialdeído (1 mg/ml em metanol) a temperatura ambiente durante 15 minutos. Após, a fluorescência foi medida usando comprimentos de onda de excitação e emissão de 350 e 420 nm respectivamente. Com soluções padrão de GSH (0 - 500  $\mu\text{M}$ ) foi feita a curva de calibração. O conteúdo intracelular de GSH foi expresso em nmol/mg de proteína.

#### 4.9 NÍVEIS DE TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-10

A metodologia de ELISA (do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) foi utilizada para avaliar os níveis extracelulares de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-10, utilizando-se kits comerciais da Invitrogen (Thermo Scientific). Os procedimentos foram realizados conforme as instruções do fabricante.

#### 4.10 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

A quantificação das proteínas foi realizada utilizando o método de Lowry (Lowry et. al., 1951) com albumina bovina como padrão.

#### 4.11 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados coletados foram expressos como a média  $\pm$  desvio padrão (D.P.) de pelo menos cinco experimentos independentes. Os grupos foram analisados estatisticamente utilizando o teste t de Student. Foram considerados significativos valores de  $P < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

### 5.1 EFEITOS DA TROCA DE MEIO DE CULTIVO ENTRE CULTURAS DE ASTRÓCITOS HIPOTALÂMICOS DE ANIMAIS NEONATOS E ADULTOS SOBRE PARÂMETROS METABÓLICOS E MITOCONDRIAIS

Após atingirem a confluência, o meio extracelular foi coletado e reservado, considerando que a última troca de meio de cultivo aconteceu 4 dias antes da troca de sobrenadantes entre as culturas de astrócitos de animais neonatos e adultos. Neste dia, os grupos controles de ambas as idades tiveram seu meio trocado normalmente por um meio novo. As células tiveram uma exposição final de 24 h ao sobrenadante substituído e em seguida os experimentos foram realizados (vide desenho experimental acima). Com isso, buscamos identificar se os produtos liberados no meio extracelular possuem a capacidade de modificar funcionalmente e/ou alterar parâmetros neuroquímicos dos astrócitos.

Assim, primeiramente foi avaliada a viabilidade celular, por meio da metodologia de MTT. A redução do MTT está associada a funcionalidade das desidrogenases mitocondriais, todavia não encontramos alterações significativas na redução do MTT em nenhum dos grupos nos quais a troca de sobrenadantes foi realizada comparado aos seus respectivos grupos controle (Fig. 2A), o que indica que a troca de sobrenadantes entre os grupos não foi capaz de modificar a viabilidade celular nos astrócitos hipotalâmicos.

Após, foi avaliada a liberação de lactato, o qual está diretamente associado ao metabolismo glicolítico, sendo um de seus produtos. Os dados indicam que no grupo neonato + sobrenadante das culturas de animais adultos houve um aumento significativo ( $P = 0,0188$ ) na liberação de lactato comparado ao seu respectivo grupo controle (Fig. 2B). No entanto, no grupo adulto + sobrenadante das culturas de animais

neonatos não houve uma mudança significativa na produção de lactato em relação ao respectivo grupo controle adulto.

O TCA é uma das principais vias de produção de energia, tendo a CS como uma enzima primordial no início e na regulação do ciclo. Um aumento significativo da expressão da CS ( $P = 0,0069$ ) foi observado no grupo neonato que recebeu o sobrenadante das culturas de adultos quando comparado ao controle (Fig. 2C). Não foram identificadas alterações significativas na expressão da CS no grupo adulto que recebeu o sobrenadante das culturas de neonato.

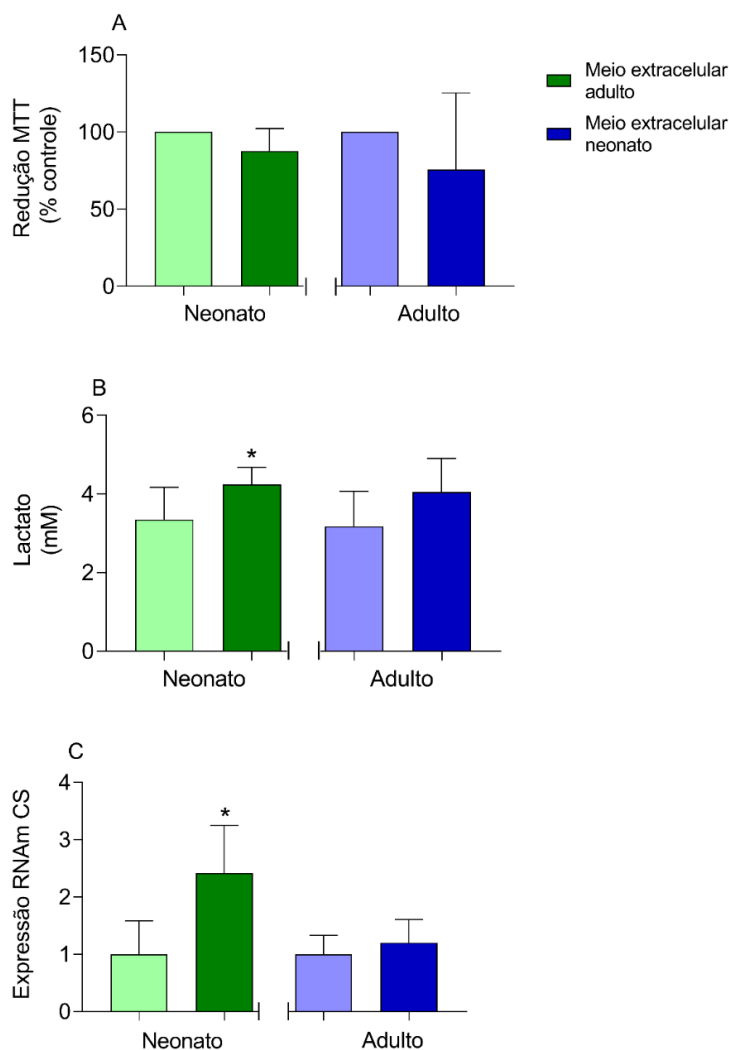


Figura 2. Efeitos da troca de meio extracelular entre as culturas hipotalâmicas de neonatos e adultos sobre a viabilidade celular (A), liberação de lactato (B) e expressão da CS (C). Os dados representam a média  $\pm$  D.P. de 5 experimentos ( $n=5$ ) independentes de MTT, 8 experimentos ( $n=8$ ) independentes na liberação de lactato e de 6 experimentos ( $n=6$ ) independentes da expressão de CS. As diferenças entre os grupos foram analisadas estatisticamente usando test t de Student. \* indica diferença em relação à respectiva condição controle ( $P < 0,05$ ).

## 5.2 EFEITOS DA TROCA DE MEIO ENTRE CULTURAS DE ASTRÓCITOS HIPOTALÂMICOS DE ANIMAIS NEONATOS E ADULTOS SOBRE PARÂMETROS ASTROGLIAIS

A GFAP é uma proteína chave do citoesqueleto astrocitário, sendo encontrada nos filamentos intermediários (Hol e Pekny, 2015). Não foi identificada alteração significativa na expressão de GFAP quando comparamos o grupo adulto + sobrenadante proveniente das culturas de animais neonatos com o grupo controle adulto, bem como também não encontramos alteração significativa quando comparamos o grupo neonato + sobrenadante proveniente das culturas de animais adultos com o grupo controle neonato (Fig. 3A).

A GS é um importante marcador astrocitário, sendo uma enzima associada ao metabolismo do glutamato. Ela catalisa a formação de glutamina a partir de glutamato e amônia em uma reação dependente de ATP (Rosa, Verkhatsky e Parpura, 2013). Em ambos os grupos onde a troca de meio extracelular foi realizada não foram observadas mudanças significativas na atividade da GS em relação aos seus respectivos controles (Fig. 3B). Ao avaliar a sua expressão, também não identificamos alterações significativas (Fig. 3C).

A GSH é encontrada em altos níveis no SNC, possuindo um papel importante na defesa antioxidante (Kim, 2021). Entretanto, não houve alterações significativas no seu conteúdo em resposta às trocas de sobrenadantes, tanto nos astrócitos de animais neonatos, quanto nos astrócitos de animais adultos comparados aos seus respectivos grupos controle (Fig. 3D).

A enzima GCL é conhecida por seu papel antioxidante por participar da síntese de GSH, sendo a enzima limitante do processo. Os resultados também apontam uma

ausência de alteração na expressão de GCL nos grupos que tiveram troca de sobrenadantes comparado aos seus respectivos grupos controle (Fig. 4E).

