ÉRICA DE ALMEIDA DUQUE

**EFEITOS DOS GLICOCORTICOIDES NAS INTERAÇÕES CELULARES
DE ASTRÓCITOS, MICROGLIA E NEURÔNIOS DURANTE
INFLAMAÇÃO INDUZIDA POR LPS EM MODELO IN VITRO.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de doutor em Ciências

SÃO PAULO
2018

ÉRICA DE ALMEIDA DUQUE

**EFEITOS DOS GLICOCORTICOIDES NAS INTERAÇÕES CELULARES DE
ASTRÓCITOS, MICROGLIA E NEURÔNIOS DURANTE INFLAMAÇÃO INDUZIDA
POR LPS EM MODELO IN VITRO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de doutor em Ciências

Área de Concentração: Farmacologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Carolina Demarchi
Munhoz

Versão Original

SÃO PAULO
2018

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Duque, Érica de Almeida

Efeitos dos Glicocorticoides nas interações
celulares de Astrócitos, Microglia e Neurônios
durante Inflamação induzida por LPS em Modelo In
Vitro / Érica de Almeida Duque; orientadora Carolina
Demarchi Munhoz. -- São Paulo, 2018.

143 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Glicocorticoides. 2. Córtex cerebral. 3. NFkB.
4. Astrócitos. 5. Microglia. I. Munhoz, Carolina
Demarchi, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Érica de Almeida Duque

Titulo da Tese: EFEITOS DOS GLICOCORTICOIDES NAS INTERAÇÕES CELULARES DE ASTRÓCITOS, MICROGLIA E NEURÔNIOS DURANTE INFLAMAÇÃO INDUZIDA POR LPS EM MODELO IN VITRO

Orientador: Profa. Dra. Carolina Demarchi Munhoz

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão publica realizada a _____/_____/_____, considerou o(a) candidato(a):

() **Aprovado(a)** () **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Presidente: Assinatura:

Nome:

Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **86** nas fls. **08** do livro **03** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Carolina Demarchi Munhoz** Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Efeitos dos glicocorticoides nas interações celulares entre astrócitos, microglia e neurônios durante inflamação induzida por LPS em modelo in vitro*" do qual participam o(s) aluno(s) **Erica de Almeida Duque, Dielly Catrina Favacho Lopes, Leonardo Novaes Santana, Nilton Barreto dos Santos**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **01.07.2013, com validade de 4 anos**.

São Paulo, 03 de julho de 2013.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador-CEUA - ICB/USP

Prof. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP

Aos meus pais, esposo, irmão,
avós e familiares,
por me apoiarem em minhas decisões,
e por me ajudarem a continuar sempre caminhando...

AGRADECIMENTOS

Ao meu esposo e amigo, Luís Felipe Olivier de Macedo, pelo suporte, apoio, carinho, paciência e compreensão pela minha ausência física e mental.

À minha mãe, Vera Lúcia de Almeida Neves, pelo apoio incondicional que com carinho e dedicação sempre me ajudou em todos os aspectos da vida e sempre me incentivou a trilhar o melhor caminho para o meu futuro.

Ao meu pai, Tarcísio Antônio de Rezende Duque, pelo apoio e incentivo, me ajudou a chegar até aqui, olhando sempre para ambos os lados da moeda.

Ao meu irmão Rafael de Almeida Duque e à minha cunhada, Fabiane Weber Duque, pelo companheirismo e apoio, mesmo estando longe.

Ao meu sobrinho Guilherme Weber Duque, que quando crescer, irá usufruir da ciência que realizamos hoje.

A toda a minha família, meus avós, tios e primos pelo apoio e carinho.

À minha orientadora, Carolina Demarchi Munhoz, modelo de orientadora, a quem admiro, pela compreensão, apoio, colaboração, presença e pelos incontáveis ensinamentos científicos e não científicos. Muito obrigada.

Aos meus amigos do laboratório de Neuroendocrinofarmacologia e Imunomodulação Leonardo, Nilton, Marília, Juliano, Guilherme, Letícia, Sabrina, Arthur, Kairo e Regiane, pelas inúmeras reuniões científicas e ajuda dada nos experimentos.

Aos amigos e antigos alunos do laboratório Jennifer e Dielly pela amizade e ajuda dada nos experimentos.

À técnica Guiomar Wiesel, pelo apoio e suporte técnico sempre disponível.

À colaboradora e amiga Joelcimar, pelo apoio técnico nos experimentos com imagens.

Às minhas amigas de faculdade Michele, Carol, Juliana, Lívia, Priscila e Cristina, pelos incentivos e por manterem sempre contato.

Ao professor Cristóforo Scavone e todos os colegas do laboratório de Farmacologia Molecular pelo apoio e pelo suporte técnico.

Ao Centro de Facilidades de Apoio à Pesquisa – Universidade de São Paulo (CEFAP-USP/FLUIR) pelas contribuições nas etapas de imagens (In Cell Analyzer 2200).

À CNPq (nº142300/2013-6), FAPESP e CAPES, pelo apoio financeiro concedido ao projeto e ao laboratório.

RESUMO

Duque EA. Efeitos dos Glicocorticoides nas interações celulares de Astrócitos, Microglia e Neurônios durante Inflamação induzida por LPS em Modelo In Vitro [Tese (Doutorado em Farmacologia)] – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2018.

O bom funcionamento da tríade neurônio-microglia-astrócito é fundamental para a manutenção das funções no sistema nervoso central (SNC), uma vez que processos neurodegenerativos e de envelhecimento podem estar relacionados a uma interação celular “defeituosa” entre os neurônios e as células da glia. A ativação e o recrutamento das células da glia são processos complexos e exigem uma intercomunicação bem organizada dos neurônios e as células da glia, bem como das células da glia. Apesar do bem estabelecido efeito anti-inflamatório dos glicocorticoides (GCs), tem sido demonstrado que, no SNC, níveis aumentados desse hormônio podem potencializar alguns aspectos da resposta inflamatória, por exemplo, a ativação do fator de transcrição NFkB induzida por lipopolissacarídeo (LPS) e são cada vez maiores as evidências que apontam para a especificidade celular dessas ações. Este estudo tem como objetivo caracterizar os efeitos dos GCs nas interações celulares físicas e humorais entre astrócitos, microglia e neurônios na presença de um estímulo inflamatório agudo, o LPS, em modelos in vitro de culturas primárias derivadas do córtex cerebral de ratos neonatos. Verificamos que os GCs não são anti-inflamatórios, pois não diminuem a ativação do NFkB, e ainda potencializam a morte celular induzida pelo LPS em culturas mistas. Em astrócitos, nossos resultados sugerem que os GCs são pró-inflamatórios e essa ação parece depender das interações celulares e da presença de heterodímeros de GR/MR. A microglia participa da resposta dos astrócitos ao LPS em relação à localização nuclear do RELA.

Palavras-chave: Glicocorticoides. Córtex cerebral. NFkB. Astrócitos. Microglia

ABSTRACT

Duque EA. Glucocorticoids effects on LPS-induced inflammation in rat primary frontal cortex cultures. Ph. D thesis [(Pharmacology Department)] – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2018.

The proper functioning of the neuron-microglia-astrocyte triad is fundamental for the maintenance of central nervous system (CNS), since neurodegenerative and aging processes may be related to a "defective" cellular interaction between neurons and glia. Activation and recruitment of glial cells are complex processes and require well-organized intercommunication between neurons and glial cells as well as between glial cells. Despite the well-established anti-inflammatory effect of glucocorticoids (GCs), it has been shown that, in the CNS, increased levels of this hormone may potentiate some aspects of the inflammatory response, for example the activation of the lipopolysaccharide-induced NFκB transcription factor and the evidence pointing to the cellular specificity of these actions is increasing. This study aims to characterize the effects of GCs on physical and humoral cellular interactions between astrocytes, microglia, and neurons in the presence of an acute inflammatory stimulus, LPS, in in vitro primary cell cultures derived from the brain cortex of neonatal rats. We verified that GCs are not anti-inflammatory since they do not decrease the activation of NFκB and yet potentiate the LPS-induced cell death in mixed cultures. Astrocytes in mixed, neuron- and astrocyte-enriched cultures have different responses to LPS, as well as previous treatment with GCs, regarding the nuclear localization of RELA, an indication of its activation. Our results in this cell type suggest that GCs are proinflammatory and this action seems to depend on cell interactions and the presence of GR / MR heterodimers. Microglia participates in the response of astrocytes to LPS in relation to the nuclear localization of RELA.

Keywords: Glucocorticoids. neuroinflammation. Cerebral Cortex. NFκB. Astrocytes. Microglia

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μ. – micro

Aβ – proteína β-amiloide

AIC - critério de informação de Akaike

ANOVA - Análise de Variância

AO – Laranja de Acridina (acridine orange)

AP -1 - Proteína ativadora 1

Ara-C – Citosina Arabinosídeo

ATP - Trifosfato de Adenosina

BDNF – Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (Brain-derived neurotrophic fator)

BSA – Soro albumina bovina (bovine serum albumin)

BHE – Barreira hemato-encefálica

Ca²⁺- Cálcio

Casp1 - Enzima caspase 1

CBP – Proteína ligante do CREB (*CREB binding protein*)

CCL2 – quimiocina ligante 2 de C-C

CD68 – Cluster de diferenciação 68

CD200 – Cluster de diferenciação 200 ou glicoproteína de membrana OX-2

CD200R – Receptor do Cluster de diferenciação 200 ou receptor de OX-2

cDNA - DNA complementar

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

CO₂ - Dióxido de Carbono

CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

CONT - Controle

CORT - Corticosterona

COX-2 - Ciclooxygenase -2

Cpm - Contagem por milhão

CREB - proteína de ligação dos elementos de resposta do AMPc (cAMP response element –binding protein)

CSF1 – Fator estimulador de colônia 1 (colony stimulating factor 1)

CX3CL1 - quimiocina ligante 1 da CX3C

CX3CR1 – Receptor de quimiocina ligante CX3C 1

CX43 – conexina 43

Ct - *threshold cycle*

CYP40 – Ciclofilina 40 (Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase CYP40)

DAPI - 4',6 -diamidino-2-phenylindole

DAMP – padrão molecular associado a perigo (*danger-associated molecular patterns*)

DBD - Domínio de ligação ao DNA (*Dna binding domain*)

DEPC - Diethyl pyrocarbonate ou diethyl dicarbonate

DIV - Dia *in vitro*

DMEM - Meio de Eagle modificado por Dulbecco (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*)

DNA - Ácido desoxirribonucleico

dNTP

ds – dupla fita (double-stranded)

DTT – Ditioneitol

EAE – Encefalomielite autoimune experimental

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

EMSA - Ensaio do Retardamento da Mobilidade Eletroforética em Gel de Poliacrilamida

ERK ½ - quinase regulada por sinais extracelulares (*Extracellular signal-regulated kinase*)

EtOH – Etanol

FKBP4 – Proteína 4 ligante de FK506 (Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP4)

FKBP5 – Proteína 5 ligante de FK506 (Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP5)

Fold change - número de vezes de aumento ou diminuição de expressão

g – aceleração da gravidade (unidade)

GAPDH - gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)

GAP – Junções comunicantes

GC - Glicocorticóides

GFAP - proteína glial fibrilar ácida (*Glial fibrillary acidic protein*)

GILZ – zíper de leucine induzido por GCs (Glucocorticoid-induced leucine zipper)

GJC - Junções do tipo GAP

GR - Receptor de Glicocorticóide, α β

GRE – Elemento responsivo ao glicocorticoide (glucocorticoid response element)

GzLM - Modelo linear generalizado (Generalized Linear Model)

h – Hora

HAMP - processos moleculares que alteram a homeostase (homeostasis-altering molecular process)

HEPES - ácido 4-(2-hidroxietil) piperazin-1-iletanosulfônico (*4-(2-Hydroxyethyl) piperazine-1-ethanesulfonic acid*)

HO-1 - Hemeoxigenase

HMGB1 – alarmina High Mobility Group Box 1

HPA - Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal

Hsd11b1 – enzima 11 β -hidroxiesteroide desidrogenase tipo 1 (11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase type 1)

HSP70 – heat shock protein 70

HSP90 - heat shock protein 90

HSP40 - heat shock protein 40

I κ B - proteína inibidora do fator (*inhibitor of kappa B*)

IBA 1- Molécula adaptadora da ligação de cálcio ionizado 1 (*ionized calcium-binding adapter molecule 1*)

ICB – Instituto de Ciências Biomédicas

Inf- γ – interferon gama

IGF1 – Fator de Crescimento do Tipo Insulina 1 (Insulin-like growth factor 1)

IKK - *Nuclear factor NF-kappa-B inhibitor kinase*

IL-10 – Interleucina 10

IL-18 - Interleucina 18

IL-1 β - Interleucina 1 β

IL-4 – Interleucina 4

IL-6 - Interleucina 6

IL-34 –Interleucina 34

iNOS - Óxido Nítrico Sintase Induzida

JNK - quinase c-Jun N-terminal (*c-Jun NH2-terminal kinase*)

K⁺ - Íon potássio

KCl - Cloreto de Potássio

KH₂PO₄ - Fosfato de Potássio mono-básico

L - litro

LBD - Dominio de ligação do ligante (*Ligand Binding Domain*)

LDH – lactato desidrogenase

LPS - lipopolissacarídeo

M - Molar

MAP2 - proteína associada a microtúbulo-2 (*microtubule-associated protein 2*)

MAPK - Proteína kinase ativada por mitógenos (*Mitogen-activated protein kinases*)

MCP-1 – proteína quimiotática de monócitos 1 Monocyte chemoattractant protein 1

MgCl₂ - Cloreto de Magnésio

MilliQ - Água deionizada

MINO - Minociclina

ml - mililitro

MR - Receptor de Mineralocorticoides

MyD88 - Gene de resposta primária de diferenciação mielóide 88 (*Myeloid differentiation primary response gene 88*)

Na⁺- Sódio

Na₂HPO₄ - Fosfato de Sódio Dibásico

NaCl - Cloreto de Sódio

NaHCO₃ - Bicarbonato de Sódio

NAD- nicotinamida adenina dinucleotídeo (Nicotinamide adenine dinucleotide)

NEMO - Modulador essencial do NFκB (*NFκB essential modulator*)

NFκB - Fator de Transcrição Nuclear Kappa B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)

NFκB1α - nuclear factor-klight polypeptide gene enhancer in B-cell inhibitor-α

NK – células natural killer ou células exterminadoras naturais

NLRs - Receptores do tipo Nod

NLRP3 - NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3

NO - Óxido Nítrico

NOS - Óxido Nítrico Sintase

NP-40 - *Tergitol-type NP-40* ou *nonyl phenoxypolyethoxylethanol*

NTD - Domínio de Ligação ao N-Terminal (*N-Terminal Binding Domain*)

Nr3c1- receptor de glicocorticoides (Nuclear receptor subfamily 3 group C member 1)

MHCII - complexo principal de histocompatibilidade classe 2 (MHC class II transactivator)

P - - Pós-natal

P1 - Pós-natal dia 1

p23 – Prostaglandin E synthase 3

p38 - P38 mitogen-activated protein kinases

P4 - Pós-natal dia 4

p65 - Subunidade RELA do Fator de Transcrição NFκB

P/E – penicilina/estreptomicina

PAMPs - padrões moleculares associados a patógenos (pathogen-associated molecular patterns)

PBS - Solução Balanceada ou Tampão Salina (*Phosphate Buffered Saline*)

PCR – reação em cadeia da polimerase (Polimerase chain reaction)

PET - imagens de tomografia computadorizada

PI – Iodeto de propídeo (Propidium iodide)

PMSF - phenylmethanesulfonylfluoride or phenylmethylsulfonyl fluoride- (Fenil-Metil-Sulfonil-Fluoruro)

Pnx 1 – panexina 1

Poly-dIdC - sal sódico do ácido poli (deoxiinosinico-deoxicitidilico) Poly(deoxyinosinic-deoxycytidylic) acid sodium salt

PTEN - Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase and dual-specificity protein phosphatase

PRRs - receptor de reconhecimento de padrões (*Pathern-recognition receptors*)

PVDF - Fluoreto de polivinilideno (poly-1,1-difluoroethene)

RAGE - Receptor for Advanced Glycation Endproducts

RELA – subunidade p65 do NFKB

RNA - ácido ribonucleico

RPM - Rotações por minuto

RT – transcriptase reversa

RU38486 ou RU486 ou RU - Mifeprestona ou *11 β -(4-Dimethylamino)phenyl-17 β -hydroxy-17-(1-propynyl)estra-4,9-dien-3-one*

SAPK - Proteína quinase ativada pelo estresse (*Stress-activated protein kinase*)

SBF - Soro Fetal Bovino

SC - Soro de cavalo

SDS - Dodecil sulfato de sódio (sodium dodecyl sulfate)

SDS-PAGE - sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis

SIRP α – Signal-regulatory protein alpha

SNC - Sistema Nervoso Central

SRC-1 – Coativador de receptor esteroide 1 (steroid receptor coactivator-1)

ss – simples fita (single-stranded)

TBE - Tampão Tris/Borato/EDTA

TBS – Tampão tris/salina (Tris-Buffered Saline)

TBS-T – Tampão tris/salina/tween (Tris-Buffered Saline tween)

TGF β 1 – Fator de Transformação do Crescimento beta (Transforming Growth fator beta 1)

TLR2 - Receptor do tipo Toll 2

TLR3 – Receptor do tipo Toll 3

TLR4 - Receptor do tipo Toll 4

TLRs - Receptores do Tipo Toll

TMT – trimetilestanho

TNF- α - Fator de Necrose tumoral α

Tris-HCl - (hidroximetil) aminometano-Cloridrato (*TRIS hydrochloride* ou *Tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride*)

TRITON X-100 - 4-(1,1,3,3-tetrametilbutil-feniletilenoglicol Tetramethylbutyl)phenyl-polyethylene glyco

USP - Universidade de São Paulo

V – volt

VEGF – Fator de crescimento vascular endotelial (Vascular endothelial growth fator)

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.1. Fases da resposta inflamatória após lesão aguda do SNC	20
Figura 1.2. Inflamação no SNC: envolvimento de vários tipos celulares	22
Figura 1.3. Vias de sinalização do LPS-TLR4 e NLRP3.....	23
Figura 1.4 - Interações entre Astrócitos, Neurônios e Microglia	29
Figura 1.5. Inibição das vias pró-inflamatórias pelos GCs.....	32
Figura 1.6. GCs podem mediar mecanismos pró-inflamatórios	36
Figura 3.1. Esquema experimental da realização da cultura primária mista de neurônios/ células da glia.....	39
Figura 3.2. Esquema experimental da realização da cultura enriquecida de astrócitos.	40
Figura 3.3. Esquema experimental de tratamento das culturas primárias com corticosterona seguido de LPS.....	41
Figura 3.4. Esquema experimental de tratamento das culturas primárias mista com adição de antagonistas de glicocorticoides.	41
Figura 3.5. Esquema experimental de tratamento das culturas primárias mista de neurônios/células da glia com adição de minociclina.	42
Figura 3.6. Esquema representativo do padrão de contagem dos núcleos celulares	44
Tabela 3.1. Configurações da corrida de PCR em tempo real.....	51
Tabela 3.2. Sequência de <i>primers</i> utilizada.....	52
Figura 4.1 Composição celular de culturas primárias mistas derivadas do córtex frontal de ratos Wistar neonatos.	54
Figura 4.2. Fotomicrografias ilustrando a composição celular da cultura primária mista derivada do córtex frontal de ratos Wistar neonatos	55
Figura 4.3. Composição celular de cultura primária enriquecida de astrócitos derivada do córtex frontal de ratos Wistar neonatos.	56
Figura 4.4. Presença dos receptores GR e MR em astrócitos de cultura primária mista derivada do córtex frontal de ratos Wistar neonatos	57
Figura 4.5. Presença do receptor TLR4 em astrócitos de cultura primária mista derivada do córtex frontal de ratos Wistar neonatos	58
Figura 4.6. Presença do receptor NLRP3 em astrócitos de cultura primária mista derivada do córtex frontal de ratos Wistar neonatos	59
Figura 4.7. Presença da proteína Connexina 43 em astrócitos de cultura primária mista derivada do córtex frontal de ratos Wistar neonatos	59
Figura 4.8. Efeitos da exposição prolongada à corticosterona na viabilidade celular em culturas primárias do córtex frontal	60
Figura 4.9. Efeitos da exposição prolongada ao RU486, na Ausência ou Presença de Corticosterona, na viabilidade celular em culturas primárias do córtex frontal...	61
Figura 4.10. Efeitos da exposição prolongada à CORT na secreção de Pro-IL-1 β , Casp1 e Tgf β 1 em cultura primária Mista de Neurônios/Células da Glia	62
Figura 4.11. Efeitos da exposição prévia à corticosterona seguido do tratamento com LPS na viabilidade celular das culturas primárias do córtex frontal	63

Figura 4.12. Tipos de morte celular decorrentes da exposição prévia à CORT seguido do tratamento com LPS nas culturas primárias derivadas do córtex frontal.....	65
Figura 4.13. Tipos de morte celular decorrentes da exposição prévia à CORT seguida pelo tratamento com LPS nas culturas primárias derivadas do córtex frontal	66
Figura 4.14. Efeitos da exposição prévia ao RU486, na presença ou ausência de corticosterona seguido do tratamento com LPS na viabilidade celular das culturas primárias do córtex frontal	68
Figura 4.15. Tipos de morte celular decorrentes da exposição prévia ao RU486, na presença ou ausência de CORT, seguido do tratamento com LPS nas culturas primárias derivadas do córtex frontal	70
Figura 4.16. Tipos de morte celular decorrentes da exposição prévia ao RU486, na presença ou ausência de CORT, seguido do tratamento com LPS nas culturas primárias derivadas do córtex frontal	71
Figura 4.17. Efeitos da exposição prévia à Corticosterona seguido pelo tratamento com LPS na ativação do fator de transcrição NFkB em culturas primárias mistas de neurônios/células da glia	72
Figura 4.18. Efeitos da exposição prévia à Corticosterona seguido pelo tratamento com LPS na translocação nuclear do NFkB em culturas primárias mistas de neurônios/células da glia	73
Figura 4.19. Efeitos da exposição prévia ao RU486, na ausência ou presença de Corticosterona, seguido pelo tratamento com LPS na ativação do fator de transcrição NFkB em culturas primárias mistas de neurônios/células da glia.....	74
Figura 4.20. Efeitos da exposição prévia à Corticosterona na Localização Nuclear do Fator de Transcrição NFkB Induzida por LPS em Astrócitos de culturas primárias derivadas do córtex frontal	76
Figura 4.21. Efeitos da exposição prévia ao RU486, na Presença ou Ausência de CORT na Localização Nuclear do Fator de Transcrição NFkB Induzida por LPS em Astrócitos de culturas primárias derivadas do córtex frontal	78
Figura 4.22. Efeitos da exposição prévia a Minociclina, na Presença ou Ausência de CORT na Localização Nuclear do Fator de Transcrição NFkB Induzida por LPS em Astrócitos de culturas primárias derivadas do córtex frontal	79
Figura 4.23. Efeitos da exposição à CORT na Secreção de Pro-IL-1 β , Casp1 e Tgf β 1 induzidas pelo tratamento com LPS em Cultura Primária Mista de Neurônios/Células da Glia	81
Figura 4.24. Expressão gênica de fatores Pro- e Anti-inflamatórios em culturas primárias Mistas de Neurônios/ Células da Glia e Enriquecida de Astrócitos	84
Figura 4.25. Presença de RELA ligada ao complexo GR em culturas primárias derivadas do córtex frontal de ratos Wistar neonatos	85
Figura 4.26. Presença de MR ligada ao complexo GR em culturas primárias derivadas do córtex frontal de ratos Wistar neonatos	86

Figura 4.27. Presença dos receptores de glicocorticoides no ensaio de imunoprecipitação em culturas primárias derivadas do córtex frontal de ratos Wistar neonatos	86
Figura 4.28. Expressão dos genes <i>Gilz</i> e <i>Fkbp5</i> em culturas primárias Mistas de Neurônios/ Células da Glia e Enriquecida de Astrócitos	88
Figura 4.29. Efeitos da exposição à CORT seguida de LPS na proteína Conexina 43 em culturas primárias mista de neurônios/células da Glia e enriquecida de astrócitos	89
Figura 4.30. Efeitos da exposição à CORT seguida de LPS na proteína HMGB1 em culturas primárias mista de neurônios/células da Glia e enriquecida de astrócitos	90
Figura 4.31. Efeitos da exposição à CORT seguida de LPS os fatores “ON/OFF” em culturas primárias mista de neurônios/células da Glia e enriquecida de astrócitos	91
Figura 5.1. Astrócitos: centrais regulatórias	116

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 Inflamação	20
1.2 Interações Celulares e Inflamação	23
1.2.1 Microglia	24
1.2.2 Astrócitos	26
1.3 Glicocorticoides, Inflamação e Interações Celulares	29
2 OBJETIVOS	36
3 MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1 Animais	37
3.2 Culturas Primárias	37
3.2.1 Cultura Mista de Neurônios/Células da Glia e Enriquecida de Neurônios	38
3.2.2 Cultura Enriquecida de Astrócitos	39
3.3 Tratamento das células em cultura	40
3.3.1 Tratamento com Corticosterona seguido por LPS	40
3.3.2 Tratamento com RU486 (mifepristona)	41
3.3.3 Tratamento com minociclina	41
3.4 Imunofluorescência de dupla marcação	42
3.5 Ensaio do Retardamento da Mobilidade Eletroforética em Gel de Poliacrilamida (EMSA)	44
3.5.1 Marcação da Sonda, Reação de Ligação e Corrida do gel	45
3.5.2 Revelação e Análise	45
3.6 Western Blotting	46
3.6.1 Proteínas do sobrenadante (meio de cultura)	47
3.7 Imunoprecipitação do Receptor Glicocorticoide	48
3.8 Ensaios de Viabilidade Celular	49
3.8.1 LDH – Lactato Desidrogenase	49
3.8.2 Laranja de Acridina e Iodeto de Propídeo	49
3.9 PCR em tempo real	50
3.9.1 Isolamento e purificação do RNA	50
3.9.2 Corrida PCR em tempo real	51
3.10 Análise dos resultados	53
4 RESULTADOS	53
4.1 Caracterização do Fenótipo de Culturas Primárias Mistas derivadas de Córtex Frontal de Ratos Neonatos Wistar	53
4.2 Caracterização de Culturas enriquecidas de Astrócitos derivadas de Córtex Frontal de Ratos Neonatos Wistar	55
4.3 Presença dos Receptores GR, MR, NLRP3, TLR4 e Proteínas das Junções tipo GAP (Conexina 43) em Astrócitos de Culturas Primárias Mistas derivadas de Córtex Frontal de Ratos Neonatos Wistar	56
4.4 Exposição Prolongada à Corticosterona, na Presença ou Ausência de RU486, Não Induz Morte Celular das Culturas Primárias Corticais	60
4.5 A Exposição prolongada à Corticosterona altera a secreção de Pró-IL-1 β , Caspase 1 (p10) e Tgfb β 1 pelas Células em Culturas Primárias Corticais Mistas de Neurônios/Células da Glia	61
4.6 Exposição Prévia à Corticosterona Potencializa a Morte Celular Induzida por LPS em Culturas Primárias Mistas de Neurônios/Células da Glia e Enriquecidas de Neurônios, mas não em Enriquecidas de Astrócitos	62

4.7	<i>Principal Tipo de Morte Celular induzida pela Exposição Prévia à Corticosterona muda de Apoptose para Necrose após Tratamento com LPS nas Culturas Primárias Mistas de Neurônios/Células da Glia, mas não em Enriquecidas de Astrócitos.</i>	63
4.8	<i>Exposição Prévia ao RU486, na Presença ou Ausência de CORT, Diminui a Viabilidade Celular das Células em Ambiente Controle Induzida pela Troca de Meio em Culturas Primárias Mistas de Neurônios/Células da Glia e Enriquecidas de Neurônios, mas não em Enriquecidas de Astrócitos</i>	66
4.9	<i>Exposição Prévia à Corticosterona Não Modifica Ativação do Fator de Transcrição NFKB Induzida por LPS em Culturas Primárias Corticais Mistas de Neurônios/Células da Glia.</i>	72
4.10	<i>Efeitos da Exposição Prévia ao RU486, na Presença ou Ausência de Corticosterona, na ativação do fator de transcrição NFKB induzida por LPS em Culturas Primárias Corticais</i>	73
4.11	<i>Efeitos da Exposição Prévia à Corticosterona na Localização Nuclear do Fator de Transcrição NFKB Induzida por LPS é alterada em Astrócitos de Culturas Primárias Corticais</i>	74
4.12	<i>Efeitos da Exposição ao RU486, na Presença ou Ausência de Corticosterona na Localização Nuclear do Fator de Transcrição NFKB Induzida por LPS em Astrócitos de Culturas Primárias Corticais</i>	77
4.13	<i>Inibição da Microglia durante a exposição à Corticosterona diminui a Localização Nuclear do Fator de Transcrição NFKB Induzida por LPS em Astrócitos de Culturas Primárias Mistas de Neurônios/ Células da Glia</i>	78
4.14	<i>Exposição Prévia à Corticosterona potencializa a secreção de IL-1β induzida por LPS em Culturas Primárias Mista de Neurônios/Células da Glia derivadas do Córtex Frontal</i>	80
4.15	<i>Exposição Prévia à Corticosterona Seguido por LPS Induz Expressão de Fatores Pro- e Anti-inflamatórios Diferenciadamente entre Culturas Primárias Mista de Neurônios/ Células da Glia e Enriquecida de Astrócitos</i>	81
4.16	<i>LPS aumenta a presença de heterodímeros GR-RELA e GR-MR em Culturas Primárias Mista de Neurônios/Células da Glia mas não em Enriquecidas de Astrócitos.</i>	84
4.17	<i>Expressão de Gilz e Fkbp5 Induzida por CORT nas Culturas Primárias Mistas de Neurônios/ Células da Glia e Enriquecida de Astrócitos</i>	87
4.18	<i>Exposição prolongada à Corticosterona Aumenta a Proteína Conexina 43 em Culturas Primárias de Córtex Frontal</i>	88
4.19	<i>Exposição prolongada à Corticosterona não modula HMGB1 em Culturas Primárias de Córtex Frontal</i>	89
4.20	<i>Efeitos da Exposição Prévia à Corticosterona Seguido de LPS não modula Fatores "ON/OFF" em Culturas Primárias de Córtex Frontal</i>	90
5	DISCUSSÃO	92
5.1	<i>Caracterização das Culturas Primárias</i>	92
5.2	<i>Glicocorticoides, Morte Celular e Priming</i>	98
5.3	<i>Glicocorticoides, NFKB e Interações Celulares</i>	105
6	CONCLUSÃO	116
	REFERÊNCIAS*	119
	APÊNDICE: Trabalho Publicado	137

1 INTRODUÇÃO

1.1 Inflamação

O sistema imune dos mamíferos tem funções essenciais como manter a homeostase dos tecidos, regular a regeneração e proteger o organismo contra agentes externos ou patógenos. Para isso, deve discriminar o próprio, como tecidos saudáveis e lesados, do não próprio, como bactérias, fungos, parasitas e substâncias tóxicas, desencadeando respostas eficientes para combater a entrada e disseminação destes agentes (1, 2).

Figura 1.1. Fases da resposta inflamatória após lesão aguda do SNC

Esquema representativo de uma resposta inflamatória local e sistêmica à uma lesão aguda do SNC. Linha preta: Lesão no parênquima do SNC; linha vermelha: resposta inflamatória local; e linha azul: leucócitos recrutados para o SNC. Fonte: Schwartz et al., 2014(3)

O sistema imune inato, evolutivamente conservado e a primeira linha de defesa do organismo, possui diversos componentes que podem ser solúveis, para identificação dos agentes, p. ex. proteínas do sistema complemento e anticorpos de ocorrência natural (para revisão ver (4)), e celulares, como células dendríticas apresentadoras de antígenos, NK (natural killer), células fagocíticas como neutrófilos e macrófagos na periferia (5) e a microglia (6) no sistema nervoso central. Essas células expressam receptores chamados receptores de reconhecimento de padrões, ou PRRs (pattern-recognition receptors) (7, 8), capazes de reconhecer partes de moléculas microbianas conservadas evolutivamente,

chamadas de padrões moleculares associados a patógenos, ou PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) (9) e moléculas sinalizadoras de perigo, chamadas DAMPs (danger-associated molecular patterns) (10, 11). Uma vez ativadas, as células do sistema imune inato iniciam a resposta inflamatória que consiste na secreção de citocinas e quimiocinas, indução da expressão de moléculas de adesão e moléculas co-estimulatórias para o recrutamento de outras células do sistema imune ao sítio da infecção ou lesão e para ativação da resposta imune adaptativa (12). A inflamação pode ser definida como uma resposta adaptativa complexa de defesa do organismo desencadeada por um estímulo aversivo na tentativa de reestabelecer a homeostase do sistema (5). Classicamente, a inflamação é induzida por processos infecciosos ou lesivos, entretanto estresse ou mau funcionamento tecidual também pode desencadeá-la, mesmo na ausência dos estímulos clássicos citados acima (13).

É consenso que enquanto a resposta inflamatória aguda é necessária para eliminar o agente infeccioso e promover o reparo, reestabelecendo a homeostase tecidual, a inflamação excessiva ou crônica pode ser prejudicial, podendo levar à disfunção e consequente dano tecidual (14). Acredita-se que o estado inflamatório crônico esteja muito mais associado a uma desregulação tecidual do que a uma infecção ou dano, ou seja, a um desbalanço homeostático de um ou vários sistemas fisiológicos que podem não estar diretamente relacionados ao sistema de defesa do hospedeiro ou reparo tecidual (para revisão ver (5)).

A inflamação crônica é uma característica proeminente de muitas doenças neurodegenerativas (15) e é caracterizada por infiltração de granulócitos e macrófagos/monócitos no parênquima cerebral, ativação da microglia e astrócitos, expressão de citocinas, moléculas de adesão e outros mediadores inflamatórios (16, 17) (18). Nesse sentido, a exacerbação de respostas mediadas por células da microglia e astrócitos (gliose e astrogliose, respectivamente) pode ser encontrada nos encéfalos de pacientes com doença de Alzheimer, Parkinson e Huntington e também em pacientes portadores de Esclerose Múltipla e Esclerose Lateral Amiotrófica (19, 20). Além de secretar citocinas, a microglia pode liberar moléculas como óxido nítrico (NO), prostaglandinas, espécies reativas de oxigênio, enzimas proteolíticas e substâncias com ação potencializadora sobre a toxicidade glutamatérgica, sendo que a secreção destes compostos pode contribuir para a cascata de eventos que ocorre nos processos neurodegenerativos (21, 22).

Figura 1.2. Inflamação no SNC: envolvimento de vários tipos celulares

Fonte: Waisman et al., 2015(23)

As células da resposta imune inata, assim como as células da glia e neurônios, expressam PRRs especializados capazes de reconhecer e transduzir sinais ativados por PAMPs e DAMPs (24). Os receptores do tipo Toll (TLRs) e os receptores do tipo Nod (NLRs) são exemplos de PRRs (25). Os TLRs, receptores de membrana em sua maioria, são homólogos conservados do gene *Toll* da *Drosophila*, que reconhecem uma variedade de PAMPs tais como DNA bacteriano, flagelinas e componentes da parede bacteriana como LPS (lipopolissacarídeo da parede de bactérias gram-negativas), peptidoglicanos e lipopeptídeos (26). Já os NLRs são sensores citoplasmáticos que se oligomerizam para a formação de um complexo proteico chamado inflamassoma. Este complexo é responsável, por exemplo, pela conversão da pró-IL-1 β e pró-IL-18, em IL-1 β e IL-18 respectivamente, pela ação da caspase-1 associada ao complexo (27). O receptor NLRP3 é o mais bem estudado dos NLRs e seu mecanismo de ativação é ainda bastante discutido. De consenso, sabe-se que o NLRP3 pode ser ativado pela desestabilização de fagolisossomos e liberação do conteúdo com mediadores endógenos no citosol, os DAMPs (10, 11), tais como, substâncias associadas a dano celular ou elevadas em estados patológicos, que incluem ATP, ácido hialurônico, proteína β -amiloide, glicose, ácido

cada vez mais evidências de que um bom funcionamento da tríade neurônio-microglia-astrocítico seja fundamental para a manutenção das ações do SNC, uma vez que processos neurodegenerativos e de envelhecimento podem estar relacionados a uma interação celular “defeituosa” entre esses tipos celulares (36-38).

O recrutamento e a ativação das células da glia tem um padrão temporal complexo e exige uma comunicação bem organizada entre esse tipo celular e os neurônios, bem como entre elas próprias. Portanto, uma melhor compreensão da interação de neurônios, astrócitos e microglia é essencial para o entendimento de processos fisiológicos e de processos patológicos (38). Embora as células da glia sejam agora amplamente aceitas como fundamentais para o funcionamento adequado do SNC, o conhecimento sobre as interações e os mediadores das funções gliais é limitado e os estudos que abordam esse tema têm ganhado espaço somente nos últimos anos (39). A seguir descrevemos algumas dessas funções relacionadas à inflamação da microglia e astrócitos.

1.2.1 Microglia

A microglia é o principal efetor da resposta imune no SNC e uma de suas principais funções é a de ser “vigilante” contra patógenos. Ademais, estudos recentes atribuem à microglia outras funções fisiológicas que se estendem desde o desenvolvimento dos circuitos neuronais antes do nascimento, até funções importantes no encéfalo adulto como participação na formação da memória e neurogênese (para revisão ver(40) .

A microglia, assim como as células imunes periféricas, tem a habilidade de migrar, proliferar e fagocitar. Ela pode passar de um estado chamado de “repouso” e vigilância do ambiente, para “ativada”, na vigência de um estímulo nocivo, como o LPS, que, via receptor *Toll like 4* (TLR4), ativa o fator de transcrição NF κ B (*Nuclear Factor KB*), com consequente produção de mediadores pró-inflamatórios (6, 41-45). A microglia pode estar relacionada à progressão de doenças neurodegenerativas, uma vez que ela pode produzir mediadores pró-inflamatórios tais como TNF α , IL-1 β e espécies reativas de oxigênio. Entretanto, sua ausência também é prejudicial, à medida que podem secretar fatores como IGF1, TGF β e BDNF, e mediadores anti-inflamatórios como IL-4 e IL-10 (6, 44), com funções neurotróficas e neuroprotetoras. O que leva a microglia a produzir determinados fatores em detrimento de outros ainda é desconhecido, pois, além de exercer diversas funções, estas podem mudar de

acordo com a região do SNC e estado, se sadio ou após trauma, infecção, tumor, isquemia, neurodegeneração e inflamação sistêmica (46).

O estudo do estado de ativação da microglia e sua interação com neurônios são importantes para a evolução ou controle do processo de morte celular em processos neurodegenerativos. Estudos *in vitro*, em culturas primárias de mesencéfalo, demonstraram que nem o LPS, nem α -sinucleína são diretamente tóxicos para os neurônios na ausência de microglia, sugerindo que a inflamação e estresse oxidativo desencadeados pela microglia podem contribuir para a lesão de neurônios dopaminérgicos do SNC em pacientes com Parkinson (42, 47). Ainda, imagens de tomografia computadorizada (PET) confirmaram a ativação generalizada de microglia no mesencéfalo (48), bem como no tronco cerebral, estriado, giro cingulado, e neocórtex de pacientes com Doença de Parkinson (49) e mais recentemente, foi mostrado que a microglia ativada no mesencéfalo se correlaciona com sintomas motores no início da doença de Parkinson (50).

Já na doença de Alzheimer, a ativação da microglia é importante para o controle da progressão do quadro, uma vez que a microglia não apenas fagocita proteínas β -amiloide ($A\beta$), como também fagocita células em apoptose e restos de neurônios em degeneração e, neste caso, a fagocitose de proteínas $A\beta$ depositadas parece ser importante para impedir a expansão de placas senis (51).

Achados da literatura evidenciam que os neurônios podem participar ativamente da modulação da resposta inflamatória desencadeada pela microglia (52, 53). Biber et al., (1999, 2007) discutem que as células neuronais não seriam apenas alvos passivos da ação da microglia e, sim poderiam modular sua atividade através de sinais “on/off” (6, 52, 53). Estes sinais podem ser físicos e depender do contato célula-célula, como também podem ser fatores solúveis secretados por ambas as células, já que existem ligantes e receptores específicos nesses tipos celulares que se complementam (53). Por exemplo, neurônios saudáveis expressam constitutivamente altos níveis da quimiocina CX3CL1 (quimiocina ligante 1 da CX3C), também conhecida como *fractalkina*, enquanto seu receptor, o CX3CR1, é expresso na microglia (52).

A ligação CX3CL1-CX3CR1 é protetora e vários estudos mostram sua importância no controle de processos neuroinflamatórios e/ou neurodegenerativos. Mizuno et al., observaram redução dose-dependente da morte neuronal por inflamação induzida por LPS e $INF-\gamma$ em co-culturas corticais primárias de neurônios e microglia, derivadas de

camundongos, expostas a concentrações crescentes de CX3CL1 (54). Cardona et al mostraram que a ausência dos receptores de fractalkina, CX3CR1, na microglia, aumentou a susceptibilidade à neurotoxicidade em camundongos submetidos a modelos de Parkinson, Esclerose Lateral Amiotrófica e administração sistêmica de LPS (55) e estudos mais recentes mostraram que a fractalkina induz neuroproteção em modelo de Parkinson em ratos, e sua ausência, em camundongos que não expressam o receptor CX3CR1, agravam os sintomas patológicos em modelos de Alzheimer (56, 57). Entretanto, um estudo recente mostrou a expressão de CX3CR1 em neurônios de hipocampo de camundongos e uma relação direta entre presença deste receptor e morte neuronal por apoptose induzida por isquemia (58).

Além da fractalkina, foi também demonstrado que os neurônios secretam a interleucina-34 (IL-34), cujo receptor é o mesmo do fator estimulador de colônia 1 (CSF1), primariamente expresso na microglia. A IL-34 secretada pelos neurônios induz proliferação de microglia e aumento da expressão da enzima antioxidante heme-oxigenase-1, importantes para a depuração da fração amiloide solúvel e diminuição do estresse oxidativo, mediadores da disfunção sináptica e dano neuronal na Doença de Alzheimer (revisado em (59)).

Os neurônios em degeneração liberam várias moléculas de sinalização, incluindo nucleotídeos, citocinas e quimiocinas, que além de recrutar a microglia, amplificam suas atividades (21, 52, 60). Por exemplo, o CD200 é outro fator importante. Ele é uma glicoproteína de membrana expressa em neurônios que suprime atividade imunológica através de seu receptor CD200R, principalmente localizado em macrófagos e microglia. A interação CD200-CD200R proporciona, por meio de um contato célula-célula, um sinal regulatório negativo para microglia (61). De fato, foi observado que camundongos *knockouts* para o CD200 foram mais susceptíveis à inflamação em modelo animal de esclerose múltipla, no qual o pico da doença foi adiantado em 3 dias, e em modelo de artrite reumatoide, no qual foi observado aumento na incidência da doença de 10% para 50% (62). Outras evidências sugerem que a citocina anti-inflamatória IL-4 pode modular a expressão de CD200 em neurônios, e assim, modular também a ativação da microglia (63) (revisado em (59)).

1.2.2 Astrócitos

São crescentes os relatos que apontam para a participação ativa dos astrócitos na fisiologia do SNC, não somente como células de preenchimento e suporte para os neurônios, mas também como células necessárias para a homeostase e sobrevivência neuronal (36, 64,

65). Desde a descoberta de receptores para neurotransmissores, os astrócitos foram alvo de intensa investigação e, desde então, novas funções tem lhes sido dadas (64).

Uma função clássica dos astrócitos é a recaptação do glutamato liberado na fenda sináptica, limitando o acesso de neurotransmissores e a duração da estimulação, além da reciclagem de glutamato em glutamina, pela glutamina sintetase (66). A regulação do metabolismo energético local, devido a um aumento de atividade neuronal, está acoplada à captação do glutamato liberado, levando os astrócitos a aumentarem a utilização de glicose, pertencente aos seus estoques de glicogênio, e liberação de lactato que pode ser prontamente utilizado pelos neurônios (revisado (65)).

Os astrócitos estão organizados em redes e se comunicam através destes canais especializados chamados de junções do tipo GAP (GJC). As GJC são compostas pelo acoplamento de dois canais entre duas células adjacentes, cada um composto por seis subunidades de proteínas conexinas (Cx), principalmente Cx 43 e 30 nos astrócitos (67). As GJC são permeáveis a uma grande variedade de moléculas, dependendo de sua carga e formato, tais como ATP, glutamato, glicose, Ca^{2+} , K^+ e Na^+ , destacando sua importância na manutenção da estabilidade iônica do SNC (36, 68, 69). As conexinas, e outras proteínas como as panexinas (Pnx), formam hemicanais. Os hemicanais de conexinas são regulados por Ca^{2+} , diferenças de pH e alteração do potencial de membrana, sendo os canais de panexina sensíveis ao K^+ (70). As conexinas e os hemicanais não são exclusivos dos astrócitos, sendo também encontrados nos neurônios e oligodendrócitos (67), e nos neurônios e microglia, respectivamente (revisado em (71)).

Outras funções dos astrócitos incluem modulação da atividade neuronal, controle da função e formação de sinapses, neurogênese e tônus vascular (64), além de regular o meio extracelular, como a concentração de K^+ , por tamponamento espacial, parcialmente dependente de suas GJC (72).

Como a microglia, os astrócitos expressam receptores capazes de reconhecer não somente PAMPs, como também DAMPs, liberados após dano tecidual ou estresse (6, 73) e, portanto, são capazes de iniciar uma resposta inflamatória no SNC, como também são essenciais na resolução da inflamação (74, 75).

Os astrócitos podem ser protetores a medida que formam as chamadas cicatrizes gliais que funcionam como barreiras que restringem a migração de leucócitos e outras células inflamatórias após um trauma físico ou lesão por isquemia, autoimunidade e

neurodegeneração. A cicatriz astrogliar é dependente da expressão de GFAP (proteína glial fibrilar ácida) e vimentina e a ausência destas agrava a inflamação decorrente destes insultos (76).

Além da proteção feita pela cicatriz glial em um evento isquêmico, os astrócitos também limitam a inflamação secretando o fator de transformação de crescimento ($TGF\beta$), uma citocina anti-inflamatória (77).

Os astrócitos podem secretar fatores que modulam as ações da microglia, já que o tratamento *in vitro* da microglia com meio condicionado de astrócitos, aumentam a expressão hemeoxigenase (HO-1) e controlam a síntese de espécies reativas de oxigênio (78). Essas células também podem ser pró-inflamatória. Brambilla et al., (2009) mostraram que a inativação do NF κ B em astrócitos resultou na redução da gravidade da doença e melhorou a recuperação dos camundongos com encefalomielite autoimune experimental (EAE), modelo que mimetiza aspectos da esclerose múltipla (79). Camundongos com deleção condicional em astrócitos da quimiocina CCL2 (ou MCP-1) tiveram EAE menos grave, com menor infiltração de macrófagos e células T na medula espinhal e ativação menos difusa de astrócitos e microglia (80). Em outro estudo, também em modelo de EAE, foi mostrado que a expressão e liberação de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) pelos astrócitos aumenta a permeabilidade da barreira hemato-encefálica (BHE) e sua deleção condicional reduziu a degradação da BHE, infiltração de linfócitos, lesões inflamatórias e desmielinizantes, e consequentemente a paralisia dos camundongos com EAE (81).

A secreção de citocinas pela microglia também pode modular e alterar as funções astrocitárias. Astrócitos em cultura expostos a IL-1 β ou TNF- α têm a utilização de glicose aumentada e diminuição nos níveis de glicogênio. A combinação das duas citocinas exercem um efeito sinérgico, aumentando ainda mais a utilização de glicose e mudando o fenótipo metabólico dos astrócitos. Além disso, o tratamento com ambas citocinas reduzem os estoques de glutatona dos astrócitos, pois estas são liberadas no meio extracelular em razão de um estresse oxidativo com intuito de proteção dos neurônios, já que os estoques neuronais são menores do que os dos astrócitos (82). Essas mudanças no fenótipo metabólico dos astrócitos podem contribuir para a vulnerabilidade dos neurônios frente a uma neuroinflamação crônica, frequentemente observada em condições patológicas e doenças neurodegenerativas (revisado em (36)).

Figura 1.4 - Interações entre Astrócitos, Neurônios e Microglia

Esquema simplificado representativo das interações entre neurônios, astrócitos e microglia em uma condição normal (a) e uma condição patológica (b) do SNC. Fonte: Modificado de Tian et al., 2012 (60)

1.3 Glicocorticoides, Inflamação e Interações Celulares

Os glicocorticoides (GCs) são os fármacos anti-inflamatórios mais prescritos mundialmente, havendo uma grande variedade de derivados sintéticos disponíveis tais como a dexametasona e prednisolona (83). Os GCs endógenos, cortisol nos humanos e corticosterona nos roedores, são hormônios produzidos pelas glândulas adrenais e são essenciais no desenvolvimento embrionário, no controle da resposta ao estresse (83), além de participarem de inúmeras funções fisiológicas, regulando o metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas (84), e também na resolução da inflamação (14).

A maioria das ações celulares e fisiológicas dos GCs é mediada por dois tipos de receptores citoplasmáticos: os receptores do tipo I ou receptores de mineralocorticoides (MR) e os receptores do tipo II ou receptores de glicocorticoides (GR)(14). Os MR apresentam alta afinidade por GC e são de expressão mais restrita comparada aos GR (85). No SNC, estão localizados nos sítios hipotalâmicos envolvidos no controle de sódio, no sistema límbico e no córtex pré-frontal (86, 87). Já os GR apresentam baixa afinidade por GC e encontram-se espalhados pelo SNC, sendo expressos em muitos tipos de neurônios e células da glia (86, 88, 89). Devido à diferença nas afinidades, os MR estão geralmente ocupados por níveis basais de GCs, sendo responsáveis pelos efeitos fisiológicos dos mesmos, enquanto que os GR são ativados durante o pico de secreção desse hormônio, comumente observados em situações de estresse (90, 91). A hipersecreção de GCs e o estresse estão relacionados com grande número de doenças neurológicas como depressão, demência, abuso de drogas e esquizofrenia (73, 91).

Uma vez alcançado o tecido alvo, os GCs podem: 1) interagir com GR de membrana, já descritos em linfócitos do tipo B e monócitos humanos (92), células T humanas (93), músculo liso esquelético de camundongos (94) e em neurônios nociceptivos periféricos (95), sendo possivelmente uma variante do GR citoplasmático e responsáveis, pelo menos em parte, pelos efeitos rápidos não genômicos dos GCs (92-95); ou, 2) podem se ligar, no citoplasma, aos receptores pertencentes à superfamília de receptores nucleares, os GRs clássicos (96). A ligação dos GCs aos GRs promove sua liberação de um complexo proteico de chaperonas, proteínas de choque térmico (do inglês *heat shock protein*), composto pelas proteínas HSP70, HSP90, HSP40, p23 e imunofilinas FKBP5 e Cyp40 (83). Este fato permite que o complexo GC-GR interaja com outras proteínas citosólicas como FKBP4 e dineína, os quais auxiliam na translocação para o núcleo (83, 97). No núcleo, esse complexo se liga a sítios específicos no DNA chamados elementos responsivos ao glicocorticoide (GRE) e funciona como fator de transcrição, alterando a expressão gênica de várias proteínas, entre elas a tirosina hidroxilase, enzima responsável pela síntese de dopamina (98); a heme-oxigenase-1 (HO-1) e óxido nítrico sintase (NOS) (99), enzimas responsáveis pela produção de monóxido de carbono e óxido nítrico, respectivamente; bem como alterando outros fatores de transcrição como CREB (100), AP-1 (101) e NFkB (102), estes dois últimos muito importantes na sinalização inflamatória (para revisão ver (97, 103)).

O complexo GC-GR pode atuar como dímeros GC-GR α /GR α , como também atuar sem dimerização, como um complexo monomérico GC-GR α , e ligar ao DNA conjuntamente com outro fator de transcrição, aumentando ainda mais a gama de genes que podem ser modulados (97).

Duas isoformas humanas do GR já foram identificadas, o GR α e o GR β , que são originadas por *splicing* alternativo do transcrito primário de GR. O GR α é a isoforma predominante do receptor e é aquela que se liga aos GCs e transduz seu sinal (104). O GR β difere do GR α na sequência carboxi-terminal, onde os 50 últimos aminoácidos foram substituídos por uma sequência de 15 aminoácidos não homólogos, tornando o GR β não responsivo aos GCs (104, 105). Desta maneira, não há ativação ou transcrição dos genes alvos clássicos ativados pelos GCs quando ligados ao GR β . O GR β foi descrito em várias células, especialmente em células inflamatórias tais como linfócitos e macrófagos, em doenças relacionadas com resistência aos GCs, como asma (106), leucemia linfocítica crônica (107) e artrite reumatoide (108). Recentemente foi descrito em fígado de camundongos

(109) e ratos (110), e tem função relacionada ao metabolismo controlado por insulina. O papel fisiológico do GR β é objeto de vários estudos recentes e em vários sistemas, por exemplo, a superexpressão de GR β em linhagem de fibroblastos de camundongos suprime a expressão da proteína PTEN, essencial para a regulação do crescimento, levando ao aumento do crescimento estimulado pela insulina (111).

Um dos mecanismos pelo qual os GCs exercem seus efeitos anti-inflamatórios é a sua capacidade de interagir e modular a ativação do fator de transcrição NF κ B (102, 112). É bem estabelecido que os GCs aumentam a transcrição da proteína inibitória I κ B α (102, 113), mantendo o NF κ B na sua forma inativa no citoplasma e impedindo sua translocação para o núcleo. O complexo GC-GR também pode interagir fisicamente com fatores de transcrição, inibindo e reprimindo a transcrição dos genes alvo destes fatores. Acredita-se que este é o mecanismo como o GC-GR interage com a subunidade RELA do fator de transcrição NF κ B, impedindo a ligação deste fator à sequência consenso no DNA e diminuindo a transcrição de seus genes alvos (114). Um terceiro mecanismo seria uma competição entre o complexo GC-GR e o NF κ B por proteínas co-ativadoras como, por exemplo, a proteína ligante ao CREB (CBP) e SRC-1, impedindo a ação desses fatores em modular a transcrição dos genes alvos (115).

Figura 1.5. Inibição das vias pró-inflamatórias pelos GCs

Esquema representativo do mecanismo de ação de inibição das vias pró-inflamatórias pelos glicocorticoides. Fonte: Modificado de Rivest et al., 2009 (116)

Além disso, tanto no sistema periférico como no SNC, a ação anti-inflamatória dos GCs também é resultado de sua capacidade de induzir apoptose nos linfócitos T (117), modular a expressão de citocinas (118), inibir a migração de células inflamatórias (119, 120) e também inibir a transcrição de importantes genes pró-inflamatórios através da interação com o fator de transcrição AP-1, além do NFκB (121, 122).

De fato, são cada vez mais comuns estudos que sugerem que os GCs não são uniformemente anti-inflamatórios e em alguns casos podem até mesmo aumentar alguns parâmetros da resposta inflamatória, principalmente no SNC [revisado em (123)]. Resultados de nosso laboratório mostram que 14 dias de estresse crônico imprevisível potencializa a ativação do NFκB induzida por LPS, bem como a expressão de genes pró-inflamatórios (*iNos*, *il-1β*, *Tnf-α*) no córtex frontal e hipocampo, via ativação dos receptores GR, uma vez que o pré-tratamento com RU486, a reverteu (124). Utilizando ratos adrenalectomizados com implantes subcutâneos de *pellets* com concentrações crescentes de corticosterona e tratamento posterior com LPS, foi mostrado que os GCs podem diminuir a expressão de genes anti-inflamatórios e aumentar a expressão dos pró-inflamatórios (57). Os resultados de nosso laboratório e também os da literatura científica sugerem que esses efeitos pró-

inflamatórios/ deletérios dos GCs não são gerais, e que, em situações e estruturas diferentes, esses hormônios ainda apresentam sua tradicional ação anti-inflamatória (123).

Estudos recentes de nosso laboratório e de outros grupos de pesquisa sugerem que a ação pró-inflamatória dos GCs seja tipo celular dependente (123). Resultados obtidos durante meu mestrado mostraram que os astrócitos em culturas primárias corticais mistas de neurônios/células da glia apresentaram uma grande ativação do NFKB induzida por LPS, que foi potencializada pela exposição prévia à corticosterona (CORT), evidenciando um efeito pró-inflamatório deste hormônio especificamente neste tipo celular, uma vez que este efeito não foi observado em microglias ou neurônios. Ainda, mostramos que os efeitos pró-inflamatórios do GCs nos astrócitos é mediado pela ativação de GR, uma vez que o bloqueio desses receptores pela exposição ao antagonista RU486 impediu a potencialização induzida por CORT, da ativação do NFKB em resposta ao LPS (125).

Já os astrócitos de culturas enriquecidas de neurônios foram insensíveis ao LPS, independentemente do tratamento prévio com CORT, à medida que não houve aumento significativo da translocação nuclear da subunidade RELA do NFKB. A diferença entre esses dois modelos de cultura está na composição das mesmas, sendo as culturas mistas ricas em astrócitos (aproximadamente 72% das células em cultura) e as culturas enriquecidas de neurônios compostas predominantemente por este tipo celular (aproximadamente 76%), evidenciando mais uma vez a importância do funcionamento perfeito entre a tríade neurônio-microglia-astrócito para que o sistema nervoso central responda adequadamente ao um estímulo aversivo, como por exemplo, o LPS.

Ademais, sobre a ação célula-dependente dos GCs, Sorrells et al. (2013), através da deleção ou superexpressão do GR em tipos celulares específicos mostraram que em células mieloides, a sinalização de GR aumentou a imunoreatividade de Iba-1 e CD68, como também os níveis de RELA nos tecidos após danos por excitotoxicidade ou isquemia. Os GCs também reduziram os níveis de ocludinas, claudina 5 e caveolina 1 nas células endoteliais componentes da barreira hemato-encefálica após isquemia e comprometeram a sobrevivência neuronal decorrentes dos efeitos mediados por GR nas células mieloides e endoteliais (126).

Além disso, os GCs podem estar envolvidos na modulação da resposta da microglia, limitando sua ativação, como relatado por Sugama et al., (2012). Estes autores mostraram que os camundongos *sham* e adrenalectomizados submetidos ao estresse agudo (2h de

imobilização em água), apresentaram microglias ativadas, sendo que nos animais adrenalectomizados, a ativação foi muito maior no hipocampo e hipotálamo. Eles ainda mostraram que a reposição com doses fisiológicas de corticosterona (0,3 µg/ml) diminuiu a ativação microglial pós-estresse agudo, sugerindo que a magnitude da ativação da microglia por estresse é negativamente regulada por CORT (127). Por outro lado, os GCs também podem sensibilizar a microglia do córtex pré-frontal de ratos submetidos a 9 dias de estresse crônico imprevisível, seguido de desafio inflamatório com LPS intracerebroventricular, como relatado por De Pablos et al., (2006). Ao contrário do observado por Sugama et al., estes autores observaram uma microglia ativada, em proliferação e com alta produção de TNF α , com consequente morte neuronal e astrocitária na região de aplicação, os quais foram reduzidos pelo tratamento com antagonista de GR (RU486) (128).

Frank et al., (2012) observaram o mesmo visto por de De Pablos (129), ou seja, um efeito sensibilizador da corticosterona na ativação da microglia desafiada com LPS *ex vivo*. Neste estudo, os autores mostraram que a microglia do hipocampo de ratos adrenalectomizados ou tratados com RU486 e submetidos ao estresse agudo, o choque inescapável da cauda, estava menos ativada que a microglia do hipocampo de ratos *sham* ou controles submetidos ao mesmo estresse e desafiada com LPS *ex vivo*. Nestas células observou-se um aumento na produção de IL-1 β , TNF α e IL-6, enquanto que nos animais adrenalectomizados e tratados com RU486, o mesmo não ocorreu (129).

Outros estudos também relataram que os astrócitos são possíveis alvos das ações dos GCs. Yu et al., (2012) mostraram que a exposição de cultura de astrócitos do hipocampo de ratos à dexametasona por 48 horas leva à inibição do crescimento e aumenta sua resistência à apoptose induzida por este composto, a qual foi observada em neurônios (73). Resultados similares foram relatados por Unemura et al., (2012), em experimentos *in vivo* e *in vitro* nos quais mostraram que os GCs diminuem o número de astrócitos e que esta redução é devido à diminuição da expressão de GR, observada após realizarem o silenciamento deste receptor (130). Sun et al., (2012) relataram que o estresse crônico imprevisível por 28 dias reduz a expressão da proteína Cx43, levando a um aumento da distância entre GJC e, portanto, diminuindo a difusão intercelular entre astrócitos. Esses efeitos foram revertidos com o tratamento com antidepressivos, fluoxetina e duloxetina, como também com o antagonista de GR, o RU486 (131).

A ação pró-inflamatória dos GCs não é restrita à presença de PAMPs. Um estudo recente mostrou que os GCs aumentam tanto a expressão quanto a função do inflamassoma composto pelo receptor NLRP3, em cultura primária e linhagem de macrófagos estimulados com ATP (um DAMP clássico), além de aumentar a liberação de mediadores pró-inflamatórios, como IL-1 β , TNF- α e IL-6, efeitos estes dependentes da presença dos GRs (28). O mesmo foi visto por Frank et al., (2014), que observaram que exposição crônica a CORT aumentou a expressão gênica de *Nlrp3*, *Iba-1*, *Mhcll* e *NfkB1 α* em microglia de hipocampo de ratos. Esses autores também observaram que a exposição crônica à CORT (75 mg / ml) potencializou a resposta pró-inflamatória da microglia, medida pela expressão gênica de *Tnfa*, *Il-1 β* , *Il-6* e *Nlrp3*, induzida por LPS *ex vivo* (132). Em outro estudo do mesmo grupo (55), foi mostrado que a exposição a choques inescapáveis na cauda aumentou a proteína alarmina HMGB-1 (High mobility group box-1), um DAMP, e também de NLRP3 no hipocampo de ratos, provavelmente provenientes da microglia, pois ao isolá-la, verificaram liberação de HMGB-1 *ex vivo* após o estresse. A HMGB-1 interage com TLR2, TLR4 e RAGE, nos quais atua como um mediador quimiotático e pró-inflamatório (133). A hipótese do grupo é que o estresse/ CORT leva a um aumento de HMGB1, que por sua vez aumenta NLRP3, que sensibiliza a microglia a responder prontamente a um possível estímulo inflamatório subsequente (55, 133).

Em suma, as ações dos glicocorticoides nos processos inflamatórios no SNC são conflitantes e cada vez mais, evidências apontam para a especificidade celular e regional dessas ações. Os estudos nesta área estão apenas começando e muito pouco se sabe sobre como a exposição a esses hormônios poderia alterar as interações físicas das células do sistema nervoso central bem como os fatores solúveis secretados por elas, notadamente importantes no controle dos processos inflamatórios no SNC.

Figura 1.6. GCs podem mediar mecanismos pró-inflamatórios

Esquema representativos dos possíveis mecanismos pró-inflamatórios mediados pelos GCs. (A) O LPS, via TLR4, ativa a via das MAPK, ativando o NFκB e aumentando a expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias (IL-1β, TNFα e IL-6). A exposição elevada e prolongada ao GC aumenta e potencializa a resposta pró-inflamatória relacionada à via da MAPK-NFκB. (B) A ativação de GR regula a expressão gênica e proteica de TLR2, que reconhece PAMPs. Em um segundo momento, este evento recruta proteínas intracelulares, levando à ativação da sinalização NFκB, aumentando a expressão de citocinas inflamatórias, incluindo IL-6, TNFα e IL-1β. (C) A ativação do GR regula a expressão gênica e proteica do NLRP3, que reconhece DAMPs e regula a resposta do sistema imune em um mecanismo similar ao proposto em (B).

Fonte: Duque & Munhoz (2016)(134)

Desta maneira e levando em consideração os vários estudos descritos acima e nossos resultados que evidenciam a especificidade do tipo celular na resposta aos GCs dependentes das proporções celulares e de seu consequente microambiente, este estudo analisou os efeitos da exposição prolongada aos glicocorticoides sobre as interações celulares de microglia, astrócitos e neurônios na presença ou ausência de um insulto inflamatório em modelos *in vitro*.

2 OBJETIVOS

Neste estudo, visamos caracterizar os efeitos dos glicocorticoides nas interações celulares físicas e humorais de astrócitos, microglia e neurônios na presença ou ausência de um estímulo inflamatório agudo (LPS).

Para tanto submetemos os diferentes modelos de cultura primária a exposição prolongada a CORT seguida do estímulo inflamatório agudo com LPS, exceto para os ensaios de caracterização, e avaliamos:

- a presença dos receptores de glicocorticoides GR α , MR, TLR4 e NLRP3 e da conexina (Cx 43), utilizando o ensaio de imunofluorescência de dupla marcação em culturas mistas de neurônios/ células da glia;
- a viabilidade celular e o tipo morte celular induzida pelos tratamentos;
- o padrão de ativação do fator de transcrição NF κ B através dos ensaios de EMSA, western blot e imunofluorescência, e a dependência deste em relação microambiente e tipo celular;
- o envolvimento dos receptores de glicocorticoides (GR) através dos ensaios de da utilização de seu antagonista, RU486 ou mifepristona, em algumas das situações acima descritas, como também sua função através do ensaio de PCR em tempo real (GR, GILZ e FKBP5) e ensaios de imunoprecipitação do GR;
- o envolvimento da microglia através da utilização de um inibidor de sua atividade, a Minociclina
- a expressão gênica e/ou proteica dos fatores pro-inflamatórios IL-1 β , TNF α , Casp1, NLRP3 e IL-6, e os fatores anti-inflamatórios IL-10, IL-1ra e TGF β , através do ensaio PCR em tempo real ou western blot do meio extracelular (sobrenadante);
- a expressão de alguns fatores “on” / “off” : CD200-CD200R; CX3CL1-CX3CR1 e SIRP α e junções do tipo GAP (Cx43) através da quantificação de proteínas por Western Blot;

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos neonatos da linhagem Wistar, entre 1 e 4 dias de idade (P1-P4) para as culturas primárias. Os animais foram fornecidos pelo Biotério de Produção de Ratos (ICB, Rede USP de Biotérios). Todos os animais foram utilizados de acordo com certificado aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA – ICB, número 86, na folha 8 do livro 03) e normas estabelecidas pelo CONCEA.

3.2 Culturas Primárias

3.2.1 Cultura Mista de Neurônios/Células da Glia e Enriquecida de Neurônios

As culturas primárias de tecido cortical foram preparadas a partir do protocolo descrito por Ahlemeyer & Baumgart-Vogt (135), com algumas modificações. Todas as culturas primárias foram realizadas no período da tarde, entre 14:00 e 18:00 horas. Os animais foram decapitados com o auxílio de uma tesoura, seus encéfalos retirados da caixa craniana e os córtices frontais dissecados em meio de dissecação estéril e gelado (tampão Hanks: 160 mM de NaCl; 5,3 mM de KCl; 0,44 mM de KH_2PO_4 ; 0,33 mM de Na_2HPO_4 ; 5,5 mM de glicose; 4,0 mM de NaHCO_3) (Labsynth, Diadema, SP, Brasil) acrescido de antibióticos (penicilina/estreptomicina, P/E, 1%, Vitrocell, Campinas, SP, Brasil e anfotericina B (0,01%, Amresco, VWR International, Radnor, PA, EUA), em pH 7,4. O córtex frontal isolado foi mantido por cerca de 10 minutos a 37 °C em solução de tripsina (Vitrocell) a 0,05% em tampão PBS estéril (solução salina balanceada: 135 mM de NaCl, 1,3 mM KCl, 0,5 mM KH_2PO_4 e 3,2 mM de Na_2HPO_4) (Labsynth), para digestão enzimática e depois transferido para o meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Vitrocell) acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB, Vitrocell), 2 mM de glutamina (Amresco) e antibióticos P/E 0,5% (Vitrocell) onde foi gentilmente triturado mecanicamente com o auxílio de pipeta Pasteur. As células contidas nessa suspensão foram filtradas em membrana de 70 μm (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EUA) e plaqueadas a uma densidade aproximada de $1,12 \times 10^5$ células/ cm^2 em placas multi-poços (SARSTEDT, Nümbrecht, Alemanha) cobertas por poli-L-lisina 0,01% (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) e mantidas a 37 °C com 5% CO_2 em atmosfera umidificada (umidade relativa do ar de 80%) na incubadora. A fim de assegurar maior uniformidade na densidade de células por poço, foram realizadas contagens do número de células antes do plaqueamento, utilizando-se o método de exclusão por Azul de Tripán (Amresco) (136).

Culturas mistas de neurônios/células da glia foram plaqueadas e mantidas em DMEM suplementado com antibióticos P/E 0,5%, 10% SFB e 2 mM de glutamina. Para manutenção deste tipo de cultura o meio foi trocado por meio fresco no 2º dia *in vitro* (DIV) e no 5º DIV, o meio foi trocado para DMEM, antibióticos P/E 0,5%, 2 mM de glutamina e 10% de SFB tratado com carvão ativado (*charcoal stripped serum*, Sigma) para descartar os efeitos exercidos pelos hormônios esteroides contidos no soro (137).

As culturas enriquecidas de neurônios foram plaqueadas e mantidas até o 2º DIV em meio DMEM, antibióticos 0,5% P/E, 10% SFB, 10% SC (soro de cavalo) (Invitrogen, Grand Island, NY, EUA) e 2mM de Glutamina. Após 24 horas do plaqueamento, o meio de cultura foi trocado por meio DMEM, antibióticos P/E 0,5%, 2 mM de glutamina e 2% de suplemento B27 (Invitrogen), suplementação específica que favorece crescimento neuronal (138). Para manutenção deste fenótipo, no quinto dia in vitro (DIV), o meio foi substituído por meio fresco (DMEM + antibióticos P/E 0,5% + 2% B27).

No 8º DIV, as culturas primárias foram submetidas aos nossos protocolos de tratamento descritos adiante.

Figura 3.1. Esquema experimental da realização da cultura primária mista de neurônios/ células da glia.

3.2.2 Cultura Enriquecida de Astrócitos

As culturas enriquecidas de astrócitos foram obtidas de acordo com o protocolo previamente descrito por Ni et al (139). As células do córtex frontal, obtidas pelo método acima descrito, foram plaqueadas em uma densidade aproximada de $1,12 \times 10^5$ células/cm² em garrafas de 75 cm² com meio DMEM, antibióticos P/E 0,5%, 10 % SFB e 2 mM de glutamina. Para a manutenção destas culturas, o meio foi substituído a cada 3 ou 4 dias por meio fresco (DMEM, antibióticos P/E 0,5%, 10 % SFB e 2 mM de glutamina). No 14º DIV, as células foram submetidas à agitação por 3 horas, 180 RPM a 37 °C e o sobrenadante foi descartado. Os astrócitos, aderidos, foram lavados duas vezes com PBS estéril aquecido e em seguida foram removidos enzimaticamente com tripsina/EDTA 0,05% por 10 a 20 minutos a 37 °C. Após centrifugação por 5 minutos a 2000 RPM em temperatura ambiente, os astrócitos foram ressuspensos em meio DMEM, antibióticos P/E 0,5%, 10 % SFB e 2 mM de glutamina e plaqueados em placas de cultura multipoços a uma densidade aproximada de $1,12 \times 10^5$ células/cm². No dia seguinte, o meio foi trocado por meio fresco para a

retirada das células não aderidas e no 18º DIV, o meio foi trocado para DMEM, antibióticos P/E 0,5%, 2 mM de glutamina e 10% de SFB tratado com carvão ativado. No 21º DIV, no 8º dia após separação, as culturas enriquecidas de astrócitos foram submetidas aos nossos protocolos de tratamento descritos a seguir.

Figura 3.2. Esquema experimental da realização da cultura enriquecida de astrócitos.

3.3 Tratamento das células em cultura

3.3.1 Tratamento com Corticosterona seguido por LPS

Para verificar os efeitos do tratamento prévio com CORT na inflamação aguda induzida por LPS, as culturas celulares primárias foram tratadas com veículo (etanol 0,002%) (Sigma) ou CORT 1 μ M (Sigma) por 24 horas em meio DMEM + antibióticos P/E 0,5% + 2% SFB tratado com carvão ativado. Em seguida, o meio foi removido e as células foram tratadas com meio DMEM + antibióticos P/E 0,5% + 2% SFB tratado com carvão ativado, contendo ou não LPS 10 μ g/mL (diluição em água ultrapura estéril) (*Escherichia coli* 0111: B4; Sigma) por 1 hora. Em seguida as células foram submetidas aos ensaios de viabilidade e bioquímicos descritos nos itens a seguir. As culturas enriquecidas de neurônios foram tratadas em meio DMEM + antibióticos P/E 0,5% + 2% B27.

A dose de LPS utilizada LPS (10 μ g/ml) e o tempo de exposição a ele (1 hora) foi escolhido baseado em resultados prévios (Ver Duque, Érica de Almeida. Efeitos dos glicocorticóides na inflamação induzida por LPS em culturas primárias fronto-corticais de ratos neonatos / Érica de Almeida Duque. -- São Paulo, 2013).

Figura 3.3. Esquema experimental de tratamento das culturas primárias com corticosterona seguido de LPS

3.3.2 Tratamento com RU486 (mifepristona)

Para verificar os efeitos do bloqueio dos GR nos efeitos da CORT na inflamação aguda induzida por LPS, utilizamos o antagonista RU486 (mifepristona). Para tanto, as células foram pré-tratadas com veículo (etanol) ou CORT 1 μ M por 24 horas, na presença ou ausência de RU486 (10 μ M, Sigma) em meio DMEM + 2% SFB tratado com carvão ativado. Em seguida, o meio foi removido e as células foram tratadas com meio DMEM + antibióticos P/E 0,5% + 2% SFB tratado com carvão ativado, na presença ou ausência de LPS 10 μ g/mL por 1 hora. A concentração utilizada de RU486 foi baseada nos estudos realizados por Behl et al. (140).

Figura 3.4. Esquema experimental de tratamento das culturas primárias mista com adição de antagonistas de glicocorticoides.

3.3.3 Tratamento com minociclina

Com intuito de verificar a contribuição da microglia nos efeitos observados com tratamento prévio com corticosterona seguida de LPS, utilizamos a minociclina, um antibiótico semissintético derivado da tetraciclina com efeitos anti-inflamatórios não relacionados à ação microbicida, descrita e utilizada para inibir a resposta da microglia frente a um insulto (66, 141). As células foram pré-tratadas com veículo (0,002% etanol) ou CORT 1 μ M por 24 horas, na presença ou ausência de minociclina (10 μ M, Sigma) em meio DMEM + antibióticos P/E 0,5% + 2% SFB tratado com carvão ativado. Em seguida, o meio foi removido e as células foram tratadas com meio DMEM + antibióticos P/E 0,5% + 2% SFB tratado com carvão ativado, na presença ou ausência de LPS 10 μ g/mL por 1 hora. A concentração utilizada de minociclina foi baseada no estudo descrito por Schmitz et al. (142).

Figura 3.5. Esquema experimental de tratamento das culturas primárias mista de neurônios/células da glia com adição de minociclina.

3.4 Imunofluorescência de dupla marcação

Para os ensaios de imunofluorescência, as células ($1,12 \times 10^5$ células/cm²) foram plaqueadas em lamínulas de boro-silicato (Knittel Glass, Braunschweig, Alemanha) recobertas com poli-L-lisina (somente para as culturas mistas e enriquecidas de neurônios) e mantidas em meio apropriado para cada modelo celular. O método utilizado foi baseado naquele descrito por Piccioli et al., (143) com modificações.

Após os tratamentos anteriormente descritos (figuras 3.4, 3.5 e 3.6), as células corticais foram lavadas com PBS e então fixadas com metanol 100% (Labsynth) por 20 minutos à temperatura ambiente. Após sucessivas lavagens com PBS, as mesmas foram incubadas com 40 mM de glicina-PBS (Amresco) por 5 minutos, e novamente lavadas com PBS. Em seguida, as células foram incubadas com soro de bloqueio (5% de soro de jumento + 0,05% Triton X-100 em PBS) (Sigma) durante 2 horas em temperatura ambiente e sob leve agitação. Posteriormente, as células foram incubadas com anticorpos primários (descritos a seguir) diluídos em soro de bloqueio e deixadas por 12 a 16 horas a 4 °C ao abrigo da luz. A seguir, as células foram lavadas com PBS (3 vezes por 10 minutos) e incubadas durante 2 horas à temperatura ambiente, ao abrigo da luz, com anticorpo secundário (AlexaFluor 594; AlexaFluor 488; 1:2000, Invitrogen) diluído em PBS + 0,05% Triton X-100, exceto para as células incubadas com lectina-FITC. Finalmente, as lamínulas foram incubadas por 20 minutos a temperatura ambiente com DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, Sigma) (1:100000, diluído em PBS + 0,05% Triton X-100), e após várias lavagens com PBS, foram montadas em lâminas de vidro (Knittel) utilizando Fluoromount-G como meio de montagem (Invitrogen). As lamínulas foram seladas utilizando esmalte incolor.

Os neurônios corticais frontais foram marcados com o anticorpo contra proteína associada à microtúbulos 2 (anti-MAP2, 1:1000, Sigma). Os astrócitos foram marcados contra GFAP, uma proteína do filamento intermediário, restrita aos astrócitos, com o anticorpo anti-GFAP (1:2000, Sigma). A microglia foi marcada com lectina de tomate (Lectina de *Lycopersicon esculentum* (tomate)-FITC conjugada, 1:3000, Sigma) ou com o anticorpo

anti-IBA1 (1:1000, Sigma). Ainda, foi utilizado anticorpo específico para a subunidade proteica RELA (p65) do fator de transcrição NFkB (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EUA).

Para a caracterização do nosso modelo experimental, além da composição fenotípica, células não tratadas, mas submetidas aos mesmos meios de cultura e às mesmas quantidades de trocas que as células tratadas, foram submetidas ao ensaio de imunofluorescência para caracterização da presença dos receptores Toll-like 4 (TLR4, 1:500, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EUA), glicocorticoides (GR, 1:1000, Santa Cruz), mineralocorticoides (MR, 1:100, Santa Cruz), NLRP3 (componente do inflamassoma) (NLRP3, 1:1000, Cell Signaling); como também da presença dos canais de Conexina 43 (CX43, 1:1000, Cell Signaling).

As células provenientes desses ensaios foram observadas com auxílio de microscópio de fluorescência Nikon Eclipse 80i (Nikon Instruments Inc., NY, EUA). As imagens foram capturadas pela Nikon Digital Camera DXM 1200C e analisadas pelo software de Imagem NIS-Elements Advanced Research 2.30 (Nikon Instruments). Para cada tratamento, foram fotografados dez campos visuais por lâmina (no total de trinta fotos) escolhidos randomicamente, no aumento de 40X. Os ensaios foram realizados em pelo menos três culturas independentes.

As células foram contadas com o auxílio do programa ImageJ (Image Processing and Analysis in Java, NIH, MD, EUA). Para caracterização dos receptores e hemicanais, as células foram fotografadas com aumento de 100x, utilizando óleo de imersão.

Para os experimentos onde houve tratamento das células (RU486, minociclina, CORT e/ou LPS), foi considerada a porcentagem de células positivas para o fenótipo celular alvo e foi calculada a razão entre a média do número total de núcleos celulares apresentando a proteína RELA (“positivos”) e a média do número de células apresentando seus respectivos anticorpos, como exemplificado na figura 3.6.

Figura 3.6. Esquema representativo do padrão de contagem dos núcleos celulares

Esquema representativo do padrão de contagem dos núcleos celulares. Imagens representativas ilustrando padrão de contagem dos núcleos com localização nuclear de RELA (positivos) e sem localização nuclear de RELA (negativos). As setas exemplificam os núcleos celulares. Recorte amplificado das fotomicrografias realizadas neste projeto.

3.5 Ensaio do Retardamento da Mobilidade Eletroforética em Gel de Poliacrilamida (EMSA)

Para os ensaios de EMSA, as células ($1,12 \times 10^5$ células/cm²), após os tratamentos, foram coletadas em PBS (solução salina balanceada) gelado acrescido de inibidores de proteases e fosfatases (*Halt Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail Single-Use, EDTA-free* (100X) (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EUA) e 0,5 mM PMSF (Amresco) e centrifugadas a 10.000 rpm por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspenso em tampão de lise (10 mM HEPES; 1,5 mM MgCl₂; 10 mM KCl; 10 µl/mL Cocktail inibidor de proteases e fosfatases 0,5 mM PMSF 0,1 mM EDTA) (Amresco) e incubado em gelo durante 15 minutos. Foi adicionado em seguida 10 µL de NP-40 (Sigma) a 5% com agitação vigorosa, centrifugando-se a 13.000 x g por 30 segundos a 4 °C. O sobrenadante, considerado a fração citosólica, foi coletado em outro tubo e armazenado em -80 °C. Em seguida o pellet foi ressuspenso em tampão de extração nuclear (20 mM HEPES; 1,5 mM MgCl₂; 10 µl/mL Cocktail inibidor de proteases; 0,5 mM PMSF, 0,25 mM EDTA, 25% glicerol e água) (Labsynth;Amresco) e incubado com agitação por 20 minutos em gelo, centrifugando-se a 13.000 x g por 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante, contendo a fração nuclear, foi coletado em outro tubo e armazenado em -80 °C para dosagem de proteína. Esta por sua vez foi realizada através do método de Bradford (144), utilizando reagentes Quick StartTM Bradford 1x Dye Reagent e Quick StartTM Bovine Serum Albumin (BSA) Standard (Bio-Rad Laboratories Hercules, CA, EUA) e subsequente medição da absorbância no comprimento de onda de 595 nm no equipamento *Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader* (BioTek, Winooski, Vt, EUA). A comparação com uma curva padrão de albumina (Bio-Rad) forneceu a concentração de proteínas presente nas amostras.

3.5.1 *Marcação da Sonda, Reação de Ligação e Corrida do gel*

Todos os reagentes utilizados foram provenientes da empresa Promega (Madison, WI, EUA), exceto quando especificado o fabricante. O oligonucleotídeo de DNA contendo a sequência consenso para o fatores de transcrição NFkB (5' - AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C - 3') foi marