

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

Giancarlo Tomazzoni de Oliveira

**CARACTERIZAÇÃO MORFOFUNCIONAL DE CULTURA DE ASTRÓCITOS
CEREBELARES DE RATOS WISTAR ADULTOS**

Porto Alegre

2024

Giancarlo Tomazzoni de Oliveira

**CARACTERIZAÇÃO MORFOFUNCIONAL DE CULTURA DE ASTRÓCITOS
CEREBELARES DE RATOS WISTAR ADULTOS**

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

Orientador: Prof. Dr. André Quincozes dos Santos

Porto Alegre

2024

CIP - Catalogação na Publicação

Tomassoni, Giancarlo
Caracterização Morfofuncional de Cultura de
Astrócitos Cerebelares de Ratos Wistar Adultos /
Giancarlo Tomassoni. -- 2024.
73 f.
Orientador: André Quincozes dos Santos.

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, 2024.

1. Astrócitos. 2. Cerebelo. 3. Cultura primária. 4.
Envelhecimento. I. Quincozes dos Santos, André,
orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

Fazer ciência de base não é uma tarefa fácil sob nenhum aspecto. A remuneração é baixa, os direitos são quase inexistentes. O acúmulo de funções é grande – se faz do planejamento e escrita até a limpeza. A carga horária se estende por muito além das horas de bancada, e o reconhecimento que se ganha é mínimo. Nossos resultados terão efeito prático somente em longo prazo, talvez para além de nossas vidas. Há uma luta constante entre vaidades e egos em nossas universidades, em nossos departamentos, em nossos laboratórios.

A ciência é um método, mas ler, observar, perguntar, planejar, comprar, executar, calcular, interpretar, apresentar, errar, repetir... fazer ciência: por quê? Porque queremos criar, curar, desenvolver. Porque queremos saber, conhecer e aprender. O cientista é uma eterna criança curiosa fazendo a mesma pergunta: por quê? Nessas circunstâncias, o cientista é um louco que acha mais belo o que é mais difícil. Como disse Erasmo de Roterdã, “Cada momento da vida seria triste, fastidioso, insípido e aborrecido, se não houvesse prazer, se não fosse animado pelo tempero da loucura”. No fundo, é um prazer fazer parte desse processo que marca e modifica a todos que por ele passam, e quem não comete uma loucura vez ou outra não tem boas histórias para contar. Por isso, agradeço a todos que tornaram essa experiência única e enriquecedora.

Começo agradecendo ao professor André - professor, orientador e amigo – que me acolheu no LABGLIO quando o mundo inteiro ainda estava em isolamento, e me acompanhou desde o TCC. Sempre fizeste questão de estar presente e participando ativamente do projeto – és uma inspiração profissional e pessoal para todos que cruzam teu caminho. Agradeço também à mais nova professora do departamento, a Lari, por ter dividido minhas preocupações, me ensinado e me auxiliado nos experimentos com muita eloquência e empatia. Tua recente conquista é mais do que merecida. Agradeço às ICs do nosso laboratório, sobretudo a Aline e Dani, por serem tão proativas, aprenderem e ensinarem tanto. Vocês têm um futuro brilhante. Agradeço aos colegas da pós que me auxiliaram, sobretudo àqueles com quem desenvolvi vínculos pessoais – Ester, Matheus, Vanessa e Vítor. Agradeço aos amigos pessoais que fizeram parte da jornada, sobretudo a Thaisla, a quem devo parte da minha motivação em ter seguido na pós-graduação. Agradeço à minha doce Amandinha, que é um dos pilares que me sustentam todos os dias. Tu és o sol que ilumina meu caminho, e te amo incondicionalmente. Por fim, agradeço aos meus pais, Lindomar e Ana Lúcia, pelo suporte que me propiciaram a vida inteira. Sem vocês eu não sei se teria chegado até aqui. É um privilégio dividir minha vida com vocês.

SUMÁRIO

PARTE I.....	7
LISTA DE ABREVIATURAS.....	8
LISTA DE FIGURAS.....	10
RESUMO.....	11
ABSTRACT	12
1 INTRODUÇÃO	13
1.1 CEREBELO	13
1.2 ASTRÓCITOS	14
1.2.1 Morfologia astrocitária	15
1.2.2 Funções astrocitárias.....	15
1.3 PROCESSO DE ENVELHECIMENTO.....	19
1.4 CULTURA PRIMÁRIA.....	20
2 JUSTIFICATIVA	22
3 OBJETIVOS	23
3.1 OBJETIVO GERAL.....	23
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
PARTE II	24
4 METODOLOGIA.....	25
4.1 APROVAÇÃO E UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS NA PESQUISA	25
4.2 AMOSTRAS DE TECIDO E CULTURA PRIMÁRIA DE CEREBELO DE RATOS WISTAR MACHOS.....	25
4.3 MORFOLOGIA CELULAR	27
4.4 VIABILIDADE CELULAR.....	27
4.5 QUANTIFICAÇÃO DE LACTATO EXTRACELULAR.....	28
4.6 ATIVIDADE DE GS.....	28
4.7 CONTEÚDO DE GSH.....	28

4.8 EXTRAÇÃO DE RNA E REAÇÃO DA TRANSCRIPTASE REVERSA SEGUIDA DE REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL (RT-PCR)	29
4.9 NÍVEIS DE CITOCINAS EXTRACELULARES	30
4.10 CAPTAÇÃO DE GLUTAMATO EXTRACELULAR	30
4.11 WESTERN BLOTTING	30
4.12 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS	31
4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	32
5 RESULTADOS	33
5.1. ANÁLISES EM TECIDO CEREBELAR.....	33
5.1.1 Marcadores astrocitários clássicos.....	33
5.1.2 Parâmetros do metabolismo glutamatérgico.....	34
5.1.3 Inflamação, fatores de transcrição e senescência	36
5.1.4 Determinação de parâmetros mitocondriais e energéticos	36
5.2 ANÁLISES EM CULTURA DE ASTRÓCITOS CEREBELARES	37
5.2.1 Caracterização morfológica	37
5.2.2 Avaliação de marcadores astrocitários	38
5.2.3 Avaliação de parâmetros mitocondriais, energéticos e de viabilidade celular	39
5.2.4 Avaliação de parâmetros do metabolismo glutamatérgico.....	40
5.2.5 Avaliação de parâmetros inflamatórios, redox e de senescência.....	41
PARTE III.....	43
6 DISCUSSÃO	44
6.1 MARCADORES ASTROCITÁRIOS	44
6.1.1 Tecido cerebelar.....	44
6.1.2 Cultura de astrócitos cerebelares	45
6.2 PARÂMETROS DO METABOLISMO GLUTAMATÉRGICO.....	46
6.2.1 Tecido cerebelar.....	47
6.2.2 Cultura de astrócitos cerebelares	47

6.3 PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS, REDOX E DE SENESCÊNCIA.....	48
6.3.1 Tecido cerebelar.....	49
6.3.2 Cultura de astrócitos cerebelares	50
6.4 PARÂMETROS MITOCONDRIAIS, ENERGÉTICOS E DE VIABILIDADE CELULAR.....	51
6.4.1 Tecido cerebelar.....	51
6.4.2 Cultura de astrócitos cerebelares	52
7 CONCLUSÕES.....	54
8 PERSPECTIVAS.....	55
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

PARTE I

LISTA DE ABREVIATURAS

AD	Animais adultos
APS	Persulfato de amônia
BSA	Albumina sérica bovina
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CO ₂	Dióxido de carbono
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CREAL	Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório
CS	Citrato sintase
DMEM/F12	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F12</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNAc	DNA complementar
D.P.	Desvio padrão
EAAT	Transportador de aminoácido excitatório
EAAC1	Carreador 1 de aminoácido excitatório
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FeCl ₃	Cloreto férrico
GABA	Ácido- γ -aminobutírico
GAT	Proteína transportadora de GABA
GFAP	Proteína glial fibrilar ácida
GLAST	Transportador de glutamato-aspartato
GLT-1	Transportador 1 de glutamato
Glut1	Transportador de glicose-1
GS	Glutamina sintetase
GSH	Glutationa
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HBSS	Solução salina balanceada de Hanks
HCl	Ácido clorídrico
HEPES	4-(2-hidroxietil)-1-ácido piperazineetanesulfônico
HO-1	Heme oxigenase-1
HRP	Peroxidase de rábano
IL	Interleucina

KCl	Cloreto de potássio
MAPK	Proteína-quinase ativada por mitógenos
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MPA	3-ácido mercaptopropiônico
NADPH	Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzido
NEO	Animais neonatos
NFκB	Fator nuclear capa B
Nrf2	Fator 2 relacionado ao fator nuclear eritroide 2
p21	Inibidor 1 da quinase dependente de ciclina
PBS	Tampão fosfato salino
PGC-1α	Coativador 1-alfa do receptor ativado por proliferadores de peroxissomo
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
S100B	S100 proteína B ligante de cálcio
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
SIRT1	Sirtuína 1
TBS	Solução salina tamponada com Tris
TCA	Ciclo do ácido tricarbóxico
T-TBS	TBS com Tween-20
Temed	Tetrametiletilenodiamina
TNF-α	Fator alfa de necrose tumoral
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Marcadores astrocitários clássicos em tecido cerebelar	33
Figura 2. Parâmetros do metabolismo glutamatérgico em tecido cerebelar	34
Figura 3. Inflamação, fatores de transcrição e senescência em tecido cerebelar	35
Figura 4. Determinação de parâmetros mitocondriais e energéticos em tecido cerebelar	36
Figura 5. Caracterização morfológica em cultura de astrócitos cerebelares.	37
Figura 6. Avaliação de marcadores astrocitários em cultura de astrócitos cerebelares	38
Figura 7. Avaliação de parâmetros metabólicos energéticos em cultura de astrócitos cerebelares	39
Figura 8. Avaliação de parâmetros do metabolismo glutamatérgico em cultura de astrócitos cerebelares.	40
Figura 9. Avaliação de parâmetros inflamatórios, redox e de senescência em cultura de astrócitos cerebelares	41

RESUMO

O cerebelo participa de funções importantes no sistema nervoso central (SNC), como a manutenção do equilíbrio, controle do tônus muscular e coordenação de movimentos finos. Os astrócitos, por sua vez, são células gliais que desempenham funções como suporte metabólico neuronal, formação e regulação sináptica, regulação das respostas inflamatórias e antioxidantes, mantendo assim a homeostase do SNC. Vale destacar que estas funções podem ser modificadas ao longo do processo de envelhecimento. Modelos *in vitro* como a cultura primária de células derivadas de tecido de roedores são capazes de reproduzir parâmetros celulares e moleculares de astrócitos durante esse processo. Dessa forma, a caracterização e avaliação de diferentes parâmetros bioquímicos em culturas de astrócitos cerebelares derivadas de animais de diferentes faixas etárias pode auxiliar na compreensão da funcionalidade destas células ao longo do processo de envelhecimento. Além disso, podem servir para a validação do próprio modelo de cultura astrogliar. Assim, neste estudo, investigamos em tecido cerebelar e em culturas de astrócitos de cerebelo derivadas de ratos Wistar machos neonatos (3 dias) e adultos (90 dias) parâmetros astrocitários como marcadores clássicos de astrócitos e parâmetros do metabolismo glutamatérgico e energético. Também avaliamos parâmetros inflamatórios, redox e de senescência. Nossos resultados mostraram que as culturas astrocitárias cerebelares derivadas de animais adultos apresentaram diminuição da expressão de proteína glial fibrilar ácida (GFAP), vimentina e S100B. Elas também diminuíram parâmetros de viabilidade celular, liberação de lactato, da captação de glutamato, transportador de glutamato-aspartato (GLAST), transportador-1 de glutamato (GLT-1) e carreador 1 de aminoácido excitatório (EAAC1). Também diminuíram a expressão do RNAm de citrato sintase (CS), fator nuclear capa B (NFκB), fator 2 relacionado ao fator nuclear eritroide 2 (Nrf2), heme oxigenase-1 (HO-1) e proteína p21 em relação aos controles neonatos. No entanto, observou-se um aumento da secreção de fator de necrose tumoral alfa (TNF-α). Assim, os resultados sugerem que, na cultura de astrócitos do cerebelo de roedores adultos, a função astrocitária foi modificada ao longo do processo de envelhecimento. Parâmetros relacionados a funcionalidade astrogliar em tecido cerebelar também foram avaliados e apresentaram alterações significativas, reforçando que nossa proposta de estudo pode ser uma importante ferramenta para avaliar o amadurecimento astrocitário em cerebelo.

Palavras-chave: astrócitos; cerebelo; cultura primária; processo de envelhecimento.

ABSTRACT

The cerebellum participates in crucial functions in the central nervous system (CNS), such as maintaining balance, controlling muscle tone, and coordinating fine movements. Astrocytes, in turn, are glial cells that perform functions such as neuronal metabolic support, synaptic formation and regulation, regulation of inflammatory and antioxidant responses, thus maintaining CNS homeostasis. Their functions can be modified throughout the aging process. In vitro models, such as primary culture of cells derived from rodent tissue, are capable of reproducing cellular and molecular parameters of astrocytes during this process. Thus, the characterization and evaluation of different biochemical parameters in cultures of cerebellar astrocytes derived from animals of different ages can contribute to understand the functionality of these cells throughout the aging process. Moreover, they can serve for the validation of the astroglial culture model itself. Thus, in this study, we investigated in cerebellar tissue and in cultures of cerebellar astrocytes derived from neonatal (3 days) and adult (90 days) male Wistar rats, astrocytic parameters such as classic astrocyte markers, glutamatergic, and energetic metabolism parameters. We also evaluated inflammatory, redox, and senescence parameters. Our results showed that adult-derived cerebellar astrocytic cultures exhibited decreased expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP), vimentin, and S100B. They also decreased cell viability parameters, lactate release, glutamate uptake, glutamate-aspartate transporter (GLAST), glutamate transporter-1 (GLT-1), and excitatory amino acid carrier 1 (EAAC1). Additionally, there was a decrease in the mRNA expression of citrate synthase (CS), nuclear factor kappa B (NF κ B), nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), heme oxygenase-1 (HO-1), and p21 protein in relation to neonatal controls. However, an increase in tumor necrosis factor alpha (TNF- α) secretion was observed. Thus, the results suggest that, in the culture of adult rodent cerebellar astrocytes, astrocytic function was modified in relation to the aging process. Parameters related to astroglial functionality in cerebellar tissue were also evaluated and showed significant alterations, reinforcing that our study proposal can be an important tool for assessing astrocytic maturation in the cerebellum.

Keywords: aging process, astrocytes; cerebellum; primary cultures.

1 INTRODUÇÃO

Esta seção iniciará apresentando as características do cerebelo no sistema nervoso central (SNC) que são relevantes para o presente trabalho. O mesmo seguirá com as células astrocíticas. Após, o modelo de cultura primária será apresentado, e em sequência, o envelhecimento será contextualizado em torno de todos os tópicos abordados.

1.1 CEREBELO

O SNC é a porção do sistema nervoso que inclui a medula espinhal e o encéfalo (LUDWIG *et al.*, 2020). O encéfalo é uma estrutura de amplo interesse científico, devido a sua elevada complexidade e subdivisão para atender a função central de controle sobre os demais órgãos em todos os organismos vertebrados (BEAR *et al.*, 2016). Ele é subdividido em cérebro, cerebelo e tronco encefálico (BEAR *et al.*, 2016).

Anatomicamente, o cerebelo é uma estrutura bastante conservada através da evolução em vertebrados (VOOGD & GLICKSTEIN, 1998; JIMSHELEISHVILI & DIDIDZE, 2021). Em humanos, é formado a partir do metencéfalo - uma subdivisão do rombencéfalo - na décima segunda semana embrionária, e localizado na fossa cranial posterior (ROOSTAEI *et al.*, 2014; SINGH, 2020). Equivale a cerca de um décimo do tamanho e massa cerebrais totais (ROOSTAEI *et al.*, 2014). Em mamíferos, ele é composto pelos hemisféricos cerebelares esquerdo e direito, unidos por uma estrutura medial denominada “vermis”. Cada hemisfério é subdividido em três lobos (floculonodular, posterior e anterior), que por sua vez são separados entre si por pequenas fissuras transversais (VOOGD & GLICKSTEIN, 1998). Seu córtex se organiza em um fino folheto único de substância branca coberta por substância cinzenta, fusionado por dobras na linha média (VAN ESSEN *et al.*, 2018).

Em termos celulares, o cerebelo é uma estrutura que evolutivamente difere entre as espécies – em humanos, contém mais de 70 bilhões de neurônios (equivalente a cerca de 70% a 80% de todos os neurônios do cérebro), e cerca de 4 bilhões de células gliais (HERCULANO-HOUZEL, 2009; ROOSTAEI *et al.*, 2014). Estes números aproximados indicam a particularidade de uma baixa proporção astrócitos-neurônios no cerebelo (ENDO *et al.*, 2022). Mais precisamente, células gliais equivalem a cerca de 18% de todas células no cerebelo, número este que pode chegar a quase 60% em outras estruturas humanas, como a substância cinzenta do córtex (HERCULANO-HOUZEL, 2014). A maior parte dos seus neurônios são pequenas células granulosas, aglomerados na camada celular do seu córtex; o restante são neurônios exclusivamente de transmissão do sinal do cerebelo para as demais estruturas do

SNC. Já as células gliais do cerebelo podem apresentar fenótipos próprios que se diferem das células de outras regiões cerebrais, como é o caso da microglia (STOESSEL & MAJEWSKA, 2021). Há também uma notável heterogeneidade fenotípica de astrócitos e oligodendrócitos cerebelares (BUFFO & ROSSI, 2013).

Funcionalmente, o cerebelo costuma ser associado à sua relevância motora, pois recebe aferências do córtex cerebral, medula e aparato vestibular e emite eferências para o tálamo, formação reticular, entre outros (SINGH, 2020). De fato, suas funções mais compreendidas e estudadas são a participação na manutenção do equilíbrio, controle do tônus muscular, coordenação de movimentos finos (SINGH, 2020; JIMSHELEISHVILI & DIDIDZE, 2021). Por este motivo, a perda de função cerebelar é amplamente reconhecida como causa de ataxias na marcha e nos movimentos axiais, radiais e apendiculares. Os movimentos oculares também podem sofrer anomalias, assim como pode haver disartria na fala (JAVALKAR *et al.*, 2014; MITOMA *et al.*, 2019). Porém, mais do que receber *inputs* e fornecer *outputs*, sua circuitaria por si só possui diversas ramificações. Assim, as sinapses cerebelares formam complexas redes extremamente conectadas com diversos pontos de controle e elementos de feedbacks positivos e negativos (REEBER *et al.*, 2013).

Tamanha complexidade levou a exploração da influência do cerebelo em funções não-motoras no SNC (STRICK *et al.*, 2009; BOSTAN *et al.*, 2013; VERKHRATSKY & SEMYANOV, 2023). De fato, o cerebelo de mamíferos vem sendo estudado quanto a sua comunicação com o córtex cerebral através dos circuitos cérebro-cerebelo (BUCKNER, 2013; KLEIN *et al.*, 2016; GUDKOV *et al.*, 2023). Através de estudos com neuroimagem, o cerebelo vem sendo associado também à percepção, cognição, memória e emoções (BUCKNER, 2013; WU & HALLETT, 2013; VAN ESSEN *et al.*, 2018), demonstrando sua versatilidade e relevância em contextos fisiológicos e patológicos (REEBER *et al.*, 2013; ARLEO *et al.*, 2023; RUDOLPH *et al.*, 2023).

1.2 ASTRÓCITOS

A nível celular, o SNC é composto por dois grupos de células especializadas: os neurônios e as células gliais. Estas últimas podem ser subdivididas em dois grupos distintos em termos morfofuncionais: a macroglia e a microglia (JÄKEL & DIMOU, 2017). Assim como os oligodendrócitos e polidendrócitos, os astrócitos fazem parte da macroglia (JÄKEL & DIMOU, 2017). Os astrócitos são células com elevado aumento de sua complexidade ao longo da evolução, constituindo nos vertebrados um grupo de células extremamente versáteis e especializadas funcionalmente (PARPURA & VERKHRATSKY, 2012).

1.2.1 Morfologia astrocitária

Os astrócitos são células cuja morfologia é heterogênea. Existem dois tipos mais comumente encontrados nas substâncias branca e cinzenta do SNC: respectivamente, os astrócitos fibrosos e protoplasmáticos (OBERHEIM *et al.*, 2012; ZHOU *et al.*, 2019). Ambos tipos astrocitários possuem contato direto com os vasos sanguíneos do SNC, porém os astrócitos protoplasmáticos ficam em contato íntimo com os terminais pré e pós-sinápticos, são maiores e possuem mais ramificações (SOFRONIEW & VINTERS, 2010; ZHOU *et al.*, 2019). Os astrócitos humanos costumam ser maiores, mais volumosos e possuem ramificações mais complexas do que astrócitos de roedores (OBERHEIM *et al.*, 2006).

Os astrócitos cerebelares, em particular, apresentam-se bastante especializados. No córtex cerebelar, são encontrados dois tipos: a glia de Bergmann e os astrócitos da camada granular, ambos protoplasmáticos; já na substância branca cerebelar, estão presentes os astrócitos fibrosos (CERRATO, 2020). Devido à heterogeneidade astrocitária, ainda não existe uma única molécula canônica cuja expressão seja suficiente para caracterizar astrócitos, sobretudo considerando marcadores astrocitários cerebelares (ZHANG *et al.*, 2019; ENDO *et al.*, 2022; BALDWIN *et al.*, 2023). A expressão da proteína glial fibrilar ácida (GFAP) nos filamentos médios do citoesqueleto e a presença do peptídeo B da proteína ligante de cálcio S100 (S100B) no citoplasma e núcleo dos astrócitos são dois marcadores gerais amplamente aceitos na literatura (ZHANG *et al.*, 2019).

Em conjunto com outras proteínas do citoesqueleto intermediário, como vimentina e actina, os astrócitos possuem ferramentas para permanecerem em contato com diversas células do SNC e com os vasos sanguíneos em situações de desenvolvimento, homeostase e patologia (SCHIWECK *et al.*, 2018; ARAÚJO *et al.*, 2019; POTOKAR *et al.*, 2020). Além de sua função, suas características morfológicas também podem ser modificadas frente à reatividade astrocitária, demonstrando sua versatilidade frente a diferentes contextos celulares (ENDO *et al.*, 2022).

1.2.2 Funções astrocitárias

Existem evidências da participação astrocitária em diversas funções do SNC, incluindo o suporte metabólico, a formação e regulação sináptica, as dinâmicas inflamatórias e oxidativas e homeostase neuronal (QUINCOZES-SANTOS *et al.*, 2021; ENDO *et al.*, 2022). Adicionando mais uma camada de complexidade, estudos de sequenciamento de ácido ribonucleico (RNA) têm revelado que os astrócitos são células com ampla heterogeneidade na morfologia, na expressão gênica e na regulação das moléculas associadas às suas vias de sinalização (BATIUK

et al., 2020; CLARKE *et al.*, 2020; ESCARTIN *et al.*, 2021). Esta heterogeneidade funcional ocorre tanto em nível *single cell* quanto em nível regional, a tal ponto que se busca identificar padrões de expressão gênica ou “assinaturas” astrocitárias de acordo com sua localização cerebral (ENDO *et al.*, 2022). Notavelmente, dada sua relevância para manutenção da fisiologia do SNC, disfunções astrocitárias podem ser observadas em diversos contextos patológicos, incluindo doenças neurodegenerativas (HAN *et al.*, 2021; BRANDEBURA *et al.*, 2022; LEE *et al.*, 2022).

1.2.2.1 Metabolismo de neurotransmissores

O glutamato é uma molécula atuante em diversas vias metabólicas, além de ser considerado o neurotransmissor excitatório mais predominante no SNC (ZHOU & DANBOLT, 2014). Ele é frequentemente associado a processos relevantes como o aprendizado, memória e plasticidade sináptica (ZHOU & DANBOLT, 2014). Há uma grande gama de neurônios glutamatérgicos distribuídos por todas as estruturas cerebrais, e um número ainda maior de células que expressam pelo menos um tipo de receptor ou transportador glutamatérgico (GASIOROWSKA *et al.*, 2021).

Apesar de sua relevância, o glutamato existente no SNC é majoritariamente intracelular, pois seus níveis extracelulares liberados fisiologicamente durante as despolarizações neuronais são fortemente regulados pelos astrócitos, células que compõe as sinapses tripartites (ISHIBASHI *et al.*, 2019; LALO *et al.*, 2021; CUELLAR-SANTOYO *et al.*, 2023). Assim, os astrócitos participam diretamente da captação do glutamato. Este processo se refere a transportadores astrocitários que são capazes de captar o excesso de glutamato extracelular que não se liga aos receptores nos terminais pós-sinápticos, evitando assim a chamada excitotoxicidade neuronal glutamatérgica (DONG *et al.*, 2009; SATARKER *et al.*, 2022). Por exemplo, os astrócitos expressam em sua membrana plasmática diversos transportadores da família EAAT (transportador de aminoácido excitatório): EAAT1, análogo do transportador de glutamato-aspartato (GLAST) e EAAT2, análogo do transportador 1 de glutamato (GLT-1) (MAHMOUD *et al.*, 2019; PAJARILLO *et al.*, 2019; TODD & HARDINGHAM, 2020)

A captação de glutamato é extremamente importante para a participação dos astrócitos na reciclagem deste neurotransmissor, que é integrada ao ácido- γ -aminobutírico (GABA). Trata-se do chamado ciclo do glutamato/GABA-glutamina (SCHOUSBOE *et al.*, 2014; ANDERSEN *et al.*, 2021). Inicialmente, através da enzima glutamina sintetase (GS) – expressa majoritariamente em astrócitos -, o glutamato é convertido em glutamina. A glutamina, por sua vez, serve de precursor para síntese *de novo* do glutamato (SCHOUSBOE *et al.*, 2014;

ANDERSEN *et al.*, 2023). Mais do que isto, esse ciclo é extremamente integrado à síntese do GABA - o principal neurotransmissor inibitório liberado no SNC - e outras vias metabólicas nos astrócitos, sobretudo com o ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) e a produção de energia celular (FRASER *et al.*, 1994; BODDUM *et al.*, 2016; ANDERSEN *et al.*, 2023). Dessa forma, modificações metabólicas nos astrócitos podem impactar na síntese de glutamato, GABA e na produção energética, conseqüentemente levando a disfunções sinápticas e neurodegeneração (DONG *et al.*, 2009; ANDERSEN *et al.*, 2023). Os astrócitos são, portanto, células associadas tanto a funções glutamatérgicas quanto GABAérgicas (ISHIBASHI *et al.*, 2019; LIU *et al.*, 2022).

1.2.2.2 Homeostase redox

Os astrócitos também são extremamente importantes para a manutenção da homeostase redox do SNC, particularmente em relação às dinâmicas de síntese e liberação de defesas antioxidantes (WILSON, 1997; MCBEAN, 2018). Em resposta à produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ERO) ou nitrogênio, os astrócitos podem modificar sua morfofuncionalidade a fim de combater seus efeitos tóxicos (PEUCHEN *et al.*, 1997; FERNANDEZ-FERNANDEZ *et al.*, 2012; BAXTER & HARDINGHAM, 2016).

Fisiologicamente, os astrócitos contam com um arsenal de antioxidantes para proteger a si próprios e as demais células do SNC, sobretudo os neurônios, frente a espécies reativas (RIZOR *et al.*, 2019). Alguns destes antioxidantes, como a enzima superóxido dismutase e o tripeptídeo glutatona (GSH) podem ser liberados no meio extracelular. A GSH é um peptídeo composto pela união de três aminoácidos: glutamato, cisteína e glicina (CHEN *et al.*, 2020). Os astrócitos possuem elevada expressão das enzimas associadas a sua síntese, caracterizando sua importância na síntese deste que é considerado um dos antioxidantes mais abundantes no SNC e indispensável para a sobrevivência neuronal (CHEN *et al.*, 2020; VICENTE-GUTIÉRREZ *et al.*, 2020). Outro mecanismo é o fator 2 relacionado ao fator nuclear eritroide 2 (Nrf2), um fator de transcrição sensível ao estado redox (VARGAS & JOHNSON, 2009). Na presença de ERO, o Nrf2 livre é translocado do citoplasma astrocitário para o núcleo, onde regula a expressão gênica de elementos antioxidantes, incluindo a própria GSH (VARGAS & JOHNSON, 2009; ALMEIDA *et al.*, 2023).

1.2.2.3 Neuroinflamação

Além de funções na homeostase, os astrócitos também participam ativamente na regulação da resposta imune a diversos estímulos no SNC através de sua reatividade (COLOMBO & FARINA, 2016; HASEL *et al.*, 2021; PATANI *et al.*, 2023). Estímulos como infecções por microrganismos, lesões agudas ou neurodegeneração crônica são capazes de induzir a reatividade astrocitária, promovendo mudanças fisiológicas e funcionais para um estado inflamatório, interferindo no equilíbrio entre as funções tróficas e tóxicas dos astrócitos (HASEL *et al.*, 2021; SINGH, 2022).

O estudo da transição para o estado inflamatório nos astrócitos é extremamente complexo. Trata de um processo heterogêneo – é modulável de acordo com a natureza e duração do estímulo, distribuição espacial das células no SNC e pelas características de dimorfismo sexual observadas nos indivíduos (GIOVANNONI & QUINTANA, 2020; HASEL *et al.*, 2021; PATANI *et al.*, 2023). Embora existam diferenças em nível *single cell* entre subgrupos de astrócitos reativos, as modificações costumam incluir diminuição nas funções de suporte trófico, diminuição na capacidade de captação de neurotransmissores, anomalias na atividade sináptica e aumento da expressão de proteína glial fibrilar ácida e vimentina (hipertrofia astrocitária) (SINGH, 2022; PATANI *et al.*, 2023).

Inicialmente, astrócitos com perfil pró-inflamatório possuem uma função neuroprotetora, tendo em vista que são recrutados para os sítios de insulto, aumentando sua capacidade fagocítica e formando barreiras físicas (gliose ou cicatriz glial) (CEKANAVICIUTE & BUCKWALTER, 2016; SINGH, 2022). A gliose é um fenômeno que tem origem no fato das células astrocitárias serem funcionalmente heterogêneas, plásticas e versáteis tanto durante a homeostase quanto em patologias (BAYRAKTAR *et al.*, 2015; WESTERGARD & ROTHSTEIN, 2020). Dentro deste contexto, elas são células capazes de responder ativamente a diversos sinais moleculares oriundos de neurônios, outras células gliais, microrganismos, proteínas do soro sanguíneo e moléculas oriundas de outros tecidos – processo este que chamamos de reatividade astrocitária (SOFRONIEW, 2020). A reatividade astrocitária prevê que, em resposta a sinais de injúria, os astrócitos são capazes de modificar de forma programada a sua morfologia, seus processos de transcrição gênica e tradução de proteínas a fim de modular suas funções (SIRACUSA *et al.*, 2019; SOFRONIEW, 2020; ESCARTIN *et al.*, 2021). Isto significa que, em resposta a esses estímulos, os astrócitos conseguem produzir um grande leque de moléculas efetoras que influenciam em diversas funções celulares, incluindo a imunovigilância, sinaptogênese, resposta inflamatória, defesas antioxidantes, bem como (astro)gliose e modulação do metabolismo celular (SIRACUSA *et al.*, 2019; TORRES-

CEJA & OLSEN, 2022). A persistência crônica de insultos, porém, é prejudicial – estas células produzem e secretam fatores de transcrição capazes de regular a ativação e recrutamento de células imunes, incluindo quimiocinas e citocinas, causando toxicidade crônica (CEKANAVICIUTE & BUCKWALTER, 2016; LINNERBAUER *et al.*, 2020).

Um dos principais pontos de convergência das vias de sinalização pró-inflamatórias resultam na ativação do fator de transcrição nuclear κ B (NF κ B), cuja translocação para o núcleo ativa genes dependentes do NF κ B (LINNERBAUER *et al.*, 2020; REID & KUIPERS, 2021). A ativação destes genes pode levar, por exemplo, à maturação de uma das principais interleucinas (IL) pró-inflamatórias no SNC, a IL-1 β (LINNERBAUER *et al.*, 2020). Além disso, a ativação de NF κ B possui ação inibitória sobre moléculas neuroprotetores capazes de inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias – como IL-1 β e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) – e estimular a biogênese mitocondrial através da expressão de coativador-1 alfa do receptor gama ativado por proliferador de peroxissomo (PGC-1 α) (CANTÓ & AUWERX, 2009; KAUPPINEN *et al.*, 2013). Estes fatores podem ser liberados pelos astrócitos reativos e induzirem a reatividade de outras células, como a microglia, e vice-versa (LINNERBAUER *et al.*, 2020; REID & KUIPERS, 2021; PATANI *et al.*, 2023).

Existem perfis de astrócitos reativos que negligenciam suas funções tróficas e ativamente impulsionam ou propagam o curso de patologias (HASEL *et al.*, 2021; PATANI *et al.*, 2023). Na doença de Alzheimer, os mediadores pró-inflamatórios produzidos por astrócitos reativos podem contribuir para o aumento da produção de oligômeros de β -amiloide (KAUR *et al.*, 2019; KWON & KOH, 2020). Através de processos semelhantes, a reatividade astrocitária crônica também pode participar da patofisiologia da doença de Parkinson e da esclerose lateral amiotrófica (KWON & KOH, 2020). Desta forma, é evidenciada a relevância astrocitária e sua heterogeneidade em termos de homeostase e patologia.

1.3 PROCESSO DE ENVELHECIMENTO

O envelhecimento é um fenômeno de definição específica bastante difícil. De forma abrangente, em termos biológicos, pode ser definido como o declínio funcional/senescência que afeta organismos vivos e eventualmente causa a morte (HARMAN, 2001; TROEN, 2003; BOOTH & BRUNET, 2017). Tradicionalmente associado ao tempo cronológico, a literatura mais recente também acrescenta fatores biológicos e ambientais a este processo (LÓPEZ-OTÍN *et al.*, 2013; FERRUCCI *et al.*, 2019). De fato, o termo “processo” é adequado para representar a dificuldade de traçar uma linha de corte do envelhecimento em modelos animais – ele ocorre

a todo instante, e todos organismos passam por um processo de amadurecimento antes de serem propriamente envelhecidos (SENGUPTA, 2013; MITCHELL *et al.*, 2015).

O cerebelo costuma ser considerado uma estrutura resistente aos efeitos do amadurecimento e do envelhecimento em relação a outras estruturas do SNC (LIANG & CARLSON, 2020). Ainda assim, apresenta níveis de modificações morfológicas e transcriptômicas em relevantes parâmetros metabólicos, oxidativos e inflamatórios (*inflammaging*) em diferentes faixas etárias de modelos animais (LIANG & CARLSON, 2020; ZHU *et al.*, 2022). Em nível tecidual, a progressão da idade pode estar associada à perda de volume e alterações morfológicas no cerebelo, acarretando problemas motores e cognitivos (LUFT *et al.*, 1999; BERNARD & SEIDLER, 2014; LIANG & CARLSON, 2020). Já em termos celulares e moleculares, os efeitos progressivos do amadurecimento podem, cronicamente, levar os astrócitos a adquirirem perfil reativo semelhante ao envelhecido, que é associado a disfunções mitocondriais e sinápticas, como observado na neurodegeneração (HAN *et al.*, 2020; ISKUSNYKH *et al.*, 2024). Considerando suas funções tróficas de suporte neuronal, de metabolismo, participação na plasticidade sináptica e na regulação dos status redox e inflamatório, os astrócitos participam ativamente do processo de envelhecimento (COTRINA & NEDERGAARD, 2002; RODRÍGUEZ-ARELLANO *et al.*, 2016; VERKHRATSKY & SEMYANOV, 2023). No entanto, os mecanismos celulares através dos quais os astrócitos participam do processo de progressão do envelhecimento, não estão totalmente esclarecidos. Dessa forma, faz-se necessária a identificação das modificações em astrócitos cerebelares maduros e não-maduros, antes destes adquirirem um perfil senescente crônico.

1.4 CULTURA PRIMÁRIA

Com o papel central dos astrócitos sendo cada vez mais descrito nas funções fisiológicas e patológicas do SNC, é necessário desenvolver modelos de estudo destas células. Estes modelos devem replicar as condições astrocíticas fisiológicas *in vivo* dos seres humanos da melhor forma possível (LANGE *et al.*, 2012; SCHILDGE *et al.*, 2013). Nesse sentido, um dos modelos mais versáteis, dos quais muito do conhecimento atual sobre astrócitos deriva, é a cultura primária (LANGE *et al.*, 2012). A cultura primária de astrócitos consiste no isolamento e cultivo de células derivadas diretamente de um tecido animal *in vivo* (KIMELBERG, 1983). O tecido deve passar por um processo de dissociação, e as células devem ser cultivadas em condições que favoreçam o isolamento e seleção do tipo celular de interesse – incluindo meio de cultivo com nutrientes necessários, temperatura ótima de incubação e composição ideal de gases (SCHILDGE *et al.*, 2013; SUN *et al.*, 2017). Posteriormente, as células devem ficar

disponíveis para coleta, a fim de realizar avaliações observacionais e experimentais acerca de seus parâmetros morfológicos, bioquímicos e farmacológicos (DEGL'INNOCENTI & DELL'ANNO, 2023).

A cultura astrocitária primária de algumas estruturas cerebrais, como o córtex, já foi caracterizada em termos morfológicos e funcionais, bem como comparada com astrócitos humanos (SOUZA *et al.*, 2013; DEGL'INNOCENTI & DELL'ANNO, 2023). Ainda que sejam identificadas algumas diferenças para com o tecido e célula humanos, como complexidade de ramificações menores do que astrócitos humanos, o modelo de cultura primária consegue reproduzir alguns parâmetros de morfologia, metabolismo e funções inflamatórias e oxidativas dos astrócitos (SOUZA *et al.*, 2013). Com esta caracterização, é possível avaliar em um modelo confiável os diferentes contextos biológicos, como o amadurecimento e envelhecimento (SOUZA *et al.*, 2015). Por exemplo, no hipocampo, o modelo consegue replicar parâmetros clássicos astrocitários de morfologia e função, apresentando até mesmo mudança na expressão do marcador de senescência inibidor 1 da quinase dependente de ciclina (p21) em culturas derivadas de animais mais velhos (BELLAYER *et al.*, 2017; BELLAYER *et al.*, 2018). Portanto, a cultura primária, embora demande maior tempo e logística, é um modelo versátil e confiável, capaz de replicar significativamente parâmetros astrocitários em relação a outros modelos (GALLAND *et al.*, 2019).

2 JUSTIFICATIVA

O processo de envelhecimento promove diversas modificações em nível celular e molecular no SNC, incluindo, por exemplo, alterações na funcionalidade das células gliais. Modificações que incluam disfunções gliais podem contribuir para a vulnerabilidade do SNC a processos tóxicos que culminam em patologias, inclusive associadas ao cerebelo. Assim, para caracterizar e avaliar os impactos do processo de envelhecimento nessas células, é possível analisar diversos parâmetros bioquímicos nos astrócitos cerebelares em culturas primárias derivadas de diferentes faixas etárias como astrócitos “jovens” e “maduros”, que antecedem o fenótipo senescente. Esta caracterização no tecido e na cultura é importante para compreender o amadurecimento no cerebelo, e papel das células astrocitárias neste processo. Modificações nas funções motoras amplamente reconhecidas e suas possíveis funções não-motoras podem ter impacto não apenas no cerebelo em si, como nas demais estruturas do SNC.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho objetiva avaliar parâmetros morfológicos e funcionais de cultura primária de astrócitos de cerebelo de ratos Wistar neonatos (NEO) e adultos (AD) machos e assim caracterizá-los em função da idade.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar o perfil de expressão de genes-chave no tecido cerebelar NEO e AD;
- Caracterizar marcadores astrogliais clássicos como GFAP, vimentina, nestina e S100B;
- Avaliar a viabilidade celular e os níveis extracelulares de lactato das culturas astrogliais em função da idade;
- Avaliar parâmetros glutamatérgicos nas culturas de astrócitos como captação de glutamato, expressão e conteúdo proteico de GLAST, Glt-1 e carreador 1 de aminoácido excitatório (EAAC1);
- Avaliar a atividade da enzima GS e os níveis de GSH;
- Avaliar o perfil inflamatório através da expressão de NFκB e secreção de IL-1β e TNF-α;
- Avaliar a expressão de Nrf2, heme oxigenase-1 (HO-1) e citrato sintase (CS).

PARTE II

4 METODOLOGIA

4.1 APROVAÇÃO E UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS NA PESQUISA

O projeto para utilização de animais foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFRGS, registro de número #42990. Para os experimentos de análise de tecido cerebelar, bem como de preparação das culturas primárias, foram utilizados 30 ratos Wistar machos NEO (idade de três dias) e 30 AD (idade de 90 dias). Os animais foram separados em três levas de 10 animais de cada idade. Os animais NEO foram transportados no mesmo dia de sua eutanásia, sem a mãe, e foram mantidos aquecidos com bolsa térmica ao longo da viagem. Já os animais AD nasceram e foram mantidos até os 83 dias no Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Após, os animais foram transportados via terrestre por veículo oficial do CREAL até o Departamento de Bioquímica da UFRGS, onde ficaram alojados por período mínimo de uma semana no biotério do departamento, visando sua ambientação. Durante sua estadia no CREAL e no Departamento de Bioquímica, os animais foram mantidos em condições de acordo com a Resolução Normativa 15 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Os animais AD foram acomodados em caixas de policarbonato (365 x 207 x 140 mm), forradas com serragem de madeira (maravalha) limpa e substituídas duas vezes por semana pelos funcionários do biotério. As condições de manutenção dos animais seguiram o padrão do biotério, com ciclo de 12 horas claro/escuro, temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), água potável e ração *ad libitum*.

4.2 AMOSTRAS DE TECIDO E CULTURA PRIMÁRIA DE CEREBELO DE RATOS WISTAR MACHOS

As culturas primárias de astrócitos cerebelares de ratos Wistar machos NEO (três dias) e AD (90 dias) foram padronizadas neste projeto, guiadas pela descrição conforme SOUZA *et al.*, 2013. Para todas as idades, foi utilizado somente um animal por cultura. Os animais foram eutanasiados via decapitação com tesoura cirúrgica amolada sem utilização de anestésicos – para animais NEO. A decapitação via guilhotina com utilização de anestésico em solução de isoflurano 1% foi utilizada para animais AD. Após decapitação, o cerebelo foi dissecado e a meninge que cerca a estrutura foi removida com auxílio de pinças cirúrgicas, em capela de fluxo laminar também esterilizada. Para alguns animais, o tecido cerebelar foi separado em

fragmentos menores e armazenado a seco ou em solução de RNA *Later* em freezer -20°C a fim de ser reservado para as análises em tecido cerebelar.

Para o tecido que seguiu para dissociação conforme procedimento para cultura primária, o tecido foi cortado em fragmentos menores, e foi dissociado enzimaticamente em tubo Falcon esterilizado contendo 5 mL de solução salina balanceada de Hanks (HBSS), 100 µL de tripsina e 50 µL de DNase 5 mg/mL para animais NEO, ou 10 ml de HBSS, 200µL de tripsina e 100 µL de DNase 5 mg/mL para animais AD. A solução permaneceu em descanso em banho-maria a 37°C por 10 minutos para animais NEO e 15 minutos para animais AD. Em seguida, foi realizada uma dissociação mecânica com pipeta Pasteur afinada por 10 minutos, ou até dissociação total do tecido para animais NEO. Para animais AD, a dissociação mecânica se deu via pipeta Pasteur não afinada por 5 minutos e posteriormente com pipeta Pasteur afinada por 10 minutos. A reação foi interrompida adicionando 1 mL de soro fetal bovino (SFB) para NEO e 2 mL para AD. O homogenato de células obtido foi submetido a uma centrifugação a 1400 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, e o pellet foi suspenso em novos 5 mL de HBSS para animais NEO ou 10 mL para animais AD. Houve uma nova dissociação mecânica com pipeta Pasteur afinada por 5 min para animais NEO, ou 10 minutos para animais AD. Após, o homogenato foi deixado em decantação na capela de fluxo laminar - 15 minutos para animais NEO e 30 minutos para animais AD. Decorrido este tempo, o volume de sobrenadante formado foi completamente coletado com pipeta P1000 e transferido para um novo tubo Falcon, que foi centrifugado a 1400 rpm por 7 minutos. O sobrenadante foi descartado, e o pellet contendo as células foi ressuspenso em volume de meio para cultivo celular DMEM/F12 (*Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F12*), contendo 10% de SFB e suplementado com HEPES (15 mM), NaHCO₃ (14.3 mM), anfotericina B (2.5 µg/mL), gentamicina (0.05 mg/ml). Um volume de 10 µL de suspensão foi colocado em câmara de Neubauer (30 x 70 x 4 mm) para contagem das células em microscópio com contraste de fase. Posteriormente, a suspensão foi plaqueada em placas de cultivo de poliestireno transparente de 6 ou 24 poços, previamente revestidos com poli-L-lisina. A solução foi pipetada em volumes na placa de tal maneira que a densidade de células por poço ficava aproximadamente 1.000.000 células/poço para NEO e 1.500.000 células/poço para AD nas placas de 6 poços, e 200.000 células/poço para NEO e 600.000 células/poço para AD nas placas de 24 poços. Posteriormente, as células plaqueadas foram cultivadas em incubadora a temperatura de 37°C com injeção contínua de 5% de gás carbônico (CO₂). A primeira troca de meio foi realizada 24 horas após o plaqueamento. Posteriormente, cada troca de meio foi periodicamente realizada a cada 3 dias. Todas as trocas

foram feitas utilizando pipeta Pasteur de plástico esterilizada, considerando volume de 1 mL/poço para as placas de 6 poços, e 500 µL/poço para as placas de 24 poços. As células foram mantidas nestas condições até sua confluência, atingida em aproximadamente 28 dias *in vitro* para ambas as idades.

Todos os materiais sólidos sem líquidos utilizados durante essas etapas foram devidamente autoclavados, limpos com solução álcool etílico 70% e expostos à radiação ultravioleta antes de serem utilizados. Durante todas as etapas que transitaram entre o ambiente fora da capela de fluxo laminar, os tubos Falcon contendo o tecido e homogenato de células foram vedados com fita Parafilm.

4.3 MORFOLOGIA CELULAR

A morfologia celular das culturas de astrócitos primários foi observada inicialmente em microscopia por contraste de fase (microscópio Nikon com câmera digital DXM1200C). Posteriormente, utilizou-se a imunocitoquímica nos astrócitos primários cerebelares. Resumidamente, o meio extracelular foi removido dos poços das placas de 24 poços, e as células aderidas na superfície foram fixadas com solução 4% paraformaldeído/poço. Após, as células foram permeabilizadas com solução 0,01% Triton X-100 diluído em tampão fosfato salino (PBS) e permeabilizadas com solução de 5% SFB diluído em PBS. Após, as células foram marcadas com anticorpos primários para GFAP (Sigma-Aldrich; Cod: G9269), vimentina (Invitrogen; Cod: MA5-11883) e actina (Proteintech; Cod: HRP600008) e mantidas *overnight* a 4°C, protegidas da luz com papel alumínio. Após, foi feita a incubação com anticorpos secundários conjugados a peroxidase de rábano (HRP) anti-camundongo (Cytiva; Cod: NA9310) ou anti-coelho (Cytiva; Cod: NA934V). As imagens foram obtidas através de microscópio invertido Olympus.

4.4 VIABILIDADE CELULAR

A viabilidade celular foi avaliada através do método de redução do brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT), de coloração amarela, em cristais roxos de formazan. Resumidamente, o ensaio consiste na adição do MTT (50 µg/ml) no meio extracelular das placas de 24 poços com células derivadas de animais NEO e AD. Após, elas foram incubadas em temperatura de 37°C por 30 minutos. Decorrido este tempo, o meio extracelular é removido, e adiciona-se dimetilsulfóxido (DMSO). A placa é agitada em agitador

por 2 minutos até a solubilização completa dos cristais de formazan. Após, a solução roxa formada é lida em espectrofotômetro, nos comprimentos de onda 560 e 650 nm. Os experimentos foram feitos em duplicata. Os resultados são expressos como porcentagem em relação ao controle (células derivadas de animais NEO).

4.5 QUANTIFICAÇÃO DE LACTATO EXTRACELULAR

Para a quantificação do lactato extracelular utilizou-se 100 µL de meio extracelular coletados diretamente do poços das placas de 24 poços. A partir deste volume, utilizou-se um kit comercial (Bioclin; Cod: K084) para promover a reação. De acordo com as instruções fornecidas na bula do kit, as amostras foram lidas em espectrofotômetro, no comprimento de onda 340nm. Os resultados são expressos como concentração de lactato em milimolar (mM).

4.6 ATIVIDADE DE GS

A determinação da atividade da enzima GS foi realizada em lisado celular. Primeiramente, o meio extracelular foi removido e as células foram lisadas em 150 µL de solução de cloreto de potássio (KCl) 0,15M a 0°C. Após, o lisado foi transferido para um eppendorf de 1,5 mL utilizando seringa descartável para insulina. As amostras foram armazenadas em freezer a -20°C até o momento de sua utilização. Para sua utilização, foram adicionados 90 µL de tampão A (solução contendo 150 mM de cloreto de magnésio (MgCl₂), 250 mM de L-glutamato, 500 mM de tampão imidazol-ácido clorídrico (HCl), 150 mM de 2-mercaptoetanol, 750 mM de hidroxilamina-HCl) e 10 µL de ATP 150 mM. A reação foi incubada em banho-maria a 37°C por 15 minutos e interrompida utilizando 400 µL de tampão B (mistura de cloreto férrico (FeCl₃), HCl, ácido tricloroacético e água ultrapura Milli-Q® tipo 1). Após, os eppendorfs são centrifugados a 1000 rpm por 10 min e 200 µL são transferidos para uma placa de 96 poços. As amostras são lidas em espectrofotômetro, no comprimento de onda 530 nm. Os experimentos foram feitos em triplicata. Os resultados são expressos em µmol/mg de proteína/h.

4.7 CONTEÚDO DE GSH

A determinação da atividade da GSH foi realizada em lisado celular. Primeiramente, o meio extracelular foi removido e as células foram lisadas em 150 µL de solução fosfato-KCl 0,15 M em temperatura ambiente. Após, o lisado foi transferido para um eppendorf de 1,5 mL utilizando seringa descartável para insulina. As amostras foram armazenadas em freezer a 20°C

até o momento de sua utilização. Para sua utilização, a amostra é aliqüotada e misturada com 3-ácido mercaptopropiônico (MPA) na proporção 1:1. Após, oftaldeído (OPT) 1 mg/mL (em metanol) é adicionado, e a mistura é pipetada em placas de 96 poços e incubada por 15 minutos em temperatura ambiente, protegida da luz com papel alumínio. Decorrido este tempo, a placa protegida da luz é colocada num agitador em velocidade lenta por 5 min. Posteriormente, a fluorescência é avaliada nos comprimentos de onda de excitação de 350 nm e emissão de 420 nm. A curva padrão desta técnica é realizada a partir de uma solução padrão contendo GSH 10 mM, que sofre diluições seriadas e resultam em concentrações que vão de 0 a 500 μ M. Os resultados foram expressos em nmol/mg de proteína.

4.8 EXTRAÇÃO DE RNA E REAÇÃO DA TRANSCRIPTASE REVERSA SEGUIDA DE REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL (RT-PCR)

Para avaliação do conteúdo de RNA mensageiro (RNAm), as células de cultura astrogliol primária foram inicialmente preparadas removendo o meio extracelular. Posteriormente, as células aderidas na superfície dos poços foram removidas através de lise com 900 μ L de solução de TRIzol visando a extração do RNAm. Após, as células foram armazenadas em freezer -80°C até sua utilização. Para as amostras de tecido armazenadas conforme item 4.2, a solução estabilizadora RNAlater foi removida e o tecido foi lisado em reagente TRIzol para extração do RNA.

Para obtenção do DNA complementar (DNAc) a partir do RNA das células, o RNA total das amostras foi submetido ao processo de transcrição reversa através do kit AppliedBiosystems. Para obter o RNAm a partir do DNAc, foram utilizadas sondas Taqman para os seguintes transcritos: actina (Rn00667869_m1), CS (Rn01774378_m1), EAAC1 (Rn00564705_m1), GFAP (Rn01253033_m1), GLAST (Rn00665096_m1), Glt-1 (Rn00691548_m1), transportador de glicose-1 (Glut1, Rn01417099_m1), nestina (Rn01455599_g1), NF κ B (Rn01502266_m1), Nrf2 (Rn00582415_m1), p21 (Rn00580460_m1), PGC-1 α (Rn00580241_m1), TNF- α (Rn99999017_m1), e vimentina (Rn00667825_m1). As amostras foram lidas utilizando o sistema QuantStudio1. Os resultados foram calculados utilizando o método $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$, foram normalizados de acordo com os níveis de actina e expressos em relação aos níveis dos animais NEO.

4.9 NÍVEIS DE CITOCINAS EXTRACELULARES

O meio extracelular foi removido após confluência e armazenado em freezer a -20°C até a utilização das amostras. Foram utilizados kits comerciais de ensaio de imun absorção enzimática (ELISA) da marca Invitrogen do tipo específicos para ratos das citocinas IL-1 β (Invitrogen; Cod: 88-6010-22, faixa de sensibilidade 39 pg/mL) e TNF- α (Invitrogen; Cod: 88-7340-88, faixa de sensibilidade 16 pg/mL). Os procedimentos foram realizados de acordo com as instruções contidas na bula do fabricante. Os resultados foram expressos em porcentagem em relação aos níveis do grupo NEO.

4.10 CAPTAÇÃO DE GLUTAMATO EXTRACELULAR

A captação de glutamato extracelular se deu imediatamente após a remoção do meio extracelular dos poços das placas. As placas foram incubadas a 37°C em placa de aquecimento, e foram adicionados 280 μL de solução de HBSS com sódio e 20 μL de glutamato tritiado (L-[3H] glutamato). Após 7 minutos de incubação, a reação foi interrompida removendo o HBSS com sódio e lavando os poços três vezes com HBSS sem sódio gelado. Após, as células foram permeabilizadas *overnight* em 300 μL de NaOH 0,5 M. O conteúdo foi transferido para eppendorfs, onde foi adicionado e homogeneizado 1 mL de líquido de cintilação. A radioatividade emitida pela glutamato tritiado foi medida em cintilador PerkinElmer Tri-Carb 2300TR. Os valores foram corrigidos pela dosagem de proteínas totais de cada amostra. Os resultados foram expressos em nmol/mg/min.

4.11 WESTERN BLOTTING

A realização da técnica seguiu o sistema de eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS), também conhecida como SDS-PAGE. Todas as amostras foram normalizadas para terem igual quantidade de proteínas totais (30 μg). As amostras de cultura e tecido foram lisadas respectivamente em 100 e 500 μL de solução de Stopping A 4% (dodecil sulfato de sódio (SDS) 10%, EDTA 100 mM, Tris 500 mM e água ultrapura Milli-Q[®] tipo 1) utilizando seringa de insulina e/ou pistilo. Após seu descongelamento, as amostras de cultura primária foram fervidas a 95°C por 5 minutos, enquanto as amostras de tecido foram fervidas por 10 minutos. Após, elas foram centrifugadas a 10000 g por 10 minutos. O pellet formado foi descartado, e no sobrenadante coletado foram adicionados 25% de solução Stopping B (glicerol 40%, diluído em Tris 500 mM e água ultrapura Milli-Q[®] tipo 1 e adicionado de azul de bromofenol) em relação ao volume de Stopping A, e 5% de mercaptoetanol em relação ao

volume total. Posteriormente, foram armazenadas em freezer a -20°C até o momento de realização de sua inclusão em gel.

Para a corrida, foram preparados géis de entrada (acrilamida 40%, Tris 500 mM, SDS 1%, tetrametiletilenodiamina (Temed), persulfato de amônia (APS) 10%, glicerol e água ultrapura Milli-Q® tipo 1) e géis de separação (acrilamida 40%, Tris 1,5 M, SDS 1%, Temed, APS 10% e água ultrapura Milli-Q® tipo 1). Após sua inclusão no gel com pipeta Pasteur, a separação das proteínas se deu em 10 minutos a 150 V e 1 h a 180 V em amperagem flutuante.

A transferência para membranas de nitrocelulose procedeu molhando-as em Bjerrum. As membranas foram corada com corante de Ponceau por 2 min, e posteriormente foram lavadas com ácido acético 0,01% e solução salina tamponada com Tris (TBS). Posteriormente, as membranas foram bloqueadas em solução 5% albumina bovina sérica (BSA) pernoite sob agitação, em câmara fria a 4°C . Após, foram feitas lavagens com TBS com Tween-20 (T-TBS). Posteriormente, as amostras de cultura foram incubadas pernoite sob agitação em câmara fria a 4°C com anticorpo primário anti-actina (Proteintech; Cod: HRP600008) anti-GFAP, (Sigma-Aldrich; Cod: G9269), anti-vimentina, (Invitrogen; Cod: MA5-11883), anti-EAAT1, (Abcam; Cod: Ab416), anti-EAAT2, (Abcam; Cod: Ab41621), anti-EAAT3, (Novus Biologicals; Cod: NBP1-20137), anti-transportador 1 de glicose (GLUT1, ThermoFisher; Cod: PA1-46152) e anti-S100B (Sigma-Aldrich; Cod: S2532), todos diluídos em T-TBS. Após, as membranas foram lavadas com T-TBS, e foi adicionado o anticorpo secundário conjugado a peroxidase de rábano (HRP) anti-camundongo (Cytiva; Cod: NA9310) ou anti-coelho (Cytiva; Cod: NA934V), em agitação por 2h em temperatura ambiente. Posteriormente, a revelação foi feita utilizando soluções de luminol 250 mM e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 10,6 mM em fotodocumentador Bio-rad ChemDoc MP Imaging System. A densidade ótica das bandas formadas foi avaliada em ImageJ. Os resultados foram expressos em porcentagem em relação ao grupo controle (NEO).

4.12 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

Para todas as metodologias descritas, quando necessária a normalização de acordo com a quantidade de proteínas nas amostras, a quantificação de proteína foi realizada pelo método modificado de Lowry (Peterson), conforme descrito em PETERSON, 1977. Para construção da curva padrão, foram utilizadas alíquotas de BSA 1 mg/ml armazenadas em freezer a -20°C . A leitura das absorbâncias foi feita em leitor Varioskan Lux.

4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados coletados nos experimentos foram expressos como a média \pm desvio padrão de pelo menos três experimentos independentes e amostras avaliadas em duplicata. Conforme necessário, a diferenças estatística entre os grupos foi analisada utilizando teste t de *Student*. Foram considerados significativos valores de $P < 0,05$.

5 RESULTADOS

Os resultados desta dissertação estão divididos em duas partes. Inicialmente, serão apresentados os resultados referentes às análises do tecido cerebelar. Posteriormente, serão apresentados os referentes à cultura de astrócitos cerebelares. Esta ordem foi escolhida pois a etapa inicial deste projeto visava definir o perfil de expressão gênica e proteica de diversos genes e proteínas-chave para as funções astrocitárias no tecido cerebelar total de animais NEO e AD. Posteriormente, foram conduzidos experimentos para traçar o perfil da cultura de astrócitos cerebelares de animais maduros.

5.1. ANÁLISES EM TECIDO CEREBELAR

5.1.1 Marcadores astrocitários clássicos

Inicialmente, na Figura 1, avaliou-se no tecido cerebelar a expressão gênica e conteúdo proteico de marcadores astrocitários clássicos: GFAP, vimentina, nestina e S100B (JURGA *et al.*, 2021). A avaliação da expressão gênica do tecido cerebelar foi realizada utilizando o método RT-PCR. Já o conteúdo proteico foi avaliado através de *western blotting*.

Verificou-se que, em relação ao amadurecimento, houve um aumento na expressão gênica de GFAP nos animais AD (Figura 1A, $P < 0,0001$). Um aumento do conteúdo proteico de GFAP (Figura 1B, $P = 0,0136$) corroborou este resultado. Não foi observada variação estatística significativa entre os neonatos e adultos na expressão gênica de vimentina (Figura 1C), nem em seu conteúdo proteico (Figura 1D). A expressão gênica de nestina nos animais AD diminuiu em relação a NEO (Figura 1E, $P = 0,0003$). Já o conteúdo proteico da proteína S100B aumentou em relação ao controle (Figura 1F, $P = 0,0156$).

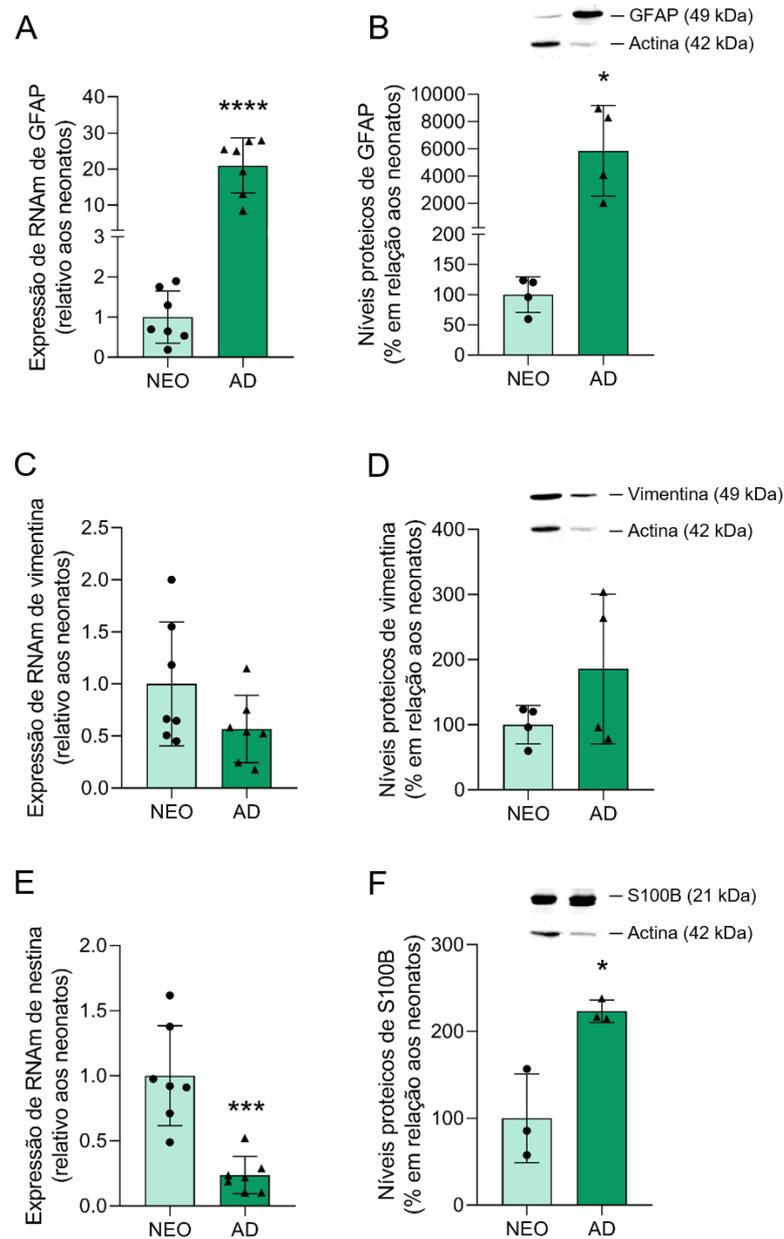


Figura 1. Marcadores astrocitários clássicos em tecido cerebelar. Expressão de RNAm de GFAP (A), vimentina (C) e nestina (E) e o conteúdo proteico de GFAP (B), vimentina (D) e S100B (F). Os dados representam a média \pm D.P. de sete experimentos independentes para expressão de RNAm, e pelo menos três experimentos independentes para o conteúdo proteico. As diferenças entre os grupos foram analisadas estatisticamente usando teste t de *Student*. Foram considerados significativos os valores de $P < 0,05$.

5.1.2 Parâmetros do metabolismo glutamatérgico

Na Figura 2, foram avaliados parâmetros referentes ao transporte do neurotransmissor glutamato: GLAST, GLT-1 e EAAC1 (ROWLEY *et al.*, 2012). Tanto na expressão quanto no

conteúdo proteico de GLAST, houve aumento em relação ao controle NEO (Figura 2A, $P=0,0051$ e Figura 2B, $P=0,0264$, respectivamente), assim como na expressão gênica e conteúdo proteico de GLT-1 (Figura 2C, $P=0,0030$ e Figura 2D, $P=0,0122$, respectivamente). A expressão gênica de EAAC1 (Figura 2E) não apresentou variação em relação à idade, mas apresentou aumento em relação ao seu conteúdo proteico (Figura 2F, $P=0,0010$).

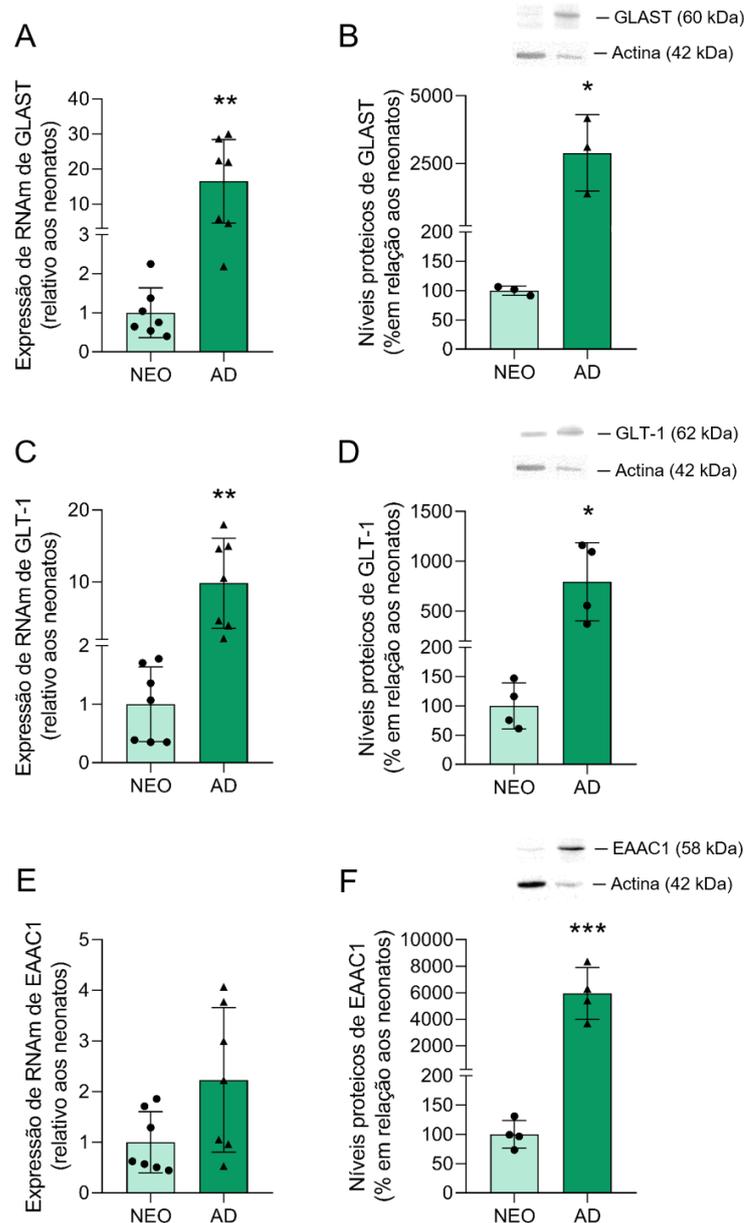


Figura 2. Parâmetros do metabolismo glutamatérgico em tecido cerebelar. Expressão de RNAm e conteúdo proteico dos seguintes genes, respectivamente: GLAST (A e B), GLT-1 (C e D) e EAAC1 (E e F), que são representados como a média \pm D.P. de sete experimentos independentes para a expressão de RNAm, e pelo menos três experimentos independentes para os níveis proteicos. As diferenças entre os grupos foram analisadas estatisticamente usando teste t de *Student*. Foram considerados significativos os valores de $P < 0,05$.

5.1.3 Inflamação, fatores de transcrição e senescência

Na Figura 3, foram avaliados no tecido cerebelar fatores pró-inflamatórios TNF- α e NF κ B, além do fator de transcrição Nrf2. Também foi avaliada a expressão de p21. A expressão de TNF- α (Figura 3A, P= 0,0085), Nrf2 (Figura 3C, P= 0,0002) e p21 (Figura 3D, P=0,0089) aumentou nos animais AD em relação aos animais NEO. Já a expressão de NF κ B (Figura 3B) não variou em relação ao processo de envelhecimento.

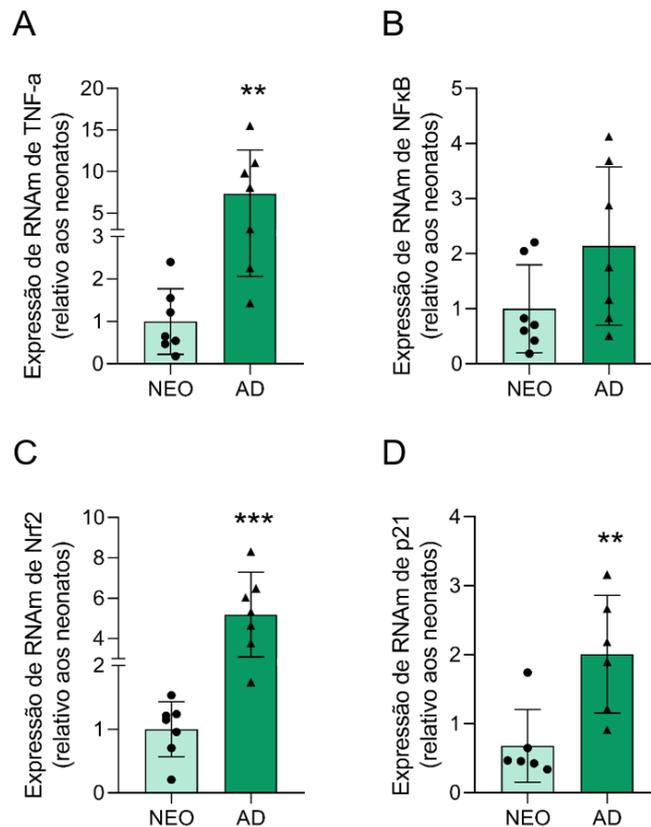


Figura 3. Inflamação, fatores de transcrição e senescência em tecido cerebelar. Expressão de RNAm de TNF- α (A), NF κ B (B), Nrf2 (C) e p21 (D), representados como a média \pm D.P. de pelo menos seis experimentos independentes. As diferenças entre os grupos foram analisadas estatisticamente usando teste t de *Student*. Foram considerados significativos os valores de P<0,05.

5.1.4 Determinação de parâmetros mitocondriais e energéticos

Na Figura 4, foi avaliada a expressão gênica de dois parâmetros referentes ao metabolismo energético mitocondrial (SHU *et al.*, 2021): PGC-1 α e CS. Também foi avaliado o conteúdo proteico de um parâmetro energético associado ao metabolismo da glicose (KREFT *et al.*, 2012): o transportador Glut1. Ambos os marcadores mitocondriais, PGC-1 α (Figura 4A,

P=0,0254) e CS (Figura 4B, P=0,0095), além do transportador de glicose Glut1 (Figura 4C, P=0,0004), demonstraram aumento quando animais AD foram comparados aos animais NEO.

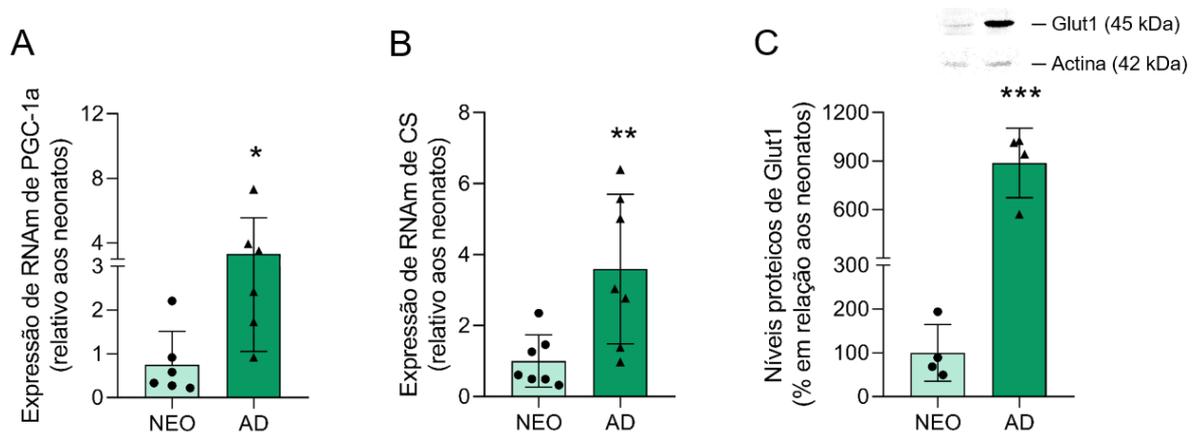


Figura 4. Determinação de parâmetros mitocondriais e energéticos em tecido cerebelar. Expressão de RNAm de PGC-1 α (A) e CS (B) e o conteúdo proteico de Glut1 (C), representados como a média \pm D.P. de pelo menos sete experimentos independentes para a expressão de RNAm e quatro experimentos independentes para os níveis proteicos. As diferenças entre os grupos foram analisadas estatisticamente usando teste t de *Student*. Foram considerados significativos os valores de $P < 0,05$.

5.2 ANÁLISES EM CULTURA DE ASTRÓCITOS CEREBELARES

5.2.1 Caracterização morfológica

A próxima etapa desta dissertação foi caracterizar um protocolo de rotina para cultivo de astrócitos cerebelares. Neste sentido, avaliamos a morfologia astrocitária de culturas primárias de cerebelo derivadas de animais AD e as comparamos com as de animais NEO. Conforme mostrado na figura 5, foram realizadas a microscopia por contraste de fase e marcação imunofluorescente de proteínas do citoesqueleto: GFAP, vimentina e actina (JURGA *et al.*, 2021). A marcação de GFAP e vimentina mostraram um formato poligonal e fusiforme dos astrócitos, também observados em contraste de fase. Em relação à marcação de actina, foram observadas fibras de estresse organizadas paralelamente no citoesqueleto dos animais dos animais, porém mais pronunciadas em animais NEO.

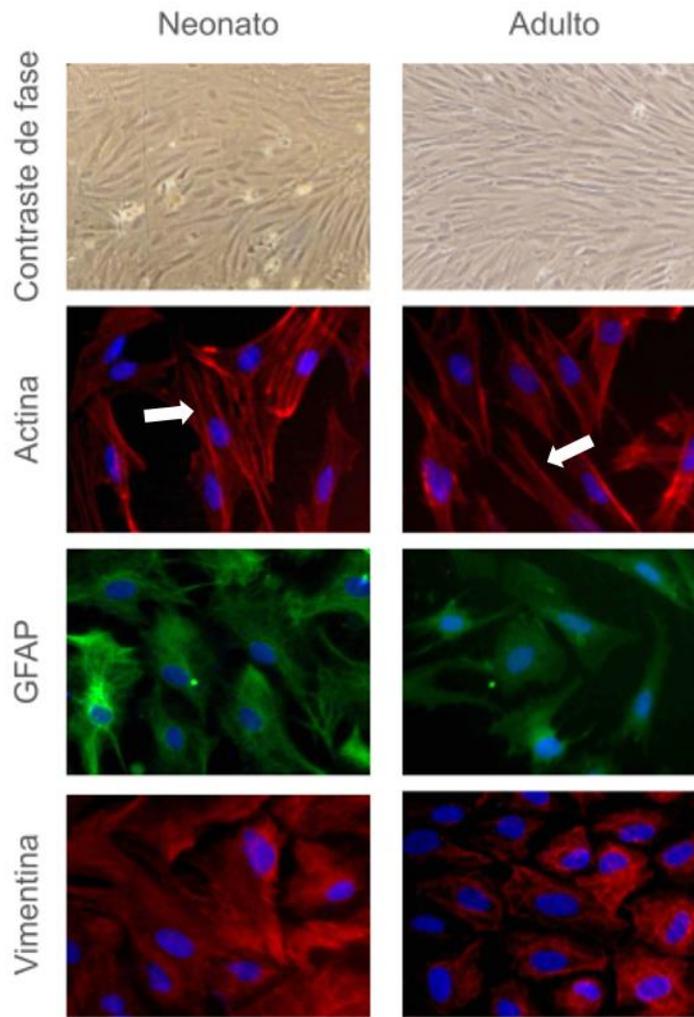


Figura 5. Caracterização morfológica em cultura de astrócitos cerebelares. Na coluna da esquerda estão imagens representativas de astrócitos cerebelares primários derivados de animais NEO; à direita, de animais AD. Na primeira linha, imagens de contraste de fase. Nas linha subsequentes, respectivamente, imagens de imunofluorescência para actina (vermelho), GFAP (verde) e vimentina (vermelho). As setas brancas indicam a orientação das fibras de estresse dispostas paralelamente. Todas as imagens foram tiradas em lente de aumento 100x em microscópio invertido Olympus IX70.

5.2.2 Avaliação de marcadores astrocitários

Na figura 6, foi avaliado o conteúdo proteico de três marcadores astrocitários clássicos: GFAP, vimentina e S100B (ZHANG *et al.*, 2019). Houve redução de todos os parâmetros analisados nas culturas derivadas de animais AD comparadas com as culturas derivadas de animais NEO: GFAP (Figura 6A, $P < 0,0001$), vimentina (Figura 6B, $P = 0,0008$) e S100B (Figura 6C, $P < 0,0001$).

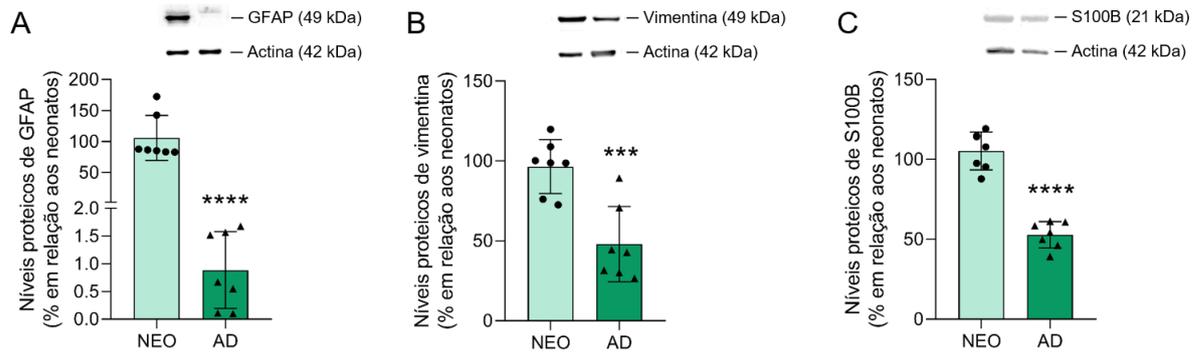


Figura 6. Avaliação de marcadores astrocitários em cultura de astrócitos cerebelares. Conteúdo proteico de GFAP (A), vimentina (B) e S100B (C), representados como a média \pm D.P. de pelo menos seis experimentos independentes. As diferenças entre os grupos foram analisadas estatisticamente usando teste t de *Student*. Foram considerados significativos valores de $P < 0,05$.

5.2.3 Avaliação de parâmetros mitocondriais, energéticos e de viabilidade celular

A fim de verificar a viabilidade das células em função da idade, realizou-se o ensaio de redução do MTT em amostras de cultura primária. Verificou-se uma redução na viabilidade celular nas culturas derivadas de animais AD em relação às derivadas de animais NEO (Figura 7A, $P < 0,0001$), bem como nos níveis extracelulares de lactato (Figura 7B, $P = 0,0221$) comparadas às culturas de animais NEO.

Outros parâmetros associados ao metabolismo energético foram avaliados, como a expressão de RNAm da enzima CS que apresentou redução (Figura 7C; $P = 0,0002$), e os níveis proteicos do transportador Glut1, que não apresentou variação entre os grupos (Figura 7D).

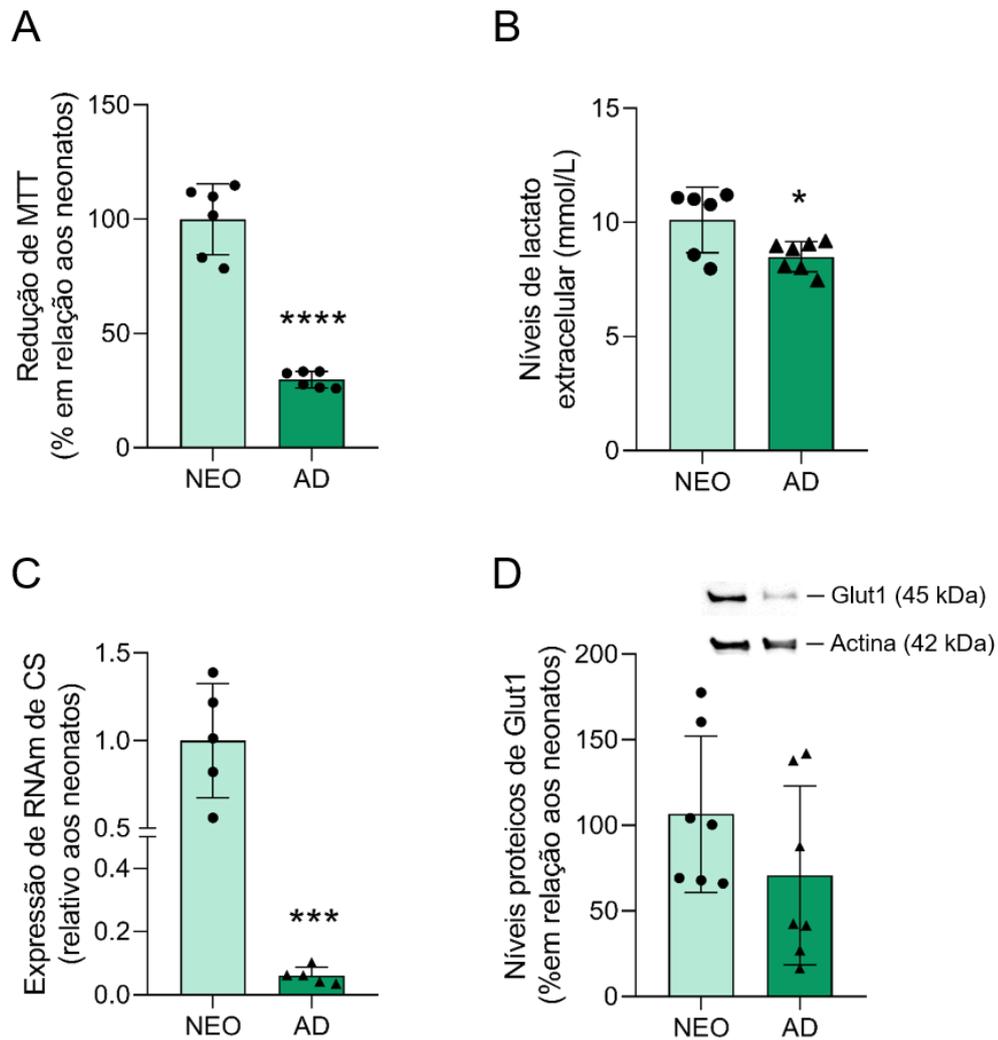


Figura 7. Avaliação de parâmetros metabólicos energéticos em cultura de astrócitos cerebelares. Redução de MTT (A), níveis extracelulares de lactato (B), expressão de RNAm de CS (C) e conteúdo proteico de Glut1 (D) foram representados como a média \pm D.P. de pelo menos cinco experimentos independentes. As diferenças entre os grupos foram analisadas estatisticamente usando teste t de *Student*. Foram considerados significativos os valores de $P < 0,05$.

5.2.4 Avaliação de parâmetros do metabolismo glutamatérgico

A figura 8 apresenta a redução no conteúdo proteico dos transportadores GLAST (Figura 8A, $P=0,0009$), GLT-1 (Figura 8B, $P=0,0027$) e EAAC1 (Figura 8C, $P < 0,0001$). Além disso, também demonstramos uma significativa redução na captação de glutamato (Figura 8D, $P < 0,0001$) ao comparar as culturas derivadas de animais AD em relação às derivadas de animais NEO. No entanto, não foi verificada modificação na atividade da enzima GS nem no conteúdo do antioxidante GSH nas figuras 8E e 8F, respectivamente.

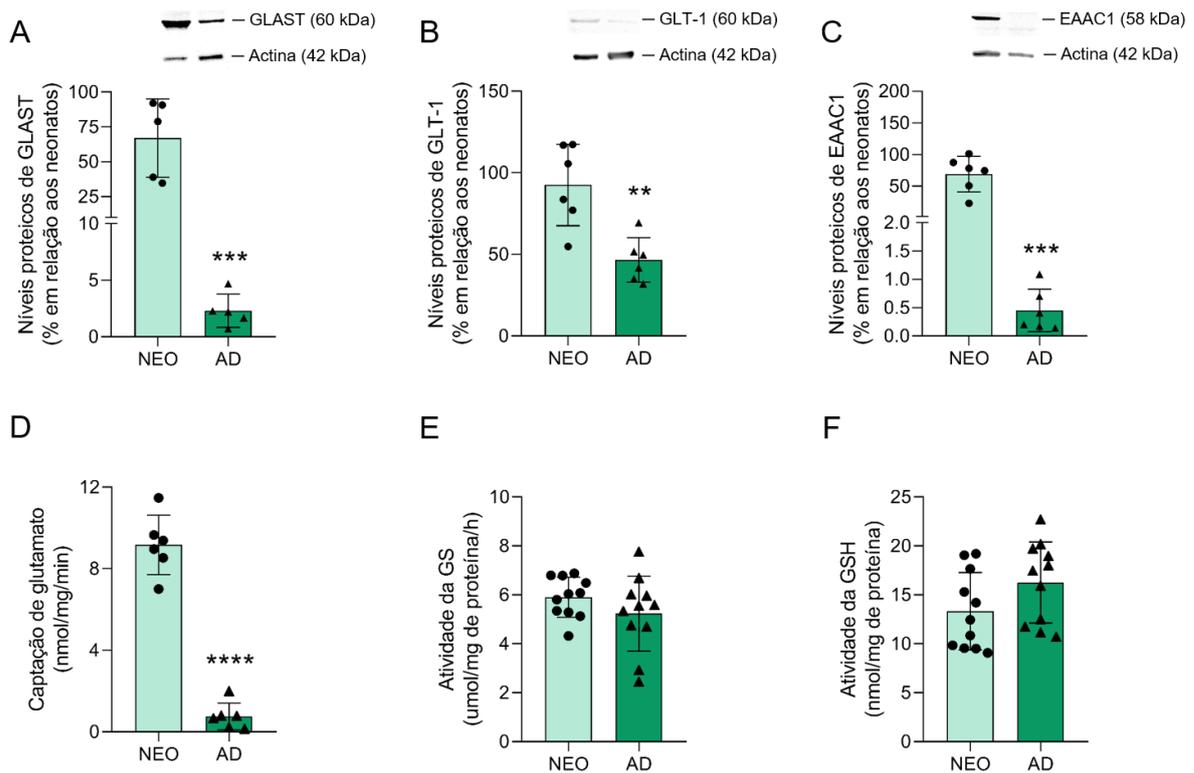


Figura 8. Avaliação de parâmetros do metabolismo glutamatérgico em cultura de astrócitos cerebelares. Conteúdo proteico de GLAST (A), GLT-1 (B) e EAAC1 (C), captação de glutamato (D), atividade da enzima GS (E) e conteúdo do antioxidante GSH (F) foram representados como a média \pm D.P. de pelo menos cinco experimentos independentes. As diferenças entre os grupos foram analisadas estatisticamente usando teste t de *Student*. Foram considerados significativos os valores de $P < 0,05$.

5.2.5 Avaliação de parâmetros inflamatórios, redox e de senescência

Na figura 9, os níveis de secreção extracelular de TNF- α aumentaram (Figura 9A, $P=0,0076$), enquanto os níveis extracelulares de IL-1 β não se modificaram (Figura 9B) nas culturas derivadas de animais AD. Também observamos uma redução na expressão de RNAm da subunidade p65 do NF κ B (Figura 9C, $P < 0,0001$), do fator de transcrição Nrf2 (Figura 9D, $P=0,0003$), da proteína HO-1 (Figura 9E, $P=0,0046$) e do marcador de senescência p21 (Figura 9F, $P=0,0034$).

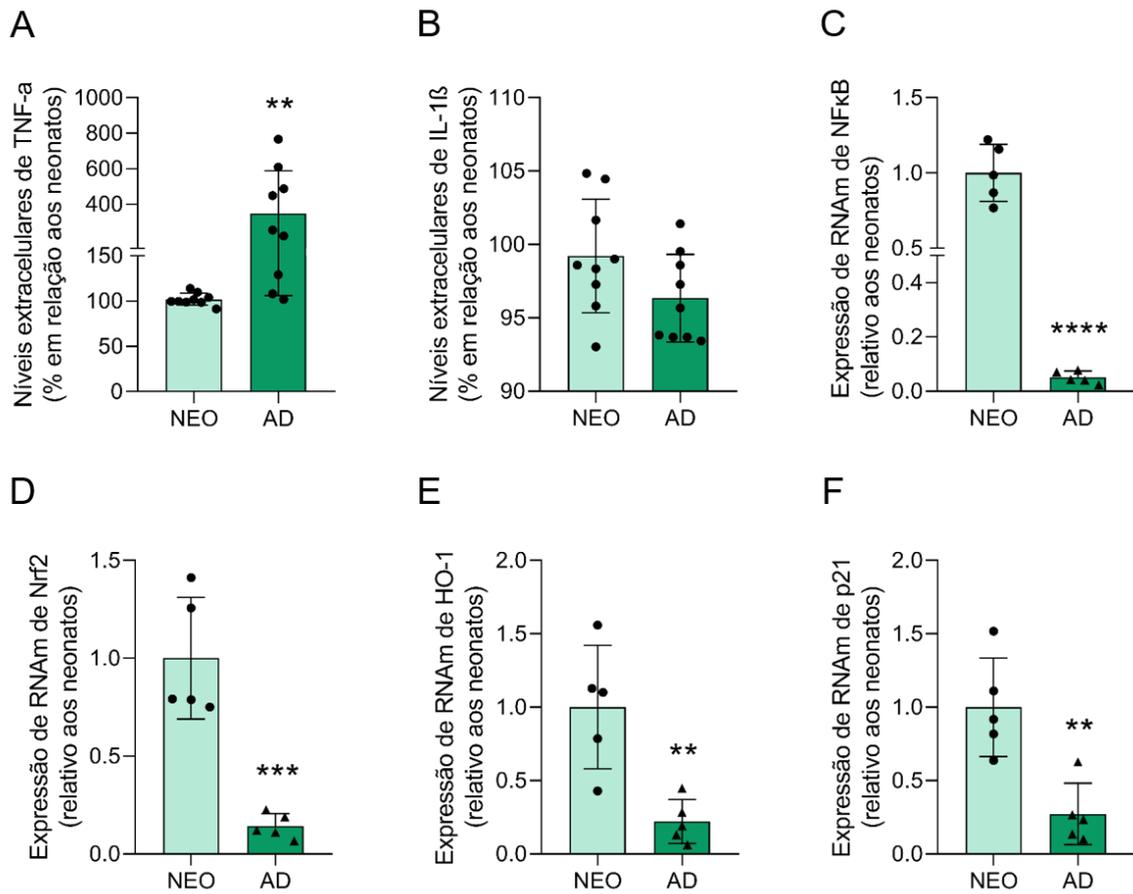


Figura 9. Avaliação de parâmetros inflamatórios, redox e de senescência em cultura de astrócitos cerebelares. Secreção extracelular de TNF- α (A) e IL-1 β (B), expressão de RNAm de NF κ B p65 (C), Nrf2 (D), HO-1 (E) e p21 (F) foram representados como a média \pm D.P. de pelo menos cinco experimentos independentes. As diferenças entre os grupos foram analisadas estatisticamente usando teste t de *Student*. Foram considerados significativos os valores de $P < 0,05$.

PARTE III

6 DISCUSSÃO

Serão inicialmente discutidos os resultados obtidos em tecido cerebelar e, posteriormente, os resultados em cultura de astrócitos cerebelares. Será feito alinhamento entre os resultados obtidos e as informações disponíveis na literatura, a fim de caracterizar e investigar respostas e mecanismos atuantes nas modificações associadas ao amadurecimento em cultura astrocitária cerebelar.

6.1 MARCADORES ASTROCITÁRIOS

Foram avaliados marcadores astrocitários clássicos: GFAP, vimentina, nestina e S100B (ZHANG *et al.*, 2019; ESCARTIN *et al.*, 2021; JURGA *et al.*, 2021). GFAP é uma proteína dos filamentos intermediários dos astrócitos, cuja expressão tende a aumentar ao longo da idade – particularmente, sua expressão costuma estar aumentada durante a reatividade astrocitária em resposta a estímulos lesivos no SNC (BRENNER & MESSING, 2021; ESCARTIN *et al.*, 2021; LAWRENCE *et al.*, 2023). A vimentina e nestina também são proteínas do citoesqueleto astrocitário, porém sua participação na diferenciação e maturação destas células faz com que sejam frequentemente encontradas em maior abundância em astrócitos jovens (ESCARTIN *et al.*, 2021; JURGA *et al.*, 2021). A proteína S100B, por sua vez, é uma proteína ligante de cálcio que é altamente expressa em astrócitos e participa da regulação de funções intracelulares que são dependentes do íon cálcio, como a fosforilação de enzimas e regulação do estado inflamatório e oxidativo (BROZZI *et al.*, 2009; BRAMANTI *et al.*, 2010). A expressão destes elementos, embora susceptível a heterogeneidade de cada região do cérebro, costuma aumentar durante o processo de envelhecimento, e pode ser positivamente regulada por elementos que costumam sinalizar reatividade astrogliar, como o NFκB e a citocina pró-inflamatória IL-1β (BRAMANTI *et al.*, 2010; BRENNER & MESSING, 2021). Por sua relevância funcional e por serem considerados marcadores “clássicos” de astrócitos, esses parâmetros foram escolhidos para serem investigados.

6.1.1 Tecido cerebelar

Conforme a figura 1, percebeu-se um aumento da expressão gênica e no conteúdo proteico de GFAP. Embora o aumento de GFAP seja frequentemente utilizado como principal marcador de reatividade astrocitária, esta interpretação não pode ser feita de forma isolada, tendo em vista que a expressão de GFAP é variável em nível tecidual e *single-cell* tanto em

situações fisiológicas quanto patológicas (LIDDLELOW & BARRES, 2017; O'LEARY *et al.*, 2020).

Ao analisar outras proteínas marcadoras dos filamentos intermediários dos astrócitos, como vimentina e nestina, a primeira não apresentou variação estatística significativa entre os neonatos e adultos na sua expressão gênica nem em seu conteúdo proteico. A nestina, porém, diminuiu sua expressão gênica nos animais AD em relação a NEO. Sua expressão pode aumentar em situações de reatividade astrocitária (PEKNY *et al.*, 1999; PALMER & OUSMAN, 2018; POTOKAR *et al.*, 2020). Já o conteúdo proteico de S100B aumentou em relação ao controle NEO. Elevados níveis de S100B podem ser encontrados em astrócitos reativos (JANIGRO *et al.*, 2022; MICHETTI *et al.*, 2023). Juntos, aumento de GFAP e S100B podem indicar maturação dos astrócitos. Isto é reforçado pela diminuição de nestina, sugerindo diminuição da presença de astrócitos não-diferenciados. Não foi verificada variação de vimentina no tecido cerebelar de animais adultos, provavelmente porque nestas faixas etárias ainda não seja observada a co-expressão das mesmas, ou devido aos animais obtidos do CREAL/UFRGS não apresentarem alterações no perfil de expressão destes genes que sejam equivalentes a uma reatividade astrocitária patológica ou generalizada.

6.1.2 Cultura de astrócitos cerebelares

A figura 5 permite observar a morfologia dos astrócitos em cultivo. Nesta figura, é possível observar a morfologia poligonal e aproximadamente fusiforme que os astrócitos adquirem em cultura primária (BELLAVAR *et al.*, 2017; SUN *et al.*, 2017). A marcação para actina apresentou marcação intensa em ambas faixas etárias, evidenciando fibras de estresse organizadas paralelamente no citoesqueleto das culturas derivadas de AD. Houve marcação de GFAP e vimentina em ambas as idades analisadas. Estes resultados podem atestar o caráter astrocitário das culturas derivadas de animais adultos.

Na figura 6, porém, foi identificada uma redução no conteúdo proteico de GFAP, vimentina e S100B nas culturas derivadas de animais AD. Este perfil não caracteriza hipertrofia celular, nem representa a reatividade astrocitária mais clássica, que é associada com aumento da expressão destes fatores (PEKNY & PEKNA, 2014; BOUVIER *et al.*, 2022; SINGH, 2022). Deve-se considerar que o conteúdo de GFAP e demais marcadores pode sofrer influência de vários fatores, incluindo as próprias condições de microambiente da cultura. Há na literatura a descrição de que a expressão de parâmetros astrocitários, sobretudo GFAP, pode ser sensível à concentração de SFB no meio de cultivo utilizado (XU, 2018). Assim, a cultura de células nem sempre é capaz de mimetizar perfeitamente as condições *in vivo* do tecido cerebelar, mas

apresenta importantes modificações em função da idade de parâmetros de astrócitos cerebelares isolados em condições *in vitro*. Além disso, os astrócitos são células heterogêneas que podem apresentar modificações específicas associadas a cada localização do SNC ao longo do amadurecimento (RODRÍGUEZ-ARELLANO *et al.*, 2016; MATIAS *et al.*, 2019; VERKERKE *et al.*, 2021). Já foram reportados na literatura que, em condições *in vitro*, pode haver um aumento inicial da expressão de GFAP, com posterior diminuição de sua expressão que atinge um platô até as células começarem a envelhecer – voltando a aumentar sua expressão em culturas derivadas de animais a partir de 2 anos de idade (RIOL & TARDY, 1992; BRAMANTI *et al.*, 2010). Sendo assim, pelos resultados obtidos, é possível inferir que os astrócitos cerebelares são sensíveis às condições do microambiente *in vitro* e são capazes de modular a expressão de seus parâmetros em função desta. Além disso, em modelos experimentais *in vitro* frequentemente se observa a co-expressão de marcadores astrocitários e a influência de um marcador sobre o outro, ou seja, como foi observado redução de GFAP, *in vitro* pode-se especular uma redução de vimentina (ELIASSON *et al.*, 1999; POTOKAR *et al.*, 2020). Adicionalmente, S100B e GFAP estão diretamente relacionadas, pois a S100B pode regular a expressão de proteínas do citoesqueleto, como por exemplo GFAP (ZIEGLER *et al.*, 1998; FRIZZO *et al.*, 2004).

6.2 PARÂMETROS DO METABOLISMO GLUTAMATÉRGICO

A participação dos astrócitos no metabolismo do neurotransmissor glutamato é intimamente associada aos transportadores GLAST e GLT-1 (ROWLEY *et al.*, 2012). Majoritariamente expressos em astrócitos, eles são os dois principais transportadores associados à remoção do excesso de glutamato da fenda sináptica, responsáveis por quase 90% deste processo (LEHRE & DANBOLT, 1998; PAJARILLO *et al.*, 2019; TODD & HARDINGHAM, 2020). A expressão do transportador EAAC1, por sua vez, ocorre majoritariamente em neurônios, embora possa ser encontrado em células gliais, particularmente sob condições *in vitro* (BJORN-YOSHIMOTO & UNDERHILL, 2016; PAJARILLO *et al.*, 2019). A manutenção da função destes transportadores é importante para a regulação da neurotransmissão e prevenção da excitotoxicidade glutamatérgica causada pelo acúmulo deste neurotransmissor na fenda sináptica, amplamente associada a neurodegeneração (CUELLAR-SANTOYO *et al.*, 2023). Por conta da relevância destes transportadores para a função do metabolismo glutamatérgico, estes parâmetros foram escolhidos para avaliar o metabolismo glutamatérgico em astrócitos do cerebelo.

6.2.1 Tecido cerebelar

Na figura 2, foi apresentado o aumento na expressão gênica e conteúdo proteico de GLAST e GLT-1. A expressão gênica de EAAC1 não demonstrou aumento, porém seu conteúdo proteico aumentou no tecido cerebelar de animais AD. O aumento da expressão e conteúdo de transportadores glutamatérgicos associados aos astrócitos é esperado, tendo em vista que estes transportadores aumentam sua expressão ao longo do amadurecimento e diferenciação. Além disso, sua expressão costuma correlacionar com astrócitos GFAP positivos, resultado verificado na figura 1 (PEREGO *et al.*, 2000). O aumento do transportador neuronal EAAC1 também é esperado, tendo em vista que trata-se do tecido cerebelar, e não cultura astrocitária. Vale lembrar, conforme comentado no item 1.1, que cerebelo é uma estrutura que possui uma baixa proporção astrócitos-neurônios (HERCULANO-HOUZEL, 2009; ROOSTAEI *et al.*, 2014). Sendo assim, a expressão de marcadores neuronais conforme amadurecimento do cerebelo é condizente com a literatura.

Existem evidências da modificação da expressão de GLAST e GLT-1 ao longo da fase pós-natal no hipocampo, sugerindo que a expressão de transportadores glutamatérgicos é altamente regulada em função da idade e do processo de envelhecimento (KUGLER & SCHLEYER, 2004). Sendo assim, em sintonia com os demais resultados obtidos, o perfil de expressão de RNAm e conteúdo proteico de transportadores glutamatérgicos parece se modificar no processo de envelhecimento. Células maduras em condições não-patológicas aumentam a expressão de transportadores a fim de aumentar sua capacidade de transporte glutamatérgico. Este aumento pode atuar como um mecanismo compensatório, de proteção e reorganização sináptica (PETERSON & BINDER, 2020; DINIZ *et al.*, 2020).

6.2.2 Cultura de astrócitos cerebelares

Conforme a figura 8, o conteúdo proteico dos transportadores GLAST, GLT-1 e EAAC1 apresentaram uma queda nas culturas cerebelares derivadas de animais AD quando comparadas às derivadas de animais NEO. A captação de glutamato também diminuiu nos animais AD. A atividade da enzima GS e o conteúdo do tripeptídeo GSH, porém, não variaram.

A diminuição na expressão de GLAST e GLT-1 pode estar correlacionada com a diminuição da expressão de GFAP (PEREGO *et al.*, 2000). A mudança de perfil também pode ser verificada pela influência das condições *in vitro* da cultura. Existem evidências de que a expressão dos transportadores glutamatérgicos, sobretudo GLAST, são sensíveis à presença de fatores solúveis presentes em meio de cultura de astrócitos hipocampais (PLACHEZ *et al.*, 2004). É possível que a cultura de astrócitos cerebelares também apresente esta sensibilidade,

impactando no conteúdo proteico de GLAST e GLT-1. Entre os fatores, vale destacar mediadores inflamatórios como TNF- α e o fator de transcrição NF κ B (ZOU & CREWS, 2005; HAROON *et al.*, 2017). A redução no conteúdo destes transportadores astrogliais implica em queda da capacidade de transporte glutamatérgico destas células. Isto foi demonstrado pela queda da captação de glutamato (SATARKER *et al.*, 2022).

Interessantemente, alguns estudos em modelos experimentais *in vivo* e *in vitro* apontam que durante o processo de envelhecimento ocorre redução na atividade e expressão dos transportadores de glutamato e isso pode impactar com quadros de acúmulo de glutamato na fenda sináptica e, conseqüentemente, aumento de dano a células neurais (TODD & HARDINGHAM, 2020; SHARAN *et al.*, 2023). No entanto, como abordado na introdução desta dissertação, sabe-se que em cerebelo há maior proporção de neurônios, quando comparados a astrócitos, logo, esse fato pode impactar na atividade glutamatérgica (HASEL *et al.*, 2017). Vale destacar que uma menor expressão proteica de transportadores de glutamato, assim como reduzida captação de glutamato podem ser suficientes para evitar qualquer dano em tecido cerebelar ou no SNC como um todo.

No entanto, sabe-se que as conseqüências da perda de função no transporte glutamatérgico podem se refletir até mesmo na produção energética e na capacidade redox dos astrócitos (JIWAJI & HARDINGHAM, 2022). Apesar disso, não houve modificação na atividade da enzima GS nem no conteúdo de GSH. É possível que modificações sejam verificadas ao longo do processo de envelhecimento, em idades mais avançadas, mas não em adultos jovens – tendo em vista que, de acordo com os resultados da expressão de marcadores astrocitários, a faixa etária dos animais AD analisada nesta dissertação não apresenta reatividade generalizada. Além disso, é possível que modificações verificadas com o amadurecimento não necessariamente sejam globais – elas podem afetar diferentemente os diferentes aspectos e vias de sinalização nos astrócitos e seus mecanismos compensatórios no cerebelo.

6.3 PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS, REDOX E DE SENESCÊNCIA

Os astrócitos são células que participam ativamente em diferentes funções cerebrais através de diferentes vias de sinalização. Neste sentido, o NF κ B configura uma destas vias, e suas funções e expressão são bastante heterogêneas no SNC (JIANG & CADENAS, 2014; CLARKE *et al.*, 2018; DRESSELHAUS & MEFFERT, 2019). Com ação pouco esclarecida no estado basal de células gliais, a expressão de NF κ B é tradicionalmente analisada sob a perspectiva de inflamação e injúria nos astrócitos (LATTKE *et al.*, 2017; DRESSELHAUS &

MEFFERT, 2019). A sinalização deste fator de transcrição é considerada pró-inflamatória e impulsadora de reatividade astrogliar (LATTKE *et al.*, 2017). Além disso, o NFκB é capaz de modular genes *downstream* em células gliais, incluindo o aumento da expressão de TNF-α, IL-1β e outros mediadores inflamatórios, modificando o estado inflamatório da célula (SHIH *et al.*, 2015; LATTKE *et al.*, 2017).

Quando há modificação do estado pró-inflamatório, a célula pode modificar a expressão de Nrf2, um fator de transcrição capaz de modular a expressão de diversos agentes citoprotetores (SAHA *et al.*, 2021). Entre estes, destacam-se a proteína HO-1 e enzimas associadas à biossíntese de GSH, importantes mecanismos de defesa antioxidante dos astrócitos (WARDYN *et al.*, 2015; BELLAVER *et al.*, 2017; UPADHAYAY *et al.*, 2021). O desequilíbrio entre esses fatores pode levar a disfunções mitocondriais, produção de espécies reativas e produção exacerbada de citocinas pró-inflamatórias, levando as células a um estado senescente (JURK *et al.*, 2012; VAZQUEZ-VILLASEÑOR *et al.*, 2019). A proteína p21 é uma proteína associada à reparação de dano no DNA (KFOURY *et al.*, 2018; VAZQUEZ-VILLASEÑOR *et al.*, 2019; KUMARI & JAT, 2021). Pode também ser utilizada como marcador de senescência, tendo em vista que sua ativação pode estar aumentada em células senescentes, comumente observadas em patologias do SNC (SALMINEN *et al.*, 2011; COHEN & TORRES, 2019; VAZQUEZ-VILLASEÑOR *et al.*, 2019). Devido à sua participação e integração em diferentes vias astrocitárias, estes parâmetros inflamatórios, redox e de senescência foram escolhidos para serem avaliados.

6.3.1 Tecido cerebelar

Na figura 3, a expressão de RNAm de TNF-α, Nrf2 e p21 aumentou nas culturas derivadas de animais AD em relação ao controle NEO. A expressão de NFκB não demonstrou variação em relação à idade.

Existem evidências de que o aumento na expressão de NFκB no cerebelo está correlacionado com o perfil celular envelhecido e senescente, comumente encontrados em animais de idades avançadas (KORHONEN *et al.*, 1997; TILSTRA *et al.*, 2011). A ausência de variação da expressão de NFκB indica estabilidade de um dos principais marcadores pró-inflamatórios no SNC. Atenta-se, porém, ao aumento da expressão de TNF-α. A elevação desta citocina pró-inflamatória é um indício de que, embora não pareça existir reatividade generalizada na faixa etária analisada, pode existir algum nível de aumento no dano celular durante o processo de envelhecimento cujo as células estão tentando combater (NAKANO-KOBAYASHI *et al.*, 2020; SAHA *et al.*, 2021). Isto é reforçado pela ativação conjunta de Nrf2

e p21, que podem indicar aumento das resposta antioxidantes, reparo no DNA e senescência (LIANG & CARLSON, 2020). Este dano, porém, provavelmente ocorre em baixa intensidade, sugerido pelo fato de que a ativação de NFκB não foi verificada na idade analisada, mas possivelmente pode apresentar modificações em idades mais avançadas (LATTKE *et al.*, 2017). Além disso, de acordo com a elevada proporção de neurônios comparada às células gliais do cerebelo, pode-se especular que, se tratando de marcadores não-específicos de astrócitos, os resultados de tecido cerebelar podem não representar especificamente o papel destas células em relação a funcionalidade cerebelar. O NFκB também apresenta heterogeneidade em seus níveis de expressão e efeitos em diferentes células, incluindo os neurônios (O'NEILL & KALTSCHMIDT, 1997; PALAZZO *et al.*, 2022) – sendo possível, portanto, que existam no cerebelo populações de células que apresentam elevação de NFκB em outras faixas etárias não analisadas neste estudo.

6.3.2 Cultura de astrócitos cerebelares

Na figura 9, verificou-se que os níveis de liberação extracelular de TNF-α aumentaram, enquanto a secreção de IL-1β não se modificou em relação ao controle NEO. Já a expressão de RNAm de NFκB, Nrf2, HO-1 e p21 diminuiu nas culturas derivadas de animais AD.

O NFκB é um fator de transcrição capaz de regular diferentes aspectos do estado inflamatório de uma célula. Seus níveis interferem na expressão de diversos genes, incluindo os do TNF-α e IL-1β (LINNERBAUER *et al.*, 2020). Nos experimentos conduzidos, a diminuição na expressão de NFκB não implicou em diminuição nos níveis de TNF-α nem IL-1β. Embora pareça contraintuitivo, é importante ressaltar que existem vias NFκB-independentes que também são capazes de exercer regulação nestes e em outros genes, como é o caso das vias de ativação de inflamassomos e/ou ativação da proteína-quinase ativada por mitógenos (MAPK) (AGGARWAL, 2003). Mais do que isso, os mediadores inflamatórios podem ser regulados de forma independente em condições *in vitro* e podem regular diferentes processos celulares (OTT *et al.*, 2007; MAYER-BARBER & YAN, 2017). O cerebelo deve sempre ser interpretado quanto a modificações únicas de perfil transcriptômico no processo de envelhecimento, onde este perfil de genes particularmente associados à inflamação e metabolismo de neurotransmissores podem ser modificados de forma específica em cada região cerebral (BOISVERT *et al.*, 2018; CLARKE *et al.*, 2018). Portanto, é possível que, no amadurecimento, as culturas de cerebelo apresentem grau de equilíbrio em alguns mediadores

inflamatórios específicos, como a não-alteração da secreção de IL-1 β , enquanto outros podem ser modificados, como o aumento da secreção de TNF- α .

A expressão de NF κ B pode ser, em parte, integrada à expressão gênica de Nrf2, HO-1 e p21, já que a elevação *upstream* de Nrf2 pode induzir a inibição de NF κ B *downstream* (BELLAYER *et al.*, 2017; GAO *et al.*, 2022; WARDYN *et al.*, 2015). Porém, em tratamentos farmacológicos contra células tumorais, é possível induzir a redução simultânea da expressão de NF κ B e Nrf2, demonstrando que as vias podem ser moduladas de forma independente (KRAJKA-KUZNIAK & BAER-DUBOWSKA, 2021). A redução na expressão de NF κ B nas culturas derivadas de animais AD é condizente com a redução de outros parâmetros por ele regulados, como GLAST, GLT-1 e p21 (KARKI *et al.*, 2014; BELLAYER *et al.*, 2017). Embora a redução de Nrf2 e HO-1 possam indicar vulnerabilidade ao dano oxidativo nas culturas derivadas de animais AD, os demais parâmetros sugerem que este dano não ocorre de forma generalizada na faixa etária analisada em ambiente *in vitro* controlado.

6.4 PARÂMETROS MITOCONDRIAIS, ENERGÉTICOS E DE VIABILIDADE CELULAR

Em relação a funcionalidade mitocondrial, pode-se destacar o papel da enzima CS, limitante do TCA, onde é responsável pela condensação de acetil-coenzima A e oxaloacetato (LARSEN *et al.*, 2012). Já o PGC-1 α é um fator de transcrição capaz de ativar a biogênese e regular a autofagia mitocondrial (HALLING & PILEGAARD, 2020).

Em termos energéticos, Glut1 é um importante transportador de membrana responsável pelo transporte de glicose, uma das principais fontes de energia das células do SNC (PRAGALLAPATI & MANYAM, 2019). Juntos, estes parâmetros oferecem informações acerca das funções mitocondriais, além do status energético da célula, que podem também refletir modificações em ensaios de avaliação da viabilidade celular, como o ensaio da redução do MTT. Por estes motivos, esses parâmetros foram escolhidos para serem analisados.

6.4.1 Tecido cerebelar

Na Figura 4, foi observado que a expressão de RNAm de PGC-1 α e CS, além do conteúdo proteico de Glut1, apresentaram aumento em relação ao amadurecimento. Ao passo que estes fatores são importantes para o desenvolvimento, crescimento e maturação de astrócitos jovens, eles também apresentam significativa relevância em astrócitos maduros, pois podem estar envolvidos na regulação do metabolismo celular, proteção e resposta anti-inflamatória durante o processo de envelhecimento (NIJLAND *et al.*, 2014). O fator PGC-1 α ,

por exemplo pode interferir na regulação *downstream* de genes associados a funções anti-inflamatórias, anti-oxidantes e sinaptogênicas (ZEHNDER *et al.*, 2021). Já a biossíntese de citrato pela CS, além de dar continuidade ao ciclo TCA, também garante o funcionamento das etapas intermediárias da síntese do glutamato e glutamina (SCHOUSBOE *et al.*, 2014; WESTERGARD *et al.*, 2017). Um aumento simultâneo da expressão gênica de PGC-1 α , bem como de uma enzima limitante do TCA e de um transportador de glicose pode indicar tanto uma elevada demanda energética e adaptação celular a um metabolismo oxidativo, revelando um provável aumento da dependência da glicose como substrato energético no tecido adulto. Esta modificação metabólica associada ao amadurecimento é verificada em diversas regiões do cérebro, e é particularmente importante no cerebelo (GONZALES-RODRIGUES & MARÍN-VALENCIA, 2023).

6.4.2 Cultura de astrócitos cerebelares

Na figura 7, verificou-se diminuição na viabilidade celular (ensaio do MTT), na expressão de RNAm da enzima CS e nos níveis extracelulares de lactato. Os níveis proteicos do transportador Glut1 não apresentaram variação nas culturas derivadas de animais AD.

Considerando o papel da CS como etapa limitante do TCA, este resultado pode indicar uma redução da atividade mitocondrial nas culturas derivadas de animais AD. A redução da viabilidade celular neste mesmo grupo, detectada pelo ensaio de MTT, corrobora esta observação.

Outro resultado importante se refere às dinâmicas de Glut1 e dos níveis extracelulares de lactato. O Glut1 é um importante componente no metabolismo da glicose e, conseqüentemente, no sistema de transporte do lactato entre astrócitos e neurônios (MASON, 2017). Quando a glicose é captada pelos astrócitos do meio extracelular, ela pode entrar na via glicolítica, formando piruvato (YAMAGATA, 2021). O piruvato, posteriormente, é convertido enzimaticamente em lactato através da glicólise anaeróbica e pode ser liberado no meio extracelular para ser recapturado e utilizado como fonte energética por neurônios (MASON, 2017; YAMAGATA, 2021). A ausência de variação do conteúdo proteico de Glut1, além da redução nos níveis extracelulares de lactato ao longo do amadurecimento, podem indicar que, apesar da aparente manutenção da capacidade de transportar glicose nas células adultas, possa existir uma perda do equilíbrio entre glicólise e fosforilação oxidativa. Esta observação é reforçada pela queda na expressão de CS e da redução de MTT, indicando que vias metabólicas associadas à função mitocondrial podem já apresentar algum nível de comprometimento através da idade. É possível que o conteúdo proteico de Glut1 permaneça inalterado nesta situação

porque existem múltiplos fatores capazes de regular seu conteúdo proteico nos astrócitos, alguns dos quais são mais ou menos sensíveis ao longo do processo de envelhecimento (BEARD *et al.*, 2021).

7 CONCLUSÕES

Em tecido cerebelar derivado de animais adultos, observou-se:

- Alteração na expressão e conteúdo proteico de GFAP, nestina e S100B, mas sem modificações em relação a vimentina;
- Aumento da expressão e conteúdo proteico de GLAST, GLT-1 e EAAC1;
- Aumento da expressão de RNAm de TNF- α , Nrf2 e p21, mas não de NF κ B;
- Aumento da expressão PGC-1 α , CS e do conteúdo proteico de Glut1.

Na cultura de astrócitos de cerebelo derivada de animais adultos, observou-se:

- Morfologia astrocitária clássica através da microscopia por contraste de fase e marcação imunofluorescente para actina, GFAP e vimentina;
- Diminuição da expressão de RNAm de GFAP, vimentina e S100B;
- Diminuição da redução de MTT, liberação extracelular de lactato e expressão de RNAm da enzima CS, mas sem modificação na expressão de Glut1;
- Diminuição do conteúdo proteico de GLAST, GLT-1 e EAAC1 e da captação de glutamato, mas sem modificação na atividade da enzima GS e o conteúdo de GSH;
- Aumento da liberação de TNF- α , mas diminuição da expressão de RNAm de NF κ B, Nrf2, HO-1 e p21 e sem modificação na secreção de IL-1 β .

Os resultados obtidos nesta dissertação permitem concluir que parâmetros avaliados em cultura de astrócitos cerebelares apresentam modificações em relação ao processo de envelhecimento, que podem representar o *onset* de disfunções mas, que por conta da idade analisada nas culturas derivadas de animais AD, ainda não tiveram cronicidade nem intensidade suficientes para provocarem uma reatividade astrocitária generalizada. Possivelmente, as culturas de astrócitos do cerebelo derivadas de animais AD são mais susceptíveis à introdução de um novo microambiente de cultura e, por conta do seu processo de crescimento e diferenciação, ficam mais vulneráveis a possíveis danos. Ainda que não mimetize integralmente as características moleculares do microambiente *in vivo* do tecido cerebelar, esta ferramenta demonstrou modificações de parâmetros astrocitários isolados *in vitro*, podendo ser utilizada para estudos da função destas células no processo de envelhecimento do cerebelo.

8 PERSPECTIVAS

Com base nos resultados obtidos nesta dissertação, é possível destacar algumas perspectivas para a caracterização de parâmetros da cultura de astrócitos do cerebelo em função do amadurecimento celular:

- Avaliar parâmetros adicionais relacionados ao metabolismo glutamatérgico, como expressão e conteúdo proteico da enzima gama glutamil cisteína sintetase (limitadora da síntese de glutatona);
- Complementar parâmetros analisados através de *western blotting* com análises de RT-PCR, e vice-versa;
- Acrescentar avaliações de mais parâmetros redox, como a produção de radicais livres através da oxidação da diclorohidrofluoresceína, expressão e conteúdo proteico de enzimas da família superóxido dismutase;
- Avaliar vias inflamatórias NF κ B-independentes através da expressão e conteúdo proteico de inflamassomas e parâmetros associados à via MAPK;
- Realização de co-culturas com neurônios cerebelares a fim de buscar maior semelhança com o microambiente observado *in vivo*.
- Estender todas as análises feitas em cultura de astrócitos do cerebelo para o tecido cerebelar;
- Avaliar o efeito do pré-tratamento de moléculas com potencial glioprotetor nas culturas de astrócitos cerebelares derivadas de animais adultos;
- Acrescentar idades correspondentes a faixas etárias intermediárias entre as analisadas nesta dissertação, bem como analisar os parâmetros em culturas derivadas de animais envelhecidos.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGGARWAL, Bharat B. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. **Nature Reviews Immunology**, [s. l.], v. 3, n. 9, p. 745–756, 2003.
- ALMEIDA, Angeles; JIMENEZ-BLASCO, Daniel; BOLAÑOS, Juan P. Cross-talk between energy and redox metabolism in astrocyte-neuron functional cooperation. **Essays in Biochemistry**, [s. l.], v. 67, n. 1, p. 17–26, 2023.
- ANDERSEN, Jens V. *et al.* Glutamate metabolism and recycling at the excitatory synapse in health and neurodegeneration. **Neuropharmacology**, [s. l.], v. 196, p. 108719, 2021.
- ANDERSEN, Jens V.; SCHOUSBOE, Arne. Milestone Review: Metabolic dynamics of glutamate and GABA mediated neurotransmission - The essential roles of astrocytes. **Journal of Neurochemistry**, [s. l.], v. 166, n. 2, p. 109–137, 2023.
- ARAUJO, Ana Paula Bergamo; CARPI-SANTOS, Raul; GOMES, Flávia Carvalho Alcantara. The Role of Astrocytes in the Development of the Cerebellum. **Cerebellum (London, England)**, [s. l.], v. 18, n. 6, p. 1017–1035, 2019.
- ARLEO, Angelo *et al.* Consensus Paper: Cerebellum and Ageing. **Cerebellum (London, England)**, [s. l.], 2023.
- BATIUK, Mykhailo Y. *et al.* Identification of region-specific astrocyte subtypes at single cell resolution. **Nature Communications**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 1220, 2020.
- BAXTER, Paul S.; HARDINGHAM, Giles E. Adaptive regulation of the brain's antioxidant defences by neurons and astrocytes. **Free Radical Biology & Medicine**, [s. l.], v. 100, p. 147–152, 2016a.
- BAXTER, Paul S.; HARDINGHAM, Giles E. Adaptive regulation of the brain's antioxidant defences by neurons and astrocytes. **Free Radical Biology and Medicine**, [s. l.], v. 100, Mitochondrial Redox Signaling in Health and Disease, p. 147–152, 2016b.
- BAYRAKTAR, Omer Ali *et al.* Astrocyte Development and Heterogeneity. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. a020362, 2015.
- BEAR, Mark F.; CONNORS, Barry W.; PARADISO, Michael A. **Neurociências: Desvendando o Sistema Nervoso**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.

- BEARD, Elidie *et al.* Astrocytes as Key Regulators of Brain Energy Metabolism: New Therapeutic Perspectives. **Frontiers in Physiology**, [s. l.], v. 12, 2022.
- BELLAVER, Bruna *et al.* Hippocampal Astrocyte Cultures from Adult and Aged Rats Reproduce Changes in Glial Functionality Observed in the Aging Brain. **Molecular Neurobiology**, [s. l.], v. 54, n. 4, p. 2969–2985, 2017.
- BELLAVER, Bruna *et al.* Systemic Inflammation as a Driver of Brain Injury: the Astrocyte as an Emerging Player. **Molecular Neurobiology**, [s. l.], v. 55, n. 3, p. 2685–2695, 2018.
- BERNARD, Jessica A; MCOWEN, Kaitlin M; HUYNH, Angelina T. New frontiers for the understanding of aging: the power and possibilities of studying the cerebellum. **Current Opinion in Behavioral Sciences**, [s. l.], v. 54, p. 101311, 2023.
- BERNARD, Jessica A.; SEIDLER, Rachael D. Moving forward: Age effects on the cerebellum underlie cognitive and motor declines. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, [s. l.], v. 42, p. 193–207, 2014.
- BJØRN-YOSHIMOTO, Walden E.; UNDERHILL, Suzanne M. The importance of the excitatory amino acid transporter 3 (EAAT3). **Neurochemistry International**, [s. l.], v. 98, Special Issue: Brain Transporters: From Genes and Genetic Disorders to Function and Drug Discovery, p. 4–18, 2016.
- BODDUM, Kim *et al.* Astrocytic GABA transporter activity modulates excitatory neurotransmission. **Nature Communications**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 13572, 2016.
- BOOTH, Lauren N.; BRUNET, Anne. The Aging Epigenome. **Molecular Cell**, [s. l.], v. 62, n. 5, p. 728–744, 2016.
- BOSTAN, Andreea C.; DUM, Richard P.; STRICK, Peter L. Cerebellar networks with the cerebral cortex and basal ganglia. **Trends in Cognitive Sciences**, [s. l.], v. 17, n. 5, p. 241–254, 2013.
- BOUVIER, David S. *et al.* The Multifaceted Neurotoxicity of Astrocytes in Ageing and Age-Related Neurodegenerative Diseases: A Translational Perspective. **Frontiers in Physiology**, [s. l.], v. 13, 2022.
- BRAMANTI, Vincenzo *et al.* Biomarkers of glial cell proliferation and differentiation in culture. **Frontiers in Bioscience-Scholar**, [s. l.], v. 2, n. 2, p. 558–570, 2010.

- BRANDEBURA, Ashley N. *et al.* Astrocyte contribution to dysfunction, risk and progression in neurodegenerative disorders. **Nature Reviews Neuroscience**, [s. l.], v. 24, n. 1, p. 23–39, 2023.
- BRENNER, Michael; MESSING, Albee. Regulation of GFAP Expression. **ASN Neuro**, [s. l.], v. 13, p. 1759091420981206, 2021.
- BROZZI, Flora *et al.* S100B Protein Regulates Astrocyte Shape and Migration via Interaction with Src Kinase *. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 284, n. 13, p. 8797–8811, 2009.
- BUCKNER, Randy L. The cerebellum and cognitive function: 25 years of insight from anatomy and neuroimaging. **Neuron**, [s. l.], v. 80, n. 3, p. 807–815, 2013.
- BUFFO, Annalisa; ROSSI, Ferdinando. Origin, lineage and function of cerebellar glia. **Progress in Neurobiology**, [s. l.], v. 109, p. 42–63, 2013.
- CANTÓ, Carles; AUWERX, Johan. PGC-1 α , SIRT1 and AMPK, an energy sensing network that controls energy expenditure. **Current Opinion in Lipidology**, [s. l.], v. 20, n. 2, p. 98, 2009.
- CHEN, Yaxing *et al.* The role of astrocytes in oxidative stress of central nervous system: A mixed blessing. **Cell Proliferation**, [s. l.], v. 53, n. 3, p. e12781, 2020.
- CLARKE, Laura E. *et al.* Normal aging induces A1-like astrocyte reactivity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 115, n. 8, p. E1896–E1905, 2018.
- CLARKE, Benjamin E. *et al.* Regionally encoded functional heterogeneity of astrocytes in health and disease: A perspective. **Glia**, [s. l.], v. 69, n. 1, p. 20–27, 2021.
- COHEN, Justin; TORRES, Claudio. Astrocyte senescence: Evidence and significance. **Aging Cell**, [s. l.], v. 18, n. 3, p. e12937, 2019.
- COTRINA, Maria Luisa; NEDERGAARD, Maiken. Astrocytes in the aging brain. **Journal of Neuroscience Research**, [s. l.], v. 67, n. 1, p. 1–10, 2002.
- CUELLAR-SANTOYO, Ares Orlando *et al.* Revealing the contribution of astrocytes to glutamatergic neuronal transmission. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, [s. l.], v. 16, 2023.

- DEGL'INNOCENTI, Elisa; DELL'ANNO, Maria Teresa. Human and mouse cortical astrocytes: a comparative view from development to morphological and functional characterization. **Frontiers in Neuroanatomy**, [s. l.], v. 17, 2023.
- DINIZ, Luan Pereira *et al.* Astrocyte glutamate transporters are increased in an early sporadic model of synucleinopathy. **Neurochemistry International**, [s. l.], v. 138, p. 104758, 2020.
- DONG, Xiao-xia; WANG, Yan; QIN, Zheng-hong. Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. **Acta Pharmacologica Sinica**, [s. l.], v. 30, n. 4, p. 379–387, 2009.
- DRESSELHAUS, Erica C.; MEFFERT, Mollie K. Cellular Specificity of NF- κ B Function in the Nervous System. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 10, 2019.
- ELIASSON, Camilla *et al.* Intermediate Filament Protein Partnership in Astrocytes *. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 274, n. 34, p. 23996–24006, 1999.
- ENDO, Fumito *et al.* Molecular basis of astrocyte diversity and morphology across the CNS in health and disease. **Science**, [s. l.], v. 378, n. 6619, p. eadc9020, 2022.
- ESCARTIN, Carole *et al.* Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions. **Nature Neuroscience**, [s. l.], v. 24, n. 3, p. 312–325, 2021.
- FERNANDEZ-FERNANDEZ, Seila; ALMEIDA, Angeles; BOLAÑOS, Juan P. Antioxidant and bioenergetic coupling between neurons and astrocytes. **Biochemical Journal**, [s. l.], v. 443, n. 1, p. 3–11, 2012.
- FERRUCCI, Luigi *et al.* Measuring biological aging in humans: A quest. **Aging Cell**, [s. l.], v. 19, n. 2, p. e13080, 2020.
- FRASER, D. D.; MUDRICK-DONNON, L. A.; MACVICAR, B. A. Astrocytic GABA receptors. **Glia**, [s. l.], v. 11, n. 2, p. 83–93, 1994.
- FRIZZO, Juliana Karl *et al.* S100B-Mediated Inhibition of the Phosphorylation of GFAP Is Prevented by TRTK-12. **Neurochemical Research**, [s. l.], v. 29, n. 4, p. 735–740, 2004.

- GALLAND, Fabiana *et al.* Astrocyte culture models: Molecular and function characterization of primary culture, immortalized astrocytes and C6 glioma cells. **Neurochemistry International**, [s. l.], v. 131, p. 104538, 2019.
- GAO, Wen *et al.* Dissecting the Crosstalk Between Nrf2 and NF- κ B Response Pathways in Drug-Induced Toxicity. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, [s. l.], v. 9, 2022.
- GASIOROWSKA, Anna *et al.* The Biology and Pathobiology of Glutamatergic, Cholinergic, and Dopaminergic Signaling in the Aging Brain. **Frontiers in Aging Neuroscience**, [s. l.], v. 13, 2021.
- GHASEMI, Mahshid *et al.* The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 22, n. 23, p. 12827, 2021.
- GIOVANNONI, Federico; QUINTANA, Francisco J. The Role of Astrocytes in CNS Inflammation. **Trends in Immunology**, [s. l.], v. 41, n. 9, p. 805–819, 2020.
- GONZALEZ-RODRIGUEZ, Manuel; MARIN-VALENCIA, Isaac. Metabolic Determinants of Cerebellar Circuit Formation and Maintenance. **The Cerebellum**, [s. l.], 2023.
- GRADISNIK, Lidija; VELNAR, Tomaz. Astrocytes in the central nervous system and their functions in health and disease: A review. **World Journal of Clinical Cases**, [s. l.], v. 11, n. 15, p. 3385–3394, 2023.
- GUDKOV, Sergey V. *et al.* An emerging role of astrocytes in aging/neuroinflammation and gut-brain axis with consequences on sleep and sleep disorders. **Ageing Research Reviews**, [s. l.], v. 83, p. 101775, 2023.
- HALLING, Jens Frey; PILEGAARD, Henriette. PGC-1 α -mediated regulation of mitochondrial function and physiological implications. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, [s. l.], v. 45, n. 9, p. 927–936, 2020.
- HAN, Rafael T. *et al.* Astrocyte-immune cell interactions in physiology and pathology. **Immunity**, [s. l.], v. 54, n. 2, p. 211–224, 2021.
- HAN, Shuo *et al.* Longitudinal analysis of regional cerebellum volumes during normal aging. **NeuroImage**, [s. l.], v. 220, p. 117062, 2020.

- HARMAN, Denham. Aging: Overview. **Annals of the New York Academy of Sciences**, [s. l.], v. 928, n. 1, p. 1–21, 2001.
- HAROON, Ebrahim; MILLER, Andrew H.; SANACORA, Gerard. Inflammation, Glutamate, and Glia: A Trio of Trouble in Mood Disorders. **Neuropsychopharmacology**, [s. l.], v. 42, n. 1, p. 193–215, 2017.
- HASEL, Philip *et al.* Neuroinflammatory astrocyte subtypes in the mouse brain. **Nature Neuroscience**, [s. l.], v. 24, n. 10, p. 1475–1487, 2021.
- HASEL, Philip *et al.* Neurons and neuronal activity control gene expression in astrocytes to regulate their development and metabolism. **Nature Communications**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 15132, 2017.
- HERCULANO-HOUZEL, Suzana. The glia/neuron ratio: How it varies uniformly across brain structures and species and what that means for brain physiology and evolution. **Glia**, [s. l.], v. 62, n. 9, p. 1377–1391, 2014.
- HERCULANO-HOUZEL, Suzana. The human brain in numbers: a linearly scaled-up primate brain. **Frontiers in Human Neuroscience**, [s. l.], v. 3, 2009.
- HOLMSETH, Silvia *et al.* The Density of EAAC1 (EAAT3) Glutamate Transporters Expressed by Neurons in the Mammalian CNS. **Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 32, n. 17, p. 6000–6013, 2012.
- ISHIBASHI, Masaru; EGAWA, Kiyoshi; FUKUDA, Atsuo. Diverse Actions of Astrocytes in GABAergic Signaling. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 20, n. 12, p. 2964, 2019.
- ISKUSNYKH, Igor Y. *et al.* Aging, Neurodegenerative Disorders, and Cerebellum. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 25, n. 2, p. 1018, 2024.
- JÄKEL, Sarah; DIMOU, Leda. Glial Cells and Their Function in the Adult Brain: A Journey through the History of Their Ablation. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, [s. l.], v. 11, 2017.
- JANECZKO, Krzysztof. Co-expression of GFAP and vimentin in astrocytes proliferating in response to injury in the mouse cerebral hemisphere. A combined autoradiographic and

double immunocytochemical study. **International Journal of Developmental Neuroscience**, [s. l.], v. 11, n. 2, p. 139–147, 1993.

JANIGRO, Damir *et al.* GFAP and S100B: What You Always Wanted to Know and Never Dared to Ask. **Frontiers in Neurology**, [s. l.], v. 13, 2022.

JAVALKAR, Vijayakumar; KHAN, Misbba; DAVIS, Debra E. Clinical Manifestations of Cerebellar Disease. **Neurologic Clinics**, [s. l.], v. 32, n. 4, Cerebellar Diseases, p. 871–879, 2014.

JIANG, Tianyi; CADENAS, Enrique. Astrocytic metabolic and inflammatory changes as a function of age. **Aging Cell**, [s. l.], v. 13, n. 6, p. 1059–1067, 2014.

JIMSHELEISHVILI, Sopiko; DIDIDZE, Marine. Neuroanatomy, Cerebellum. *In*: STATPEARLS. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023.

JIWAJI, Zoeb; HARDINGHAM, Giles E. Good, bad, and neglectful: Astrocyte changes in neurodegenerative disease. **Free Radical Biology and Medicine**, [s. l.], v. 182, p. 93–99, 2022.

JURGA, Agnieszka M. *et al.* Beyond the GFAP-Astrocyte Protein Markers in the Brain. **Biomolecules**, [s. l.], v. 11, n. 9, p. 1361, 2021.

JURK, Diana *et al.* Postmitotic neurons develop a p21-dependent senescence-like phenotype driven by a DNA damage response. **Aging Cell**, [s. l.], v. 11, n. 6, p. 996–1004, 2012.

KARKI, Pratap *et al.* Mechanism of raloxifene-induced upregulation of glutamate transporters in rat primary astrocytes. **Glia**, [s. l.], v. 62, n. 8, p. 1270–1283, 2014.

KAUPPINEN, Anu *et al.* Antagonistic crosstalk between NF- κ B and SIRT1 in the regulation of inflammation and metabolic disorders. **Cellular Signalling**, [s. l.], v. 25, n. 10, p. 1939–1948, 2013.

KAUR, Darshpreet; SHARMA, Vivek; DESHMUKH, Rahul. Activation of microglia and astrocytes: a roadway to neuroinflammation and Alzheimer's disease. **Inflammopharmacology**, [s. l.], v. 27, n. 4, p. 663–677, 2019.

KFOURY, Najla *et al.* Cooperative p16 and p21 action protects female astrocytes from transformation. **Acta Neuropathologica Communications**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 12, 2018.

- KIMELBERG, Harold K. Primary astrocyte cultures—a key to astrocyte function. **Cellular and Molecular Neurobiology**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 1–16, 1983.
- KLEIN, A. P. *et al.* Nonmotor Functions of the Cerebellum: An Introduction. **American Journal of Neuroradiology**, [s. l.], v. 37, n. 6, p. 1005–1009, 2016.
- KRAJKA-KUŹNIAK, Violetta; BAER-DUBOWSKA, Wanda. Modulation of Nrf2 and NF- κ B Signaling Pathways by Naturally Occurring Compounds in Relation to Cancer Prevention and Therapy. Are Combinations Better Than Single Compounds?. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 22, n. 15, p. 8223, 2021.
- KREFT, Marko *et al.* Aspects of Astrocyte Energy Metabolism, Amino Acid Neurotransmitter Homoeostasis and Metabolic Compartmentation. **ASN Neuro**, [s. l.], v. 4, n. 3, p. AN20120007, 2012.
- KUGLER, Peter; SCHLEYER, Verena. Developmental expression of glutamate transporters and glutamate dehydrogenase in astrocytes of the postnatal rat hippocampus. **Hippocampus**, [s. l.], v. 14, n. 8, p. 975–985, 2004.
- KUMARI, Ruchi; JAT, Parmjit. Mechanisms of Cellular Senescence: Cell Cycle Arrest and Senescence Associated Secretory Phenotype. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, [s. l.], v. 9, 2021.
- KWON, Hyuk Sung; KOH, Seong-Ho. Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: the roles of microglia and astrocytes. **Translational Neurodegeneration**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 42, 2020.
- LALO, Ulyana *et al.* The tripartite glutamatergic synapse. **Neuropharmacology**, [s. l.], v. 199, p. 108758, 2021.
- LANGE, Sofie C. *et al.* Primary Cultures of Astrocytes: Their Value in Understanding Astrocytes in Health and Disease. **Neurochemical Research**, [s. l.], v. 37, n. 11, p. 2569–2588, 2012.
- LARSEN, Steen *et al.* Biomarkers of mitochondrial content in skeletal muscle of healthy young human subjects. **The Journal of Physiology**, [s. l.], v. 590, n. Pt 14, p. 3349–3360, 2012.

- LATTKE, Michael; REICHEL, Stephanie N.; BAUMANN, Bernd. NF- κ B-mediated astrocyte dysfunction initiates neurodegeneration. **Oncotarget**, [s. l.], v. 8, n. 31, p. 50329–50330, 2017.
- LAWRENCE, Jill M. *et al.* Roles of neuropathology-associated reactive astrocytes: a systematic review. **Acta Neuropathologica Communications**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 42, 2023.
- LEE, Hong-Gyun; WHEELER, Michael A.; QUINTANA, Francisco J. Function and therapeutic value of astrocytes in neurological diseases. **Nature Reviews Drug Discovery**, [s. l.], v. 21, n. 5, p. 339–358, 2022.
- LEHRE, K. P.; DANBOLT, N. C. The number of glutamate transporter subtype molecules at glutamatergic synapses: chemical and stereological quantification in young adult rat brain. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, [s. l.], v. 18, n. 21, p. 8751–8757, 1998.
- LIANG, Katharine J.; CARLSON, Erik S. Resistance, vulnerability and resilience: A review of the cognitive cerebellum in aging and neurodegenerative diseases. **Neurobiology of Learning and Memory**, [s. l.], v. 170, Cerebellar Function, p. 106981, 2020.
- LIDDELOW, Shane A.; BARRES, Ben A. Reactive Astrocytes: Production, Function, and Therapeutic Potential. **Immunity**, [s. l.], v. 46, n. 6, p. 957–967, 2017.
- LINNERBAUER, Mathias; WHEELER, Michael A.; QUINTANA, Francisco J. Astrocyte Crosstalk in CNS Inflammation. **Neuron**, [s. l.], v. 108, n. 4, p. 608–622, 2020.
- LIU, Jianhui *et al.* Astrocytes: GABAceptive and GABAergic Cells in the Brain. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, [s. l.], v. 16, 2022.
- LIU, Zhongwu *et al.* Beneficial effects of gfap/vimentin reactive astrocytes for axonal remodeling and motor behavioral recovery in mice after stroke. **Glia**, [s. l.], v. 62, n. 12, p. 2022–2033, 2014.
- LÓPEZ-OTÍN, Carlos *et al.* The Hallmarks of Aging. **Cell**, [s. l.], v. 153, n. 6, p. 1194–1217, 2013.

- LUDWIG, Parker E.; REDDY, Vamsi; VARACALLO, Matthew. Neuroanatomy, Central Nervous System (CNS). *In: STATPEARLS*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023.
- LUFT, Andreas R. *et al.* Patterns of Age-related Shrinkage in Cerebellum and Brainstem Observed In Vivo Using Three-dimensional MRI Volumetry. **Cerebral Cortex**, [s. l.], v. 9, n. 7, p. 712–721, 1999.
- MAHMOUD, Shaimaa *et al.* Astrocytes Maintain Glutamate Homeostasis in the CNS by Controlling the Balance between Glutamate Uptake and Release. **Cells**, [s. l.], v. 8, n. 2, p. 184, 2019.
- MASON, Shayne. Lactate Shuttles in Neuroenergetics—Homeostasis, Allostasis and Beyond. **Frontiers in Neuroscience**, [s. l.], v. 11, p. 43, 2017.
- MATIAS, Isadora; MORGADO, Juliana; GOMES, Flávia Carvalho Alcantara. Astrocyte Heterogeneity: Impact to Brain Aging and Disease. **Frontiers in Aging Neuroscience**, [s. l.], v. 11, 2019.
- MAYER-BARBER, Katrin D.; YAN, Bo. Clash of the Cytokine Titans: counter-regulation of interleukin-1 and type I interferon-mediated inflammatory responses. **Cellular & Molecular Immunology**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 22–35, 2017.
- MCBEAN, Gethin J. Astrocyte Antioxidant Systems. **Antioxidants**, [s. l.], v. 7, n. 9, p. 112, 2018.
- MICHETTI, Fabrizio *et al.* The S100B Protein: A Multifaceted Pathogenic Factor More Than a Biomarker. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 24, n. 11, p. 9605, 2023.
- MITCHELL, Sarah J. *et al.* Animal Models of Aging Research: Implications for Human Aging and Age-Related Diseases. **Annual Review of Animal Biosciences**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 283–303, 2015.
- MITOMA, H. *et al.* Consensus Paper. Cerebellar Reserve: From Cerebellar Physiology to Cerebellar Disorders. **The Cerebellum**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 131–153, 2020.

- NAKANO-KOBAYASHI, A. *et al.* Therapeutics potentiating microglial p21-Nrf2 axis can rescue neurodegeneration caused by neuroinflammation. **Science Advances**, [s. l.], v. 6, n. 46, p. eabc1428, 2020.
- NIJLAND, Philip G. *et al.* Astroglial PGC-1alpha increases mitochondrial antioxidant capacity and suppresses inflammation: implications for multiple sclerosis. **Acta Neuropathologica Communications**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 170, 2014.
- OBERHEIM, Nancy Ann *et al.* Astrocytic complexity distinguishes the human brain. **Trends in Neurosciences**, [s. l.], v. 29, n. 10, p. 547–553, 2006.
- OBERHEIM, Nancy Ann; GOLDMAN, Steven A.; NEDERGAARD, Maiken. Heterogeneity of Astrocytic Form and Function. *In*: MILNER, Richard (org.). **Astrocytes: Methods and Protocols**. Totowa, NJ: Humana Press, 2012. (Methods in Molecular Biology). p. 23–45.
- O’LEARY, Liam Anuj *et al.* Characterization of Vimentin-Immunoreactive Astrocytes in the Human Brain. **Frontiers in Neuroanatomy**, [s. l.], v. 14, 2020.
- O’NEILL, L. a. J.; KALTSCHMIDT, C. NF-kB: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. **Trends in Neurosciences**, [s. l.], v. 20, n. 6, p. 252–258, 1997.
- OTT, Lee W. *et al.* Tumor Necrosis Factor- α - and Interleukin-1-Induced Cellular Responses: Coupling Proteomic and Genomic Information. **Journal of Proteome Research**, [s. l.], v. 6, n. 6, p. 2176–2185, 2007.
- PAJARILLO, Edward *et al.* The role of astrocytic glutamate transporters GLT-1 and GLAST in neurological disorders: Potential targets for neurotherapeutics. **Neuropharmacology**, [s. l.], v. 161, Neurotransmitter Transporters, p. 107559, 2019.
- PALAZZO, Isabella *et al.* NFkB-signaling promotes glial reactivity and suppresses Müller glia-mediated neuron regeneration in the mammalian retina. **Glia**, [s. l.], v. 70, n. 7, p. 1380–1401, 2022.
- PALMER, Alexandra L.; OUSMAN, Shalina S. Astrocytes and Aging. **Frontiers in Aging Neuroscience**, [s. l.], v. 10, 2018.

- PARPURA, Vladimir; VERKHRATSKY, Alexei. Astrocytes revisited: concise historic outlook on glutamate homeostasis and signaling. **Croatian Medical Journal**, [s. l.], v. 53, n. 6, p. 518–528, 2012.
- PEKNY, Milos *et al.* Abnormal Reaction to Central Nervous System Injury in Mice Lacking Glial Fibrillary Acidic Protein and Vimentin. **Journal of Cell Biology**, [s. l.], v. 145, n. 3, p. 503–514, 1999.
- PEKNY, Milos; PEKNA, Marcela. Astrocyte Reactivity and Reactive Astrogliosis: Costs and Benefits. **Physiological Reviews**, [s. l.], v. 94, n. 4, p. 1077–1098, 2014.
- PEREGO, C. *et al.* The GLT-1 and GLAST glutamate transporters are expressed on morphologically distinct astrocytes and regulated by neuronal activity in primary hippocampal cocultures. **Journal of Neurochemistry**, [s. l.], v. 75, n. 3, p. 1076–1084, 2000.
- PETERSON, Gary L. A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 83, n. 2, p. 346–356, 1977.
- PETERSON, Allison R.; BINDER, Devin K. Astrocyte Glutamate Uptake and Signaling as Novel Targets for Antiepileptogenic Therapy. **Frontiers in Neurology**, [s. l.], v. 11, 2020.
- PEUCHEN, Stefan *et al.* Interrelationships between astrocyte function, oxidative stress and antioxidant status within the central nervous system. **Progress in Neurobiology**, [s. l.], v. 52, n. 4, p. 261–281, 1997.
- PLACHEZ, Céline *et al.* Astrocytes repress the neuronal expression of GLAST and GLT glutamate transporters in cultured hippocampal neurons from embryonic rats. **Neurochemistry International**, [s. l.], v. 45, n. 7, p. 1113–1123, 2004.
- POTOKAR, Maja *et al.* The Diversity of Intermediate Filaments in Astrocytes. **Cells**, [s. l.], v. 9, n. 7, p. 1604, 2020.
- PRAGALLAPATI, Sindhuri; MANYAM, Ravikanth. Glucose transporter 1 in health and disease. **Journal of Oral and Maxillofacial Pathology**, [s. l.], v. 23, n. 3, p. 443, 2019.
- QUINCOZES-SANTOS, André *et al.* Gliotoxicity and Glioprotection: the Dual Role of Glial Cells. **Molecular Neurobiology**, [s. l.], v. 58, n. 12, p. 6577–6592, 2021.

- RAUF, Abdur *et al.* Neuroinflammatory Markers: Key Indicators in the Pathology of Neurodegenerative Diseases. **Molecules**, [s. l.], v. 27, n. 10, p. 3194, 2022.
- REEBER, Stacey; OTIS, Tom; SILLITOE, Roy. New roles for the cerebellum in health and disease. **Frontiers in Systems Neuroscience**, [s. l.], v. 7, 2013.
- RIOL, H.; FAGES, C.; TARDY, M. Transcriptional regulation of glial fibrillary acidic protein (GFAP)-mRNA expression during postnatal development of mouse brain. **Journal of Neuroscience Research**, [s. l.], v. 32, n. 1, p. 79–85, 1992.
- RIZOR, Asha *et al.* Astrocytic Oxidative/Nitrosative Stress Contributes to Parkinson's Disease Pathogenesis: The Dual Role of Reactive Astrocytes. **Antioxidants (Basel, Switzerland)**, [s. l.], v. 8, n. 8, p. 265, 2019.
- RODRÍGUEZ-ARELLANO, J. J. *et al.* Astrocytes in physiological aging and Alzheimer's disease. **Neuroscience**, [s. l.], v. 323, p. 170–182, 2016.
- ROOSTAEI, Tina *et al.* The Human Cerebellum: A Review of Physiologic Neuroanatomy. **Neurologic Clinics**, [s. l.], v. 32, n. 4, Cerebellar Diseases, p. 859–869, 2014.
- ROWLEY, Nicole M. *et al.* Glutamate and GABA synthesis, release, transport and metabolism as targets for seizure control. **Neurochemistry International**, [s. l.], v. 61, n. 4, The Glutamatergic Synapse, p. 546–558, 2012.
- RUDOLPH, Stephanie *et al.* Cognitive-Affective Functions of the Cerebellum. **Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 43, n. 45, p. 7554–7564, 2023.
- SAHA, Sarmistha *et al.* A Perspective on Nrf2 Signaling Pathway for Neuroinflammation: A Potential Therapeutic Target in Alzheimer's and Parkinson's Diseases. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, [s. l.], v. 15, 2022.
- SALMINEN, Antero *et al.* Astrocytes in the aging brain express characteristics of senescence-associated secretory phenotype. **European Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 34, n. 1, p. 3–11, 2011.
- SATARKER, Sairaj *et al.* Astrocytic Glutamatergic Transmission and Its Implications in Neurodegenerative Disorders. **Cells**, [s. l.], v. 11, n. 7, p. 1139, 2022.

- SCHILDGE, Sebastian *et al.* Isolation and culture of mouse cortical astrocytes. **Journal of Visualized Experiments: JoVE**, [s. l.], n. 71, p. 50079, 2013.
- SCHIWECK, Juliane; EICKHOLT, Britta J.; MURK, Kai. Important Shapeshifter: Mechanisms Allowing Astrocytes to Respond to the Changing Nervous System During Development, Injury and Disease. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, [s. l.], v. 12, 2018.
- SCHOUSBOE, Arne *et al.* Glutamate Metabolism in the Brain Focusing on Astrocytes. *In*: PARPURA, Vladimir; SCHOUSBOE, Arne; VERKHRATSKY, Alexei (org.). **Glutamate and ATP at the Interface of Metabolism and Signaling in the Brain**. Cham: Springer International Publishing, 2014. (Advances in Neurobiology). p. 13–30.
- SENGUPTA, Pallav. The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. **International Journal of Preventive Medicine**, [s. l.], v. 4, n. 6, p. 624–630, 2013.
- SHARAN, Shiksha; TEWARI, Bhanu Prakash; JOSHI, Preeti G. Aging-Related Changes in Expression and Function of Glutamate Transporters in Rat Spinal Cord Astrocytes. **Neuroglia**, [s. l.], v. 4, n. 4, p. 290–306, 2023.
- SHIH, Ruey-Horng; WANG, Chen-Yu; YANG, Chuen-Mao. NF-kappaB Signaling Pathways in Neurological Inflammation: A Mini Review. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, [s. l.], v. 8, 2015.
- SHU, Daisy Y.; BUTCHER, Erik R.; SAINT-GENIEZ, Magali. Suppression of PGC-1 α Drives Metabolic Dysfunction in TGF β 2-Induced EMT of Retinal Pigment Epithelial Cells. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 22, n. 9, p. 4701, 2021.
- SINGH, Rajani. Cerebellum: Its Anatomy, Functions and Diseases. *In*: NEURODEGENERATIVE DISEASES - MOLECULAR MECHANISMS AND CURRENT THERAPEUTIC APPROACHES. [S. l.]: IntechOpen, 2020.
- SOFRONIEW, Michael V. Astrocyte Reactivity: Subtypes, States, and Functions in CNS Innate Immunity. **Trends in Immunology**, [s. l.], v. 41, n. 9, p. 758–770, 2020.
- SOFRONIEW, Michael V.; VINTERS, Harry V. Astrocytes: biology and pathology. **Acta Neuropathologica**, [s. l.], v. 119, n. 1, p. 7–35, 2010.

- SOUZA, Débora Guerini *et al.* Astrocytes from adult Wistar rats aged in vitro show changes in glial functions. **Neurochemistry International**, [s. l.], v. 90, p. 93–97, 2015.
- SOUZA, Débora Guerini *et al.* Characterization of Adult Rat Astrocyte Cultures. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 8, n. 3, p. e60282, 2013.
- STOESSEL, Mark B.; MAJEWSKA, Ania K. “Little cells of the little brain: microglia in cerebellar development and function”. **Trends in neurosciences**, [s. l.], v. 44, n. 7, p. 564–578, 2021.
- STRICK, Peter L.; DUM, Richard P.; FIEZ, Julie A. Cerebellum and Nonmotor Function. **Annual Review of Neuroscience**, [s. l.], v. 32, n. 1, p. 413–434, 2009.
- SUN, Xiu *et al.* Establishment and characterization of primary astrocyte culture from adult mouse brain. **Brain Research Bulletin**, [s. l.], v. 132, p. 10–19, 2017.
- TANG, James; BAIR, Mercedes; DESCALZI, Giannina. Reactive Astrocytes: Critical Players in the Development of Chronic Pain. **Frontiers in Psychiatry**, [s. l.], v. 12, 2021.
- TILSTRA, Jeremy S. *et al.* NF- κ B in Aging and Disease. **Aging and Disease**, [s. l.], v. 2, n. 6, p. 449–465, 2011.
- TODD, Alison C.; HARDINGHAM, Giles E. The Regulation of Astrocytic Glutamate Transporters in Health and Neurodegenerative Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 21, n. 24, p. 9607, 2020.
- TORRES-CEJA, Beatriz; OLSEN, Michelle L. A closer look at astrocyte morphology: Development, heterogeneity, and plasticity at astrocyte leaflets. **Current Opinion in Neurobiology**, [s. l.], v. 74, p. 102550, 2022.
- TROEN, Bruce R. The biology of aging. **The Mount Sinai Journal of Medicine, New York**, [s. l.], v. 70, n. 1, p. 3–22, 2003.
- UPADHAYAY, Shubham *et al.* Nrf2/HO-1 Signaling Stimulation through Acetyl-11-Keto-Beta-Boswellic Acid (AKBA) Provides Neuroprotection in Ethidium Bromide-Induced Experimental Model of Multiple Sclerosis. **Genes**, [s. l.], v. 13, n. 8, p. 1324, 2022.

- VAN ESSEN, David C.; DONAHUE, Chad J.; GLASSER, Matthew F. Development and Evolution of Cerebral and Cerebellar Cortex. **Brain Behavior and Evolution**, [s. l.], v. 91, n. 3, p. 158–169, 2018.
- VARGAS, Marcelo R.; JOHNSON, Jeffrey A. The Nrf2–ARE cytoprotective pathway in astrocytes. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, [s. l.], v. 11, p. e17, 2009.
- VAZQUEZ-VILLASEÑOR, I. *et al.* 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**, [s. l.], v. 46, n. 2, p. 171–185, 2020.
- VERKERKE, Marloes; HOL, Elly M.; MIDDELDORP, Jinte. Physiological and Pathological Ageing of Astrocytes in the Human Brain. **Neurochemical Research**, [s. l.], v. 46, n. 10, p. 2662–2675, 2021.
- VERKHRATSKY, Alexei; SEMYANOV, Alexey. Astrocytes in Ageing. *In*: HARRIS, J. Robin; KOROLCHUK, Viktor I. (org.). **Biochemistry and Cell Biology of Ageing: Part IV, Clinical Science**. Cham: Springer International Publishing, 2023. (Subcellular Biochemistry). p. 253–277.
- VICENTE-GUTIÉRREZ, Carlos; JIMÉNEZ-BLASCO, Daniel; QUINTANA-CABRERA, Rubén. Intertwined ROS and Metabolic Signaling at the Neuron-Astrocyte Interface. **Neurochemical Research**, [s. l.], v. 46, n. 1, p. 23–33, 2021.
- VOOGD, Jan; GLICKSTEIN, Mitchell. The anatomy of the cerebellum. **Trends in Neurosciences**, [s. l.], v. 21, n. 9, p. 370–375, 1998.
- WARDYN, Joanna D.; PONSFORD, Amy H.; SANDERSON, Christopher M. Dissecting molecular cross-talk between Nrf2 and NF- κ B response pathways. **Biochemical Society Transactions**, [s. l.], v. 43, n. 4, p. 621–626, 2015.
- WESTERGAARD, Niels *et al.* Citrate, a Ubiquitous Key Metabolite with Regulatory Function in the CNS. **Neurochemical Research**, [s. l.], v. 42, n. 6, p. 1583–1588, 2017.
- WESTERGARD, Thomas; ROTHSTEIN, Jeffrey D. Astrocyte Diversity: Current Insights and Future Directions. **Neurochemical Research**, [s. l.], v. 45, n. 6, p. 1298–1305, 2020.

- WILSON, J. X. Antioxidant defense of the brain: a role for astrocytes. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, [*s. l.*], v. 75, n. 10–11, p. 1149–1163, 1997.
- XU, Jie. New Insights into GFAP Negative Astrocytes in Calbindin D28k Immunoreactive Astrocytes. **Brain Sciences**, [*s. l.*], v. 8, n. 8, p. 143, 2018.
- YAMAGATA, Kazuo. Lactate Supply from Astrocytes to Neurons and its Role in Ischemic Stroke-induced Neurodegeneration. **Neuroscience**, [*s. l.*], v. 481, p. 219–231, 2022.
- ZEHNDER, Tamara *et al.* Mitochondrial biogenesis in developing astrocytes regulates astrocyte maturation and synapse formation. **Cell Reports**, [*s. l.*], v. 35, n. 2, 2021.
- ZHANG, Zengli *et al.* The Appropriate Marker for Astrocytes: Comparing the Distribution and Expression of Three Astrocytic Markers in Different Mouse Cerebral Regions. **BioMed Research International**, [*s. l.*], v. 2019, p. 9605265, 2019.
- ZHOU, Y.; DANBOLT, N. C. Glutamate as a neurotransmitter in the healthy brain. **Journal of Neural Transmission**, [*s. l.*], v. 121, n. 8, p. 799–817, 2014.
- ZHOU, Bin; ZUO, Yun-Xia; JIANG, Ruo-Tian. Astrocyte morphology: Diversity, plasticity, and role in neurological diseases. **CNS Neuroscience & Therapeutics**, [*s. l.*], v. 25, n. 6, p. 665–673, 2019.
- ZHU, Ganggui *et al.* Crosstalk Between the Oxidative Stress and Glia Cells After Stroke: From Mechanism to Therapies. **Frontiers in Immunology**, [*s. l.*], v. 13, 2022.
- ZIEGLER, Denize R. *et al.* The S100B Protein Inhibits Phosphorylation of GFAP and Vimentin in a Cytoskeletal Fraction from Immature Rat Hippocampus. **Neurochemical Research**, [*s. l.*], v. 23, n. 10, p. 1259–1263, 1998.
- ZOU, Jian Y.; CREWS, Fulton T. TNF alpha potentiates glutamate neurotoxicity by inhibiting glutamate uptake in organotypic brain slice cultures: neuroprotection by NF kappa B inhibition. **Brain Research**, [*s. l.*], v. 1034, n. 1–2, p. 11–24, 2005.