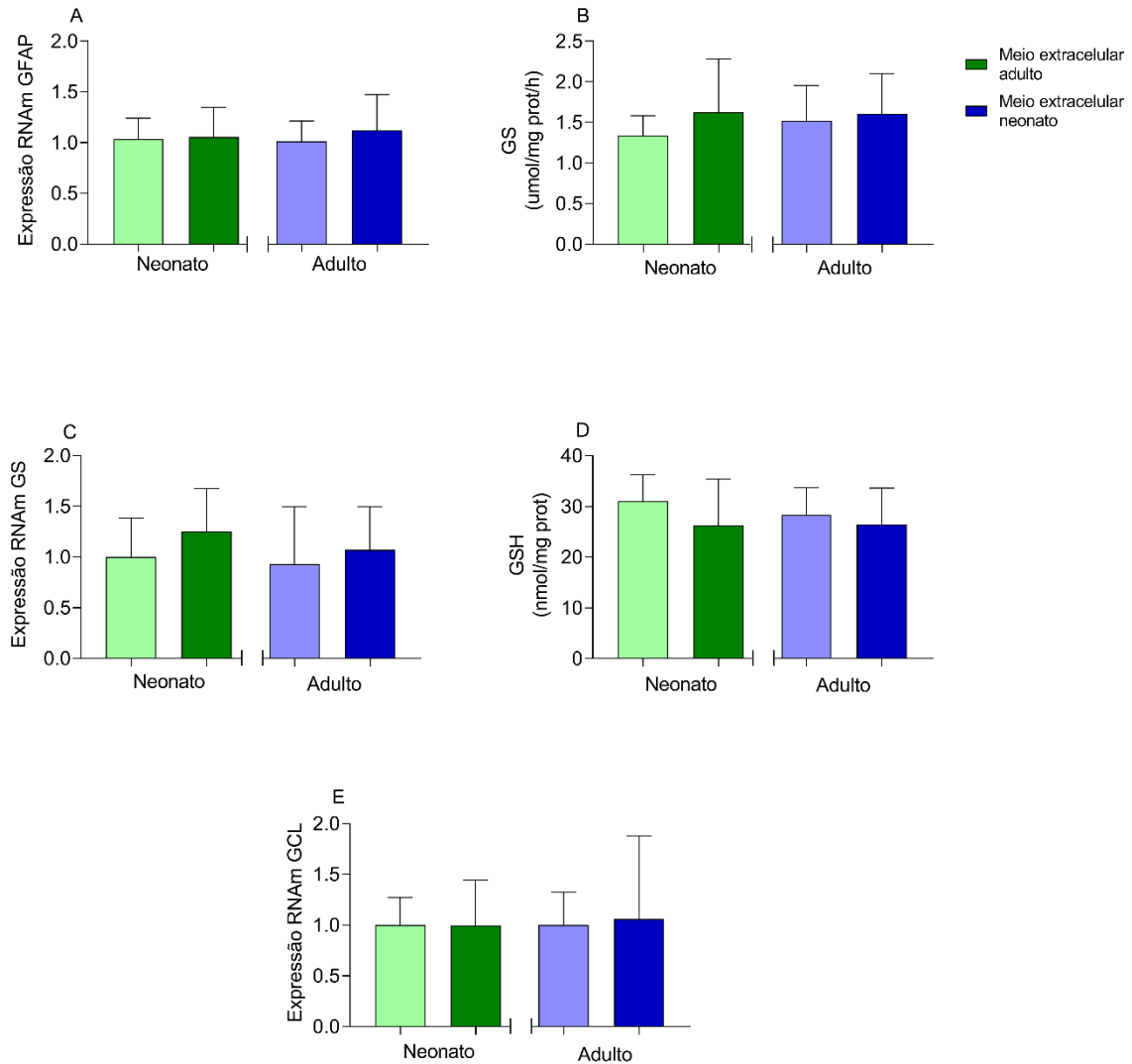


Figura 3. Efeitos da troca de meio extracelular entre as culturas hipotalâmicas de neonatos e adultos na expressão de GFAP (A), na atividade da GS (B), na expressão da GS (C), no conteúdo de GSH (D) e na expressão da GCL (E). Os dados representam a média  $\pm$  D.P. de 7 experimentos ( $n=7$ ) independentes. As diferenças entre os grupos foram analisadas estatisticamente usando test t de Student.

### 5.3 ALTERAÇÕES NO PROCESSO INFLAMATÓRIO DECORRENTES DA REMODELAÇÃO ASTROCITÁRIA

Os astrócitos participam ativamente da resposta inflamatória, pois produzem e/ou secretam mediadores inflamatórios. No grupo neonato + sobrenadante das



culturas provenientes de animais adultos houve um aumento significativo tanto na liberação ( $P < 0,0001$ ), quanto nos níveis de RNAm ( $P < 0,0001$ ) de TNF- $\alpha$  comparado ao grupo controle neonato (Fig. 4A e B, respectivamente). Já no grupo adulto + sobrenadante das culturas provenientes de animais neonatos houve uma diminuição significativa da liberação de TNF- $\alpha$  ( $P = 0,0015$ ) em comparação ao grupo controle adulto, bem como dos níveis de RNAm ( $P = 0,0211$ ) (Fig. 4B).

Em relação a IL-1 $\beta$ , um aumento significativo da sua liberação ( $P < 0,0001$ ) e expressão ( $P = 0,0006$ ) também foi identificado nos astrócitos neonatos expostos com o sobrenadante das culturas provenientes de animais adultos (Fig. 4C e D). No entanto, uma diminuição significativa tanto da liberação ( $P = 0,001$ ), quanto da expressão de IL-1 $\beta$  ( $P < 0,0001$ ) foi identificada no grupo adulto + sobrenadante das culturas provenientes de animais neonatos com relação ao grupo controle adulto.

Em relação à IL-10, que possui função anti-inflamatória, houve um aumento da sua liberação ( $P = 0,0011$ ), mas não de seus níveis de RNAm, no grupo neonato + sobrenadante das culturas provenientes de animais adultos comparado ao grupo controle neonato (Fig. 4E e F, respectivamente). Porém, não foram identificadas alterações significativas na IL-10 nos astrócitos adultos incubados com o sobrenadante das culturas provenientes de animais neonatos.

A COX-2 é uma enzima altamente expressa em situações pró-inflamatórias. Foram observadas alterações significativas na expressão de COX-2, especificamente um aumento no grupo neonato que recebeu o sobrenadante das culturas de adultos ( $P < 0,0001$ ) e uma diminuição no grupo adulto que recebeu o sobrenadante das culturas de neonatos ( $P = 0,0003$ ), comparado aos respectivos grupos controle (Fig. 4G).

O NFκB possui uma gama de funções nos sistemas biológicos, incluindo o controle da resposta inflamatória e expressão de citocinas. Nas células cerebrais, a subunidade p65 é altamente expressa (Dresselhaus e Meffert, 2019). Nossos resultados mostram um aumento significativo na expressão de NFκB ao comparar o grupo neonato + sobrenadante das culturas provenientes de animais adultos com o grupo controle neonato ( $P < 0,0001$ ) (Fig. 4H). Porém, não foram encontradas alterações significativas entre o grupo controle adulto comparado ao grupo adulto + sobrenadante das culturas provenientes de animais neonatos.

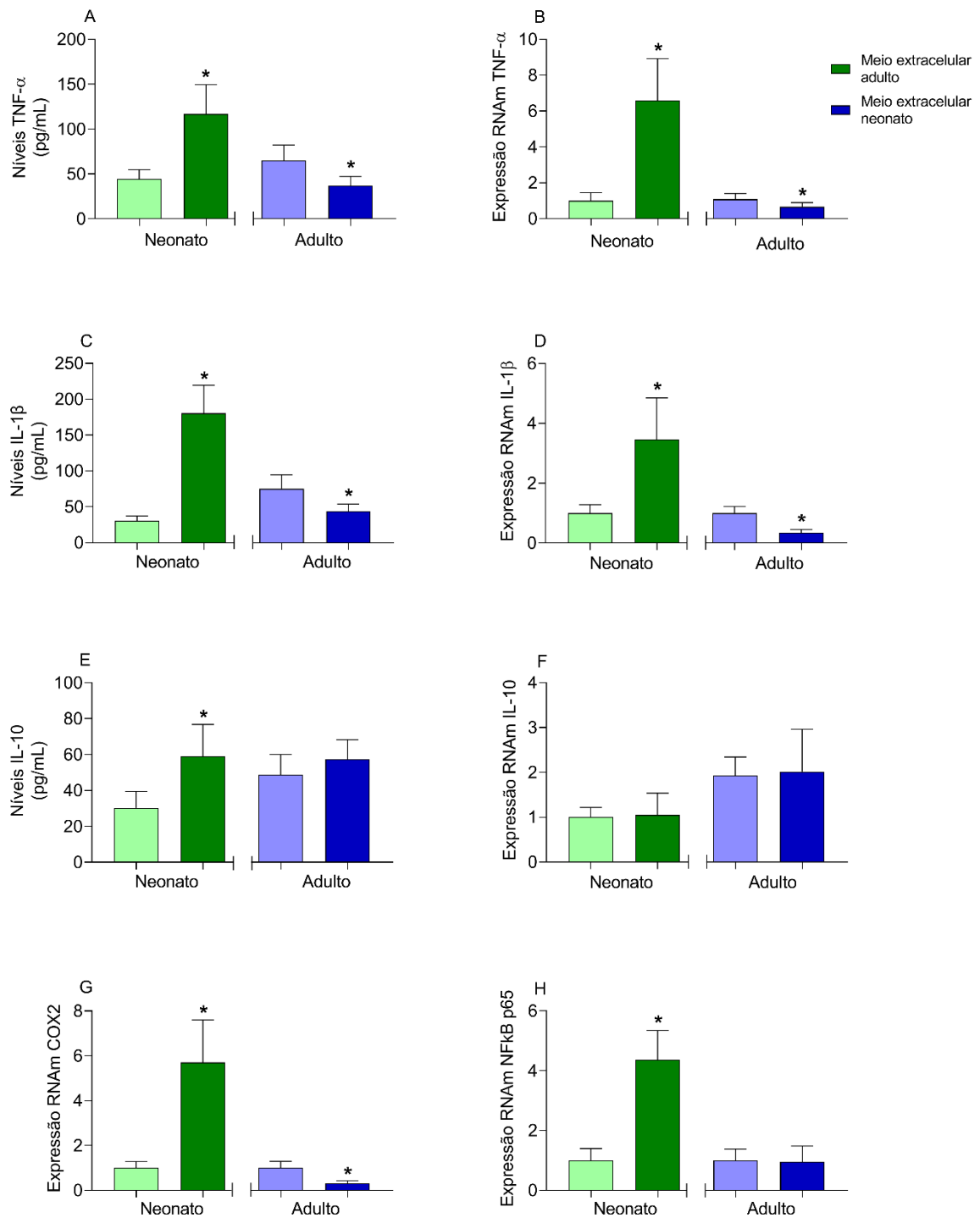


Figura 4. Efeitos da troca de meio extracelular entre as culturas hipotálamicas de neonatos e adultos na liberação (A) e na expressão (B) de TNF- $\alpha$ , na liberação (C) e expressão (D) de IL-1 $\beta$ , na liberação (E) e expressão (F) de IL-10, COX-2 (G) e NF $\kappa$ B p65 (H). Os dados representam a média  $\pm$  D.P. de 8 experimentos (n=8) independentes para a liberação de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-10 e de 7 experimentos (n=7) independentes para a expressão de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-10, COX-2 e NF $\kappa$ B p65. As diferenças entre os grupos foram analisadas estatisticamente usando test t de Student. \* indica diferença em relação à respectiva condição controle (P < 0,05).

#### 5.4 EFEITOS DA TROCA DE SOBRENADANTE SOBRE MECANISMOS DE SINALIZAÇÃO CELULAR ASTROCITÁRIOS

O Nrf2 é conhecido por regular diversos genes envolvidos com respostas antioxidantes e anti-inflamatórias, inclusive em astrócitos (Liddell, 2017). Foi observado um aumento significativo no grupo neonato + sobrenadante das culturas provenientes de animais adultos ( $P = 0,0023$ ) comparado ao grupo controle neonato (Fig. 5A). Porém, a expressão de Nrf2 no grupo adulto + sobrenadante das culturas provenientes de animais neonatos não foi afetada.

A enzima HO-1 é um dos alvos transcricionais do Nrf2. Nossos resultados mostram um aumento significativo na expressão de HO-1 ( $P = 0,0003$ ) no grupo neonato + sobrenadante das culturas provenientes de animais adultos em relação ao grupo controle neonato (Fig. 5B). No entanto, não houve alteração significativa entre os grupos adulto controle e adulto + sobrenadante das culturas provenientes de animais neonatos.

A SIRT1 é uma desacetilase que participa tanto de funções anti-inflamatórias, quanto nos processos metabólicos (Zhang et. al., 2022). Similarmente, houve um aumento significativo da expressão de SIRT1 no grupo neonato que recebeu o sobrenadante das culturas de adultos ( $P = 0,0202$ ) comparando ao seu grupo controle neonato (Fig. 5C), mas não foram observadas alterações significativas na expressão de SIRT1 no grupo adulto que recebeu o sobrenadante de astrócitos neonatos.

A AMPK atua como sensor de energia em diversas células do organismo e, em astrócitos, ela possui a capacidade de regular vias energéticas importantes como a glicólise, bem como outras vias metabólicas (Voss et. al., 2020). Houve aumento significativo na expressão de AMPK tanto no grupo neonato que recebeu o sobrenadante das culturas de adultos ( $P = 0,0255$ ), quanto no grupo adulto que

recebeu o sobrenadante das culturas de neonatos ( $P = 0,0333$ ), quando comparado com seus respectivos grupos controle (Fig. 5D).

A respeito funcionalidade mitocondrial, o PGC-1 $\alpha$  é identificado como um regulador chave nos processos de biogênese. Com relação a sua expressão, não foram observadas alterações significativas no grupo neonato + sobrenadante das culturas provenientes de animais adultos comparado ao seu grupo controle (Fig. 5E). No entanto, verificou-se um aumento significativo no grupo adulto + sobrenadante das culturas provenientes de animais neonatos, comparado ao seu grupo controle ( $P = 0,0003$ ).

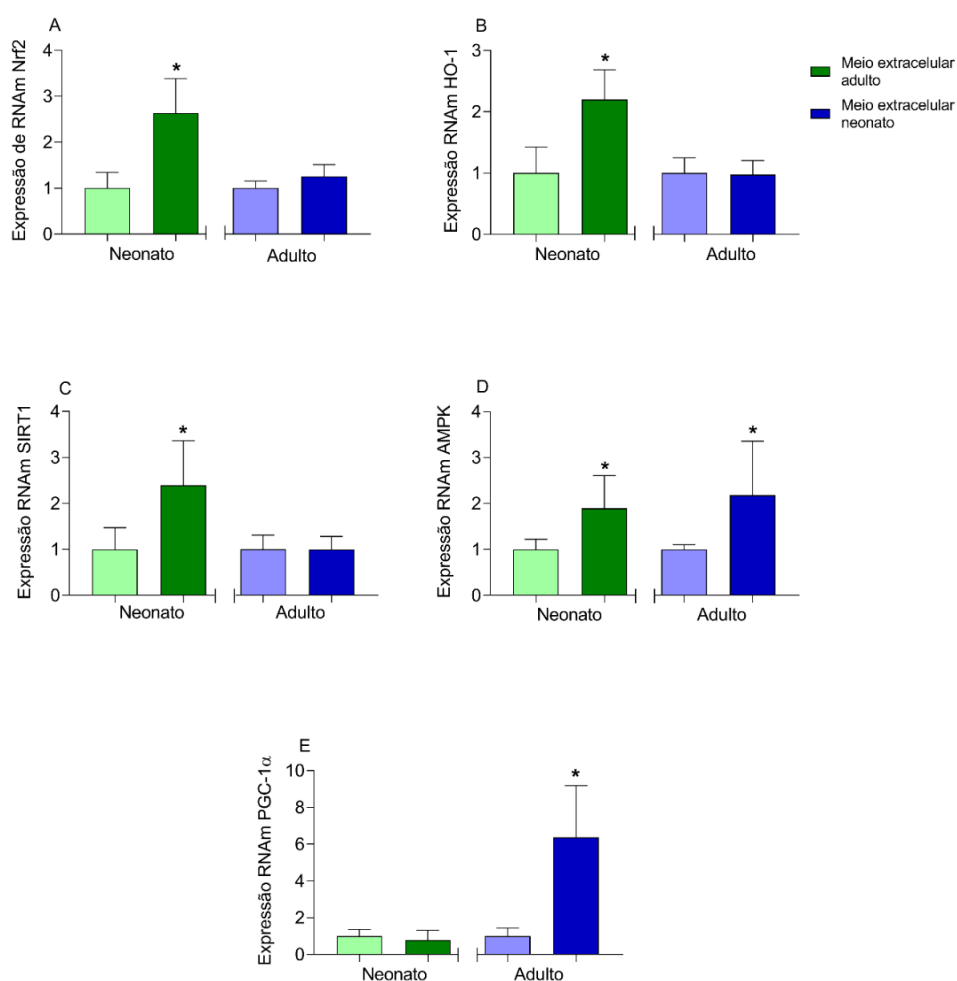


Figura 2. Efeitos da troca de meio extracelular entre as culturas hipotalâmicas de neonatos e adultos na expressão de Nrf2 (A), HO-1 (B), SIRT1 (C), AMPK (D) e PGC-1 $\alpha$  (E). Os dados representam a média  $\pm$  D.P. de 7 experimentos (n=7) independentes. As diferenças entre os grupos foram analisadas estatisticamente usando test t de Student. \* indica diferença em relação à respectiva condição controle ( $P < 0,05$ ).

## 5.5 TROCA DE SOBRENADANTE MODULA A EXPRESSÃO DO MARCADOR DE SENESCÊNCIA p21

A indução de senescência em astrócitos parece estar diretamente relacionada com a expressão de p21 (Villaseñor et. al., 2019). A expressão de p21 foi alterada significativamente nos grupos com troca de sobrenadantes comparados aos grupos controle. Foi identificado um aumento significativo no grupo neonato + sobrenadante das culturas provenientes de animais adultos ( $P = 0,0104$ ), enquanto no grupo adulto + sobrenadante das culturas provenientes de animais neonatos houve uma diminuição ( $P < 0,0001$ ) da expressão de p21 (Fig. 6).

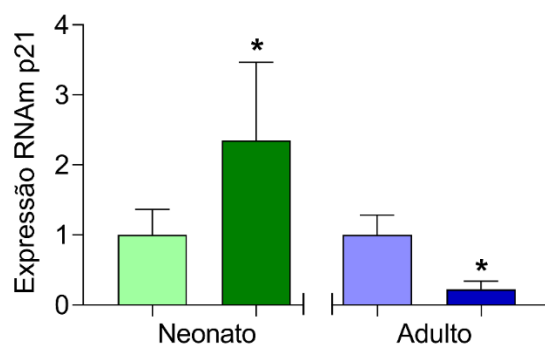


Figura 6. Efeitos da troca de meio extracelular entre as culturas hipotalâmicas de neonatos e adultos na expressão de p21. Os dados representam a média  $\pm$  D.P. de 7 experimentos ( $n=7$ ) independentes. As diferenças entre os grupos foram analisadas estatisticamente usando test t de Student. \* indica diferença em relação à respectiva condição controle ( $P < 0,05$ ).

## **PARTE III**

## 6 DISCUSSÃO

Nesta sessão, serão correlacionados e discutidos os resultados obtidos e descritos anteriormente nas culturas de astrócitos hipotalâmicos submetidos à troca de meio extracelular. Os dados obtidos auxiliarão na melhor compreensão e entendimento da possível remodelação funcional, dependente da idade, de astrócitos hipotalâmicos.

Um cérebro adulto possui astrócitos maduros que têm por característica conexões já bem estruturadas, tal como maior nível de organização quando comparados aos astrócitos de neonatos, os quais são mais plásticos e sensíveis a estímulos e modulações, além de demonstrarem atividades metabólicas diferentes (Souza et. al., 2013; Bobermin et. al., 2020). Estas diferenças podem ser observadas, principalmente, em termos de funcionalidade celular. Durante o processo de envelhecimento, diversos parâmetros da homeostase sofrem alterações, e essas diminuições nas funções do organismo aumentam o risco de morte. Estas mesmas alterações poderão tornar os astrócitos mais sensíveis à inflamação, bem como induzir a inflamação crônica, característica do envelhecimento e, com isso, a capacidade de adaptação das células frente ao ambiente é diminuída (Bobermin et. al., 2022). A troca de sobrenadantes entre as culturas hipotalâmicas de neonatos e adultos visa identificar se os diversos fatores liberados no meio extracelular poderiam afetar a funcionalidade das células astrocitárias em diferentes idades, influenciando na remodelação em aspectos metabólicos, inflamatórios, parâmetros astrogliais e perfil de senescência.

A respeito dos parâmetros metabólicos e mitocondriais, as trocas de sobrenadantes não causaram alterações estatisticamente significativas na viabilidade celular das culturas de astrócitos hipotalâmicos neonatos e adultos (exposição por 24



horas dos astrócitos de animais neonatos ao meio de cultura dos astrócitos adultos, bem como dos astrócitos adultos ao meio de cultura dos astrócitos neonatos). Todavia, nossos resultados apontaram um aumento significativo da liberação de lactato, um produto da glicólise, nos astrócitos neonatos expostos ao sobrenadante dos astrócitos adultos, sem alterações significativas nos astrócitos adultos expostos ao meio dos neonatos. Como já demonstrado por Santos et. al. (2018), a liberação de lactato aumenta em astrócitos hipotalâmicos adultos em comparação aos astrócitos neonatos, indicando um efeito da idade sobre esse parâmetro metabólico astrocitário. Com isso, podemos considerar que o sobrenadante das culturas dos animais adultos influenciou na liberação de lactato pelas culturas de animais neonatos, possivelmente através do aumento do metabolismo glicolítico frente ao estímulo da troca de sobrenadante.

Em relação ao metabolismo oxidativo mitocondrial, a CS é a primeira enzima do TCA, sendo a enzima conversora de oxaloacetato e acetil-CoA em citrato. Acredita-se que os astrócitos tenham um aumento do metabolismo oxidativo com a idade, tendo a resposta inflamatória como um estímulo para dar suporte energético à célula durante o processo de envelhecimento (Jiang e Cadenas, 2014). Nossos resultados demonstraram apenas um aumento da expressão da CS nos astrócitos neonatos expostos ao meio dos astrócitos adultos, ou seja, esse resultado aponta um possível efeito de fatores liberados pelos astrócitos adultos sobre o metabolismo oxidativo dos neonatos sinalizando um aumento da expressão da CS. Esse dado corrobora com o aumento da liberação de lactato, como forma de modulação do metabolismo energético frente aos estímulos provenientes da cultura de astrócitos hipotalâmicos dos animais adultos.

Em relação aos marcadores do citoesqueleto de astrócitos, como a GFAP, não observamos alterações significativas na sua expressão em ambos os grupos que receberam o sobrenadante comparado aos seus respectivos grupos controle. Também não observamos alterações na atividade e expressão do RNAm da GS, uma importante enzima marcadora de função astrocitária (Chaboub e Deneen, 2013).

Considerando que o glutamato também serve como precursor para a síntese de GSH, avaliamos também os níveis de GSH nos astrócitos submetidos à troca de sobrenadante. A regulação da homeostase no SNC pelos astrócitos ocorre também pela produção de defesas antioxidantes, sendo a GSH a principal molécula neste processo. No entanto, nossos dados também não demonstraram alterações significativas no conteúdo de GSH intracelular tanto nas culturas de animais neonatos, quanto nas culturas de animais adultos, indicando que as trocas dos sobrenadantes podem não alterar o metabolismo de GSH. Ainda sobre a biossíntese de GSH, a GCL é uma importante enzima que possui uma diminuição da sua atividade em astrócitos maduros em comparação a neonatos (Santos, 2018). Vale ressaltar que a expressão do RNAm da GCL não foi alterada significativamente em nenhum grupo que recebeu a troca de sobrenadantes, correlacionando, portanto, com a ausência de alteração nos níveis de GSH, visto que a GCL é a enzima limitante da sua formação (Guo et. al., 2018).

Os nossos resultados demonstraram que a exposição das culturas de astrócitos de neonatos ao sobrenadante dos astrócitos adultos resultou em um aumento significativo na liberação de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Esses dados também foram verificados em relação à expressão de RNAm destas duas citocinas. Ou seja, culturas de astrócitos adultos parecem liberar fatores com potencial de aumentar a resposta inflamatória em células mais jovens, como os astrócitos obtidos de animais neonatos.

Entretanto, quando adicionado o sobrenadante das culturas de neonatos nas culturas de adultos, identificou-se uma diminuição significativa na liberação de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , que também foi acompanhada de uma diminuição da expressão do RNAm de ambas as citocinas. Sabe-se que o TNF- $\alpha$  é a primeira citocina que atuará na produção das demais citocinas pró-inflamatórias (Bobermin, Roppa e Quincozes-Santos, 2019) e, durante o envelhecimento, a inflamação no hipotálamo está diretamente relacionada às células gliais (Suda et. al., 2021). Assim, esses resultados indicam que os produtos da atividade celular de astrócitos neonatos podem diminuir a expressão de citocinas relacionadas aos processos pró-inflamatórios em culturas de astrócitos adultos, evidenciando um efeito de remodelação protetora.

Como descrito acima, em condições inflamatórias, identifica-se um aumento na produção de algumas citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Como consequência, pode ocorrer a ativação do NF $\kappa$ B, que se transloca do citosol para o núcleo. A partir disto, ocorre a indução de expressão de genes relacionados à resposta inflamatória, inclusive TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , amplificando a inflamação. Quando comparados a ratos mais jovens, ratos mais velhos possuem níveis basais de NF $\kappa$ B maiores (Jiang e Cadenas, 2014). Em astrócitos, o NF $\kappa$ B é o regulador chave dos processos de transcrição e regulação do estresse oxidativo e da inflamação mediando a liberação de citocinas pró-inflamatórias (Wyse et. al., 2019). Durante o processo natural do envelhecimento, os astrócitos diminuem a sua capacidade e função neuroprotetora (Bellaver et. al., 2016).

Assim, o processo inflamatório no SNC é um processo natural durante o envelhecimento e inúmeras vias de sinalização intracelular promovem estas respostas, como a ativação do NF $\kappa$ B. Nossos resultados sugerem uma participação do NF $\kappa$ B na indução da resposta inflamatória nos astrócitos neonatos pelo

sobrenadante dos astrócitos adultos, uma vez que foi observado um aumento na expressão da subunidade p65. No entanto, não foi observado efeito do sobrenadante dos astrócitos neonatos sobre as culturas de astrócitos maduros em relação à expressão desse fator de transcrição. Com isso, se destaca o papel do NFκB na remodelação inflamatória causada nos astrócitos neonatos, que é consistente com o aumento dos demais mediadores inflamatórios citados anteriormente.

A COX-2 é uma enzima induzível importante na formação de mediadores inflamatórios como as prostaglandinas (Temel e Kahveci, 2009). Sua atividade está relacionada a locais de lesões e respostas inflamatórias, sendo induzida também por citocinas (Hilário, Terreri e Len, 2006). Observou-se um aumento na expressão de COX-2 nos astrócitos neonatos expostos ao sobrenadante dos astrócitos adultos, e uma diminuição de sua expressão nos astrócitos adultos que foram expostos ao meio dos neonatos. Estes resultados apresentam uma característica interessante, visto que a expressão de COX-2 aumenta com a idade em astrócitos hipotalâmicos (Santos et. al., 2018). A partir destes dados, podemos correlacionar com as alterações na expressão de TNF-α e de IL-1β no grupo adulto que recebeu o sobrenadante neonato, bem como em um processo aumentado da expressão de COX-2 na sinalização inflamatória no grupo neonato que recebeu o sobrenadante adulto. Portanto, a adição do sobrenadante de astrócitos mais jovens em astrócitos maduros pode diminuir os processos relacionados à expressão de mediadores inflamatórios associados ao envelhecimento. Por outro lado, a adição do sobrenadante adulto em astrócitos neonatos pode aumentar estes processos inflamatórios.

A IL-10, uma citocina anti-inflamatória, desempenha uma função importante na resposta imune, para a manutenção da homeostase no tecido no qual ela atua. Alterações na produção e liberação desta citocina podem aumentar ou atenuar as

respostas inflamatórias (Iyer e Cheng, 2012). Nossos resultados demonstraram um aumento da liberação de IL-10 nos astrócitos neonatos que receberam o sobrenadante dos astrócitos adultos, porém sem alteração significativa nos níveis de RNAm. Nesse sentido, a produção de IL-10 pelas células gliais ocorre normalmente após à liberação de mediadores pró-inflamatórios (Burmeister e Marriott, 2018). Assim, sua expressão não foi afetada, pelo menos no período de incubação avaliado, embora tenha havido um estímulo para sua liberação, que foi independente da regulação transcricional. Porém, não foram identificadas alterações significativas na IL-10 nos astrócitos adultos incubados com o meio de astrócitos neonatos.

O Nrf2 é um fator de transcrição que está diretamente relacionado com a indução de respostas anti-inflamatórias e antioxidantes, exercendo funções citoprotetoras em diferentes situações de estresse celular. Um dos alvos transcricionais do Nrf2 é a HO-1. Com o processo de envelhecimento, existe uma alteração na sinalização de Nrf2 dependente da região cerebral; especificamente, já foi descrita uma redução de sua atividade no hipotálamo, que em ratos jovens possui uma alta atividade de Nrf2 (Liddell, 2017). Nosso grupo demonstrou que, em culturas de astrócitos hipotalâmicos, animais neonatos apresentaram uma expressão de RNAm de Nrf2 maior do que animais adultos (Santos et. al., 2018). Quando incubados com o sobrenadante dos astrócitos adultos, os astrócitos neonatos apresentaram um aumento nos níveis de RNAm de Nrf2, que também foi acompanhado por um aumento de HO-1. Não foram observadas alterações nos astrócitos adultos expostos ao sobrenadante dos astrócitos neonatos. A alteração na expressão de Nrf2 no grupo neonato que recebeu o sobrenadante adulto sugere a participação dessa via em mecanismos de reprogramação celular, como uma potencial estratégia para a indução de respostas citoprotetoras. Tal hipótese pode ser corroborada pelo aumento da HO-

1, que dentre suas funções, pode regular a atividade transcricional do NFκB. Dessa forma, ainda que os astrócitos neonatos respondam ao sobrenadante dos astrócitos adultos com um aumento de sinalização pró-inflamatória, o concomitante aumento da expressão de Nrf2 e HO-1 reforça a habilidade intrínseca dessas células em ativar vias anti-inflamatórias e citoprotetoras frente a estímulos.

Como citado anteriormente, durante o processo de envelhecimento, as alterações metabólicas observadas podem estar diretamente relacionadas aos processos inflamatórios. Tanto a AMPK quanto a SIRT1 são conhecidas por serem sensores metabólicos e foram alteradas no nosso modelo de estudo. A expressão de AMPK aumentou significativamente tanto nos astrócitos neonatos quanto nos astrócitos adultos submetidos ao protocolo da troca de sobrenadantes. Assim, a AMPK pode ser uma via importante na remodelação astrocitária nas duas idades, uma vez que ela atua como sensor metabólico, sendo capaz de responder a possíveis alterações em substratos e produtos do metabolismo contidos no meio extracelular.

A ativação da AMPK está relacionada ao aumento da síntese de ATP, através do estímulo da glicólise através da fosforilação da 6-fosfofruto-2-quinase/frutose-2,6-bifosfatase 3 (PFKFB3), que controla a atividade da fosfofrutoquinase 1 (PFK1) (Muraleedharan e Dasgupta, 2021), que está de acordo com o aumento da liberação de lactato observado nas culturas de animais neonatos. Além disso, a ativação da AMPK pode aumentar a capacidade do TCA (Voss et. al., 2020), que corroboraria com o aumento da expressão da CS também nos astrócitos neonatos expostos ao sobrenadante dos astrócitos adultos.

No entanto, em relação à SIRT1, sua expressão foi aumentada apenas nos astrócitos neonatos incubados com o sobrenadante dos astrócitos adultos. Com isso, podemos considerar que a remodelação dos astrócitos adultos não envolveu um efeito

na expressão de SIRT1, entretanto pode-se considerar que houve um efeito da troca de sobrenadantes nos astrócitos dos animais neonatos na expressão de SIRT1. Como já descrito, sirtuínas e NAD<sup>+</sup> são alvos diretos do processo de envelhecimento (Campisi et. al., 2019), portanto o aumento da expressão em animais neonatos que foram expostos ao sobrenadante das culturas de animais adultos poderia ser um fator de remodelação das células astrocitárias hipotalâmicas, na tentativa de sinalizar um aumento do metabolismo.

A via do PGC-1 $\alpha$  participa diretamente da regulação bioenergética regulando a biogênese mitocondrial em tecidos que necessitam de energia, bem como regulando a perfusão vascular e o estresse oxidativo (Guo et. al., 2014). Porém, a desregulação da sinalização mediada por PGC-1 $\alpha$  está relacionada com diversas doenças neurodegenerativas (Tsunemi e La spada, 2012) e um regulador chave para a funcionalidade da PGC-1 $\alpha$  é a AMPK. A via AMPK-PGC-1 $\alpha$  é importante na resposta ao dano metabólico, bem como oxidativo no SNC, e tal ativação poderia também regular a expressão de GCL (Guo et. al., 2018).

Astrócitos que superexpressam PGC-1 $\alpha$  secretam uma quantidade menor de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (Nijland et. al., 2014). Nossos resultados não apresentaram alterações significativas na expressão de PGC-1 $\alpha$  no grupo neonato que recebeu o sobrenadante adulto, mas os astrócitos adultos incubados com o sobrenadante dos neonatos apresentaram níveis aumentados do RNAm de PGC-1 $\alpha$ . Vale ressaltar que a expressão do PGC-1 $\alpha$  no SNC está associada a neuroproteção contra doenças relacionadas a idade e estresse oxidativo, visto que sua menor expressão está relacionada com doenças neurodegenerativas (Wenz, 2011). Portanto o aumento de PGC-1 $\alpha$  é um dado interessante na possível remodelação celular dos

astrócitos adultos, bem como corrobora com a menor expressão de citocinas pró-inflamatórias no mesmo grupo.

A senescência está diretamente relacionada com o processo de envelhecimento e a expressão do marcador de senescência p21 é aumentado com o passar da idade, portanto, durante o processo natural de envelhecimento, p21 se mostra como um marcador genético importante (Kuilman et. al., 2010; Villaseñor et. al., 2019; Bobermin et al., 2020). Os resultados encontrados identificaram aumento da expressão do RNAm de p21 no grupo neonato que recebeu o sobrenadante adulto, enquanto que o grupo adulto que recebeu o sobrenadante neonato obteve uma diminuição significativa da expressão de p21. A inflamação hipotalâmica durante o processo de envelhecimento parece estar diretamente associada à senescência, onde as células senescentes afetam o seu microambiente através da sua ativação metabólica e transcricional levando à produção de mediadores inflamatórios (Bhusal, Rahman e Suk, 2022). Com isso, nossos dados demonstraram que a troca de sobrenadantes aumentou um marcador importante deste processo nos astrócitos neonatos, enquanto diminuiu nos astrócitos adultos, representando uma alteração importante na reprogramação da senescência celular que poderia ser relacionado com o processo de envelhecimento no hipotálamo.

A partir dos resultados obtidos, percebe-se que as culturas de astrócitos neonatos quando submetidas à troca de meio extracelular mostraram diferentes níveis de resposta pró-inflamatória em relação as culturas de astrócitos adultos que receberam o meio extracelular neonato, as quais apresentaram maiores respostas anti-inflamatórias. Isto corrobora com as características já identificadas nos astrócitos de animais de diferentes idades, onde se identifica maior plasticidade nos astrócitos de animais neonatos. Como consequência, os astrócitos neonatos são mais



suscetíveis a mudanças, característica do cérebro em maturação, bem como apresentam menor grau de diferenciação que astrócitos adultos. Dessa forma, quando submetidos a estímulos (protetores e/ou tóxicos) podem responder de forma distinta (Quincozes-Santos et. al., 2021).

Na busca para uma melhor qualidade de vida e um envelhecimento mais saudável, diversos trabalhos vêm buscando identificar moléculas com possíveis funções glioprotetoras, que irão agir em diversos mecanismos de sinalização nas células astrocíticas, visando diminuir os processos associados ao envelhecimento. Como, por exemplo, a atividade glioprotetora de moléculas como a guanosina (Souza et al., 2016) e o resveratrol (Bellaver et. al., 2014; Santos et. al., 2023; Sovrani et. al., 2023) está sendo cada vez mais descrita em relação ao processo de envelhecimento e neste trabalho identificamos as alterações de troca de meio extracelular entre culturas provenientes de animais neonatos e adultos, que poderão ser tratadas com moléculas glioprotetoras em outros estudos, a fim de melhor caracterizar a atividade destas moléculas frente ao processo de envelhecimento, como foco na liberação de componentes extracelulares específicos.

Com isso, percebemos que a troca de meio extracelular pode influenciar diversos parâmetros neuroquímicos que evidenciam uma remodelação dos astrócitos hipotalâmicos, e com isso, nos ajudar a entender melhor o processo de envelhecimento celular e buscar soluções para retardar e/ou diminuir os efeitos deste processo. Portanto, a remodelação/reprogramação de células do SNC se apresenta como um importante campo para o desenvolvimento de pesquisas para elucidar cada vez mais os processos de envelhecimento no SNC na busca de uma melhor qualidade de vida.

## 7 CONCLUSÕES

Com base nos dados obtidos, caracterizamos aspectos neuroquímicos em culturas de astrócitos hipotalâmicos a partir da troca de meio extracelular entre células obtidas de animais neonatos e adultos. Assim, podemos concluir que:

1. As trocas de meio extracelular, principalmente nos astrócitos de neonatos, modificaram parâmetros do metabolismo glicolítico, como produção de lactato, bem como a expressão da enzima CS no metabolismo oxidativo;
2. As trocas de meio extracelular não modificaram parâmetros astrogliais associados ao metabolismo do glutamato através da atividade da GS e GSH intracelular, tal a expressão de GS e GCL;
3. Houve uma remodelação da resposta inflamatória, indicando um efeito pró-inflamatório nos astrócitos neonatos e anti-inflamatório nos astrócitos adultos após a troca de meio extracelular;
4. Mecanismos de sinalização celular como Nrf2, HO-1, SIRT1, AMPK e PGC-1 $\alpha$  foram regulados frente à troca de meio extracelular;
5. A troca de meio extracelular diminuiu a expressão do marcador de senescência p21 em astrócitos adultos, porém aumentou sua expressão nos astrócitos neonatos;
6. Os dados corroboram com a maior plasticidade de astrócitos de neonatos frente à estímulos protetores ou tóxicos.

Por fim, nossos dados identificaram que a troca de meio extracelular (sobrenadante) pode remodelar diversos parâmetros moleculares, celulares e bioquímicos relevantes em astrócitos hipotalâmicos. Dessa maneira, os astrócitos

parecem responder à troca de meio extracelular entre as idades propostas. Nossos resultados apontam que as culturas de astrócitos neonatos e adultos podem representar uma nova perspectiva para a reprogramação celular, contribuindo para a elucidação de processos relacionados ao envelhecimento astrocitário hipotalâmico.

## 8 RESUMO DOS RESULTADOS

Tabela 1. Resumo dos resultados nas culturas de astrócitos hipotalâmicos.

Parâmetros		GRUPOS				Metodologia
		Neonato Controle	Neonato + meio de cultura adulto	Adulto Controle	Adulto + meio de cultura neonato	
Metabólicos/ Mitocondriais	MTT (%)	C	-	C	-	Colorimétrica
	Lactato (mM)	C	↑	C	-	Colorimétrica
	CS (RNAm)	C	↑	C	-	RT-PCR
Parâmetros Astrogliais	GFAP (RNAm)	C	-	C	-	RT-PCR
	GS (µmol/mg prot/h)	C	-	C	-	Colorimétrica
	GS (RNAm)	C	-	C	-	RT-PCR
	GSH intracelular (nmol/mg prot)	C	-	C	-	Fluorimétrica
	GCL (RNAm)	C	-	C	-	RT-PCR
Resposta Inflamatória	TNF-α (pg/ml)	C	↑	C	↓	ELISA
	TNF-α (RNAm)	C	↑	C	↓	RT-PCR
	IL-1β (pg/ml)	C	↑	C	↓	ELISA
	IL-1β (RNAm)	C	↑	C	↓	RT-PCR
	IL-10 (pg/ml)	C	↑	C	-	ELISA
	IL-10 (RNAm)	C	-	C	-	RT-PCR
	COX-2 (RNAm)	C	↑	C	↓	RT-PCR
	NFκB (RNAm)	C	↑	C	-	RT-PCR
Mecanismo de Sinalização Celular	Nrf2 (RNAm)	C	↑	C	-	RT-PCR
	HO-1 (RNAm)	C	↑	C	-	RT-PCR
	SIRT1 (RNAm)	C	↑	C	-	RT-PCR
	AMPK (RNAm)	C	↑	C	↑	RT-PCR
	PGC-1α (RNAm)	C	-	C	↑	RT-PCR

Senescência	p21 (RNAm)	C	↑	C	↓	RT-PCR

**Legenda:** C condição controle; – sem alteração; ↑ aumento significativo; ↓ diminuição significativa.

## 9 REFERÊNCIAS

AHIMA, R. S. Connecting obesity, aging and diabetes. **Nature Medicine**, v. 15, n. 9, p. 996-997, set. 2009.

ARÚS, B. A.; SOUZA, D. G.; BELLAVER, B.; SOUZA, D. O.; GONÇALVES, C. A.; QUINCOZES-SANTOS, A.; BOBERMIN, L. D. Resveratrol modulates GSH system in C6 astroglial cells through heme oxygenase 1 pathway. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 428, p. 67-77, 9 jan. 2017.

AZAM, S.; HAQUE, M. E.; BALAKRISHNAN, R.; KIM, I. S.; CHOI, D. K. The Ageing Brain: Molecular and Cellular Basis of Neurodegeneration. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, p. 1-22, 13 ago. 2021.

BÉLANGER, M.; ALLAMAN, I.; MAGISTRETTI, P. J. Brain energy metabolism: focus on astrocyte-neuron metabolic cooperation. **Cell Metabolism**, v. 14, n. 6, p. 724-738, dez. 2011.

BELLAVER, B.; SOUZA, D. G.; SOUZA, D. O.; QUINCOZES-SANTOS, A. Hippocampal Astrocyte Cultures from Adult and Aged Rats Reproduce Changes in Glial Functionality Observed in the Aging Brain. **Molecular Neurobiology**, v. 54, p. 2969-2985, 30 mar. 2016.

BELLAVER, B.; SOUZA, D. G.; SOUZA, D. O.; QUINCOZES-SANTOS, A. Resveratrol increases antioxidant defenses and decreases proinflammatory cytokines in hippocampal astrocyte cultures from newborn, adult and aged Wistar rats. **Toxicology in Vitro**, v. 28, n. 4, p. 479-484, jun. 2014.

BERKICH, D. A.; OLA, M. S.; COLE, J.; SWEATT, A. J.; HUTSON, C. M.; LANOUE, K. F. Mitochondrial transport proteins of the brain. **Journal of Neuroscience Research**, v. 85, p. 3367-3377, 15 nov. 2007.

BHUSAL, A.; RAHMAN, M. H.; SUK, K. Hypothalamic Inflammation in Metabolic Disorders and Aging. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 79, p. 1-37, 15 dec. 2021.

BISHOP, N. A.; LU, T.; YANKNER, B. A. Neural mechanisms of ageing and cognitive decline. **Nature**, v. 464, p. 529-535, 1 set. 2010.

BOBERMIN, L. D.; ROPPA, R. H. A.; QUINCOZES-SANTOS, A. Adenosine receptors as a new target for resveratrol-mediated glioprotection. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1865, p. 634-647, mar. 2019.

BOBERMIN, L. D.; ROPPA, R. H. A.; GONÇALVES, C. A.; QUINCOZES-SANTOS, A. Ammonia-Induced Glial-Inflammation. **Molecular Neurobiology**, v. 57, p. 3552-3567, 15 jun. 2020.

BOBERMIN, L. D.; ALMEIDA, R. R. S.; WEBER, F. B.; MEDEIROS, L. S.; LÍVIA, M.; WYSE, A. T. S.; GONÇALVES, C. A.; QUINCOZES-SANTOS, A. Lipopolysaccharide Induces Gliotoxicity in Hippocampal Astrocytes from Aged Rats: Insights About the Glioprotective Roles of Resveratrol. **Molecular Neurobiology**, v. 59, p. 1419-1439, 7 jan. 2022.

BRAMANTI, V.; TOMASSONI, D.; AVITABILE, M.; AMENTA, F.; AVOLA, R. Biomarkers of glial cell proliferation and differentiation in culture. **Frontiers in Bioscience**, v. 2, p. 558-570, 1 jan. 2010.

BURMEISTER, A. R.; MARRIOTT, I. The Interleukin-10 Family of Cytokines and Their Role in the CNS. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 12, p. 1-13, 27 nov. 2018.

CAMPISI, J.; KAPAHI, P.; LITHGOW, G. J.; MELOV, S.; NEWMAN, J. C.; VERDIN, E. From discoveries in ageing research to therapeutics for healthy ageing. **Nature**, v. 571, p. 183–192, 11 jul. 2019.

CERBAI, F. The Neuron-Astrocyte-Microglia Triad in Normal Brain Ageing and in a Model of Neuroinflammation in the Rat Hippocampus. **Plos One**, v. 7, n. 9, p. 1-19, 18 set. 2012.

CHABOUB, L. S.; DENEEN, B. Astrocyte form and function in the developing central nervous system. **Seminars in Pediatric Neurology**, v. 20, n. 4, p. 230–235, dez. 2013.

CHEN, C.; ZHOU, M.; GE, Y.; WANG, X. SIRT1 and aging related signaling pathways. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 187, p. 1-7, 1 abr. 2020.

CHOI, I. RICKERT, E. FERNANDEZ, M.; WEBSTER, N. J. G. SIRT1 in Astrocytes Regulates Glucose Metabolism and Reproductive Function. **Endocrinology**, v. 160, p. 1547-1560, jun. 2019.

CHOWEN, J. A.; ARIZÓN, P. A.; REGATILLO, A. F.; FRAGO, L. M.; HORVATH, T. L.; ARGENTE, J. The role of astrocytes in the hypothalamic response and adaptation to metabolic signals. **Progress in Neurobiology**, v. 144, p. 68-87, 18 mar. 2016.

CLARKE, L. E.; LIDDELOW, S. A.; CHAKRABORTY, C.; MÜNCH, A. E.; HEIMAN, M.; BARRES, B. A. Normal aging induces A1-like astrocyte reactivity. **PNAS**, v. 115, p. 1896-1905, 7 feb. 2018.



CLASADONTE, J.; PREVOT, V. The special relationship: Glia-neuron interactions in the neuroendocrine hypothalamus. **Nature Reviews**, v. 14, p. 25-44, jan. 2018.

COLL A.P.; YEO G.S. The hypothalamus and metabolism: integrating signals to control energy and glucose homeostasis. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 13, 970– 976, dez 2013.

CORAY, T. W. Ageing, neurodegeneration and brain rejuvenation. **Nature**, v. 539, p. 180-186, 9 nov. 2016.

CORNEJO, M.P., et al. Neuroendocrine regulation of metabolism. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 28, p. 1-12, 1 de jul. 2016.

DRESSELHAUS, E. C.; MEFFERT, M. K. Cellular specificity of NF- $\kappa$ B function in the nervous system. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 1-14, 9 mai. 2019.

FABRICIUS, K.; JACOBSEN, J. S.; PAKKENBERG, B. Effect of age on neocortical brain cells in 90+ year old human females - a cell counting study. **Neurobiology of Aging**, v. 34, p. 91-99, 1 jan. 2013.

FALCONE, C. Evolution of astrocytes: From invertebrates to vertebrates. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 10, p.1-14, 15 ago. 2022.

GE, W. P.; MIYAWAKI, A.; GAGE, F. H.; JAN, Y. N.; JAN, L. Y. Local generation of glia is a major astrocyte source in postnatal cortex. **Nature**, v. 484, n. 7394, p. 376–380, 28 mar. 2012.

GONÇALVES, C. A.; RODRIGUES, L.; BOBERMIN, L. D.; ZANOTTO, C.; VIZUETE, A.; QUINCOZES-SANTOS, A.; SOUZA, D. O.; LEITE, M. L. Glycolysis-Derived

Compounds From Astrocytes That Modulate Synaptic Communication. **Frontiers in Neuroscience**, v. 12, p. 1-17, 2018.

GÖRG, B.; KARABABA, A.; SHAFIGULLINA, A.; BIDMON, H. J.; HÄUSSINGER, D. Ammonia-induced senescence in cultured rat astrocytes and in human cerebral cortex in hepatic encephalopathy. **Glia**, v. 63, p. 37-50, 4 aug. 2014.

GUO, X.; DASON, E. S.; MORENO, V. Z.; JIANG, Q.; NAHIRNYJ, A.; CHAN, D.; FLANAGAN, J. G.; SIVAK, J. M. PGC-1 $\alpha$  Signaling coordinates susceptibility to metabolic and oxidative injury in the inner Retina. **The American Journal of Pathology**, v. 184, p. 1017-1029, 4 apr. 2014.

GUTTENPLAN, K. A.; LIDDELOW, S. A. Astrocytes and microglia: Models and tools. **Journal of Experimental Medicine**, v. 216, p. 71-83, 7 jan. 2019.

HAJDAROVIC, K. H.; YU, D.; WEBB, A. E. Understanding the aging hypothalamus, one cell at a time. **Trends in Neurosciences**, v. 45, p. 942-954, 1 dez. 2022.

HILÁRIO, M. O. E.; TERRERI, M. T.; LEN, C. A. Non-hormonal anti-inflammatory: cyclooxygenase 2 inhibitors. **Journal of Pediatrics**, v. 82, p. 206-212, 2006.

HOL, E. M.; PEKNY, M. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 32, p. 121-130, 1 fev. 2015.

HOU, Y.; DAN, X.; BABBAR, M.; WEI, Y.; HASSELBALCH, S. G.; CROTEAU, D. L.; BOHR, V. A. Ageing as a risk factor for neurodegenerative disease. **Nature Reviews Neurology**, v. 15, p. 565-581, 9 sep. 2019.

IYER, S. S.; CHENG, G. Role of Interleukin 10 Transcriptional Regulation in Inflammation and Autoimmune Disease. **Critical Reviews in Immunology**, v. 32, p. 23-63, 2012.

JIANG, T.; CADENAS, E. Astrocytic metabolic and inflammatory changes as a function of age. **Aging Cell**, v. 13, p. 1059–1067, 19 sep. 2014.

KIM, K.; CHOE, H. K. Role of hypothalamus in aging and its underlying cellular mechanisms. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 177, p. 74-79, 1 jan. 2019.

KIM, K. Glutathione in the nervous system as a potential therapeutic target to control the development and progression of amyotrophic lateral sclerosis. **Antioxidants**, v. 10, n. 7, 1 jul. 2021.

KUILMAN, T.; MICHALOGLOU, C.; MOOI, W. J.; PEEPER, D. S. The essence of senescence. **Genes & Development**, v. 24, p. 2463-2479, 2010

LELOUP, C.; ALLARD, C.; CARNEIRO, L.; FIORAMONTI, X.; COLLINS, S.; PÉNICAUD, L. Glucose and hypothalamic astrocytes: More than a fueling role? **Neuroscience**, v. 323, p. 110-120, 26 may. 2016.

LIDDELL, J. R. Are astrocytes the predominant cell type for activation of Nrf2 in aging and neurodegeneration? **Antioxidants**, v. 6, p. 1-35, 1 set. 2017.

LIU, TIEMIN.; XU, Y.; YI, C. X.; TONG, Q.; CAI, D. The hypothalamus for whole-body physiology: from metabolism to aging. **Protein & Cell**, p. 1-28, 7 abr. 2021.

LIU, X.; DING, L.; YUAN, J.; LIAO, J.; DUAN, L.; WANG, W.; TAN, W.; WEIYE, Y.; ZHOU, B.; CHEN, X.; YANG, Z. Identification of a Novel Universal Potential Epitope

on the Cytoplasmic Tail of H7N9 Virus Hemagglutinin. **Virologica Sinica**, v. 34, p. 334-337, 23 apr. 2019.

LOWRY, O.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-267, 1951.

MAHMOUD, S.; GHARAGOZLOO, M.; SIMARD, C.; GRIS, D. Astrocytes maintain glutamate homeostasis in the CNS by controlling the balance between glutamate uptake and release. **Cells**, v. 8, p. 1-27, 20 fev. 2019.

MATIAS, I.; MORGADO, J.; GOMES, F. C. A. Astrocyte Heterogeneity: Impact to Brain Aging and Disease. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 11, p. 1–18, 19 mar. 2019.

MESSING, A.; BRENNER, M. GFAP at 50. **Sage Journals**, v. 12, 18 aug. 2020.

MIDDELDORP, J.; HOL, E. M. GFAP in health and disease. **Progress in Neurobiology**, v. 93, p. 421-443, 1 mar. 2011.

MILLER, S. J. Astrocyte Heterogeneity in the Adult Central Nervous System. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 12, p.1–6, 15 nov. 2018.

MURALEEDHARAN, R.; DASGUPTA, B. AMPK in the brain: its roles in glucose and neural metabolism. **FEBS Journal**, v. 289, p. 2247-2262, 1 abr. 2022.

NIJLAND, P. G.; WITTE, M. E.; HOF, B. V. H.; POL, S. V. D.; BAUER, J.; LASSMANN, H.; VALK, P. V. D.; VRIES, H. E.; HORSSSEN, J. V. Astroglial PGC-1 $\alpha$  increases mitochondrial antioxidant capacity and suppresses inflammation: implications for multiple sclerosis. **Acta Neuropathologica Communications**, v. 2, p. 1-13, 10 dec. 2014.

PALMER, A. L.; OUSMAN, S. S. Astrocytes and aging. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 10, p.1–14, 26 out. 2018.

PETERS, R. Ageing and the brain. **Postgraduate Medical Journal**, v. 82, p. 84-88, fev. 2006.

QADIR, M. I; SIDRA, A. Sirtuins in Brain Aging and Neurological Disorders. **Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression**, v. 27, p. 321-329, 2017.

QUINCOZES-SANTOS, AA.; BOBERMIN, L. D.; ASSIS, A. D.; GONÇALVES, C. A.; SOUZA, D. O. Fluctuations in glucose levels induce glial toxicity with glutamatergic, oxidative and inflammatory implications. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)**, v. 1863, p. 1-14, jan. 2017.

QUINCOZES-SANTOS, A.; SANTOS, C. L.; ALMEIDA, R. R. S.; SILVA, A.; THOMAZ, N. K.; COSTA, N. L. F.; WEBER, F. B.; SCHMITZ, I.; MEDEIROS, L. S.; LÍVIA, M.; DOTTO, B. S.; DIAS, F. R. P.; SOVRANI, V. BOBERMIN, L. D. Gliotoxicity and Glioprotection: the Dual Role of Glial Cells. **Molecular Neurobiology**, v. 58, p. 1-16, 28 set. 2021.

QUINCOZES-SANTOS, A.; BOBERMIN, L. D.; SOUZA, D. G.; BELLAVER, B.; GONÇALVES, C. A.; SOUZA, D. O. Guanosine protects C6 astroglial cells against azide-induced oxidative damage: a putative role of heme oxygenase 1. **Journal of Neurochemistry**, v. 130, p. 61-74, 24 mar. 2014.

QUINCOZES-SANTOS, A.; BOBERMIN, L. D.; TRAMONTINA, A. C.; WARTCHOW, K. M.; TAGLIARI, B.; SOUZA, D. O.; WYSE, A. T. S.; GONÇALVES, C. A. Oxidative stress mediated by NMDA, AMPA/KA channels in acute hippocampal slices:

neuroprotective effect of resveratrol. **Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA**, v. 28, n. 4, p. 544-551, jun. 2014.

QUINCOZES-SANTOS, A.; NARDIN, P.; FUNCHAL, C.; ALMEIDA, L. M. V.; SILVA, M. C. J.; WOFCHUK, S. T.; GONÇALVES, C. A.; GOTTFRIED, C. Resveratrol increases glutamate uptake and glutamine synthetase activity in C6 glioma cells. **Archives of biochemistry and Biophysics**, v. 453, n. 2, p. 161-167, 15 set. 2006.

ROSE, C. F.; VERKHRATSKY, A.; PARPURA, V. Astrocyte glutamine synthetase: pivotal in health and disease. **Biochemical Society Transactions**, v. 41, p. 1518-1524, dec. 2013.

SALAS, I. H.; BURGADO, J.; ALLEN, N. J. Glia: victims or villains of the aging brain? **Neurobiology of Disease**, v. 143, n. 105008, p. 1-12, 1 set. 2020.

SALMINEN, A.; OJALA, J.; KAARNIRANTA, K.; HAAPASALO, A.; HILTUNEN, M.; SOININEN, H. Astrocytes in the Aging Brain Express Characteristics of Senescence-Associated Secretory Phenotype. **European Journal of Neuroscience**, v. 34, p. 3-11, 7 jun. 2011.

SANTOS, C. L.; VIZUETE, A. F. K.; WEBER, F. B.; THOMAZ, N. K.; BOBERMIN, L. D.; GONÇALVES, C. A.; QUINCOZES-SANTOS, A. Age-Dependent effects of resveratrol in hypothalamic astrocyte cultures. **NeuroReport**, v. 34, p. 419-425, p. 17 may. 2023.

SANTOS, C. L.; ROPPA, P. H. A.; TRUCOLO, P. FONTELLA, F. U.; MORE, D. O. S. S.; BOBERMIN, L. D.; QUINCOZES-SANTOS. Age-Dependent Neurochemical Remodeling of Hypothalamic Astrocytes. **Molecular Neurobiology**, v. 55, n. 7, p. 5565-5579, 4 out. 2018.

SAPER, C. B.; LOWELL, B. B. The hypothalamus. **Current Biology**, v. 24, p. 1111-1116, 1 dez. 2014.

SAPORTA, M. A. C.; REHEN, S. K. Cell reprogramming and personalized medicine. **Science and Culture**, v. 66, n. 1, p. 4-5, 2014.

SCHNEEBERGER, M; GOMIS, R.; CLARET, M. Hypothalamic and brainstem neuronal circuits controlling homeostatic energy balance. **Journal of Endocrinology**, v. 220, n. 2, p.25-46, fev. 2014.

SOUZA, D. G.; BELLAVER, B.; BOBERMIN, L. D.; SOUZA, D. O.; QUINCOZES-SANTOS, A. Anti-aging effects of guanosine in glial cells. **Purinergic Signalling**, v. 12, n. 4, p. 697–706, 1 dez. 2016.

SOUZA, D. G.; BELLAVER, B.; SOUZA, D. O.; QUINCOZES-SANTOS, A. Characterization of adult rat astrocyte cultures. **Journal Plos One**, v. 8, p. 1-10, 28 mar. 2013.

SOVRANI, V.; BOBERMIN, L. D.; SANTOS, C. L.; BRONDANI, M.; GONÇALVES, C. A.; LEIPNITZ, G.; QUINCOZES-SANTOS, A. Effects of long-term resveratrol treatment in hypothalamic astrocyte cultures from aged rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 478, p. 1205–1216, 1 jun. 2022.

SOVRANI, V.; BOBERMIN, L. D.; SCHMITZ, I.; LEIPNITZ, G.; QUINCOZES-SANTOS, A. Potential Glioprotective Strategies Against Diabetes-Induced Brain Toxicity. **Neurotoxicity Research**, v. 39, p. 1651-1664, oct. 2021.

SUDA, Y.; NAKASHIMA, T.; MATSUMOTO, H.; SATO, D.; NAGANO, S.; MIKATA, H.; YOSHIDA, S.; TANAKA, K.; HAMADA, Y.; KUZUMAKI, S.; NARITA, M. Normal Aging Induces PD-1-enriched Exhausted Microglia and A1-like Reactive Astrocytes in the

Hypothalamus. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 514, p. 22-29, 19 feb. 2021.

SUKHORUKOVA, E. G.; KRUZHEVSKII, D. E.; ALEKSEEVA, O. S. Glial fibrillary acidic protein: the component of intermediate filaments in the vertebrate brain astrocytes. **Zhurnal Evoliutsionnoi Biokhimii i Fiziologii**, v. 51, p. 3-10, 2015.

TEMEL, S. G.; ZAHVECI, Z. Cyclooxygenase-2 expression in astrocytes and microglia in human oligodendroglioma and astrocytoma. **Jornal de Histologia Molecular**, v. 40, p. 369-377, 2009.

THUC, O. L.; STOBBE, K.; CANSSELL, C.; NAHON, J. L.; BLONDEAU, N.; ROVÈRE, C. Hypothalamic Inflammation and Energy Balance Disruptions: Spotlight on Chemokines. **Frontiers in Endocrinology**, v. 8, p. 1-14, 14 aug. 2017.

TSUNEMI, T.; LA SPADA, A. R. PGC-1 $\alpha$  at the intersection of bioenergetics regulation and neuron function: From Huntington's disease to Parkinson's disease and beyond. **Progress in Neurobiology**, v. 97, p. 142-151, may 2012.

TRAN, L. T.; PARK, S.; KIM, S. K.; LEE, J. S.; KIM, K. W.; KWON, O. Hypothalamic control of energy expenditure and thermogenesis. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 54, p. 358-369, 17 mar. 2022.

VILLASEÑOR, I. V.; GARWOOD, C. J.; HEATH, P. R.; SIMPSON, J. E.; INCE, P. G.; WHARTON, S. B. Expression of p16 and p21 in the frontal association cortex of ALS/MND brains suggests neuronal cell cycle dysregulation and astrocyte senescence in early stages of the disease. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, v. 46, n. 2, p. 171–185, 1 fev. 2020.



VERKHRATSKY, A.; PARPURA, V.; LI, B.; SCUDERI, C. Astrocytes: The Housekeepers and Guardians of the CNS. **Advances in Neurobiology**, v. 26, p. 21-53, 2021.

VOSS, C. M.; ANDERSEN, J. V.; JAKOBSEN, E.; SIAMKA, O.; KARACA, M.; MAECHLER, P.; WAAGEPETERSEN, H. S. AMP-activated protein kinase (AMPK) regulates astrocyte oxidative metabolism by balancing TCA cycle dynamics. **GLIA**, v. 68, n. 9, p. 1824–1839, 1 set. 2020.

WENZ, T. Mitochondria and PGC-1 $\alpha$  in aging and age-associated diseases. **Journal of Aging Research**, v. 2011, p. 1-12, 5 may. 2011.

WU, Y.; ZHANG, A. Q.; YEW, D. T. Age related changes of various markers of astrocytes in senescence-accelerated mice hippocampus. **Neurochemistry International**, v. 46, p. 565-574, jun 2005.

WYSE, A. T.; SIEBERT, C.; BOBERMIN, L. D.; SANTOS, T. M. D.; QUINCOZES-SANTOS. Changes in Inflammatory Response, Redox Status and Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase Activity in Primary Astrocyte Cultures from Female Wistar Rats Subject to Ovariectomy. **Neurotoxicity Research**, v. 37, p. 445-454, 26 nov. 2019.

YU, M.; ZHANG, H.; WANG, B.; ZHANG, Y.; ZHENG, X.; SHAO, B.; ZHUGE, Q.; JIN, K. Key Signaling Pathways in Aging and Potential Interventions for Healthy Aging. **Cells**, v. 10, p. 1-25, mar. 2021

ZAPPAROLI, L.; MARIANO, M.; PAULESU, E. How the motor system copes with aging: a quantitative meta-analysis of the effect of aging on motor function control. **Nature**, v. 5, p. 1-15, 20 jan. 2022.

ZHANG, G.; LI, J.; PURKAYASTHA, S.; TANG, Y.; ZHANG, H.; YIN, Y.; LI, B.; LIU, G.; CAI, D. Hypothalamic programming of systemic ageing involving IKK- $\beta$ , NF- $\kappa$ B and GnRH. **Nature**, v. 497, p. 211-216, 1 may 2013.

ZHANG, W.; XIAO, D.; LI, X.; ZHANG, Y.; RASOULI, J.; CASELLA, G.; BOEHM, A.; HWANG, D.; ISHIKAWA, L. L.; THOME, R.; CIRIC, B.; CURTIS, M. T.; ROSTAMI, A.; ZHANG, G. X. SIRT1 inactivation switches reactive astrocytes to an antiinflammatory phenotype in CNS autoimmunity. **Journal of Clinical Investigation**, v. 132, n. 22, 15 nov. 2022.

ZHOU, Y.; DANBOLT, N. C. Glutamate as a neurotransmitter in the healthy brain. **Journal of Neural Transmission**, v. 121, p. 799-817, 1 mar. 2014.

ZIGMOND, S. H. Signal transduction and actin filament organization. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 8, p. 66-73, feb. 1996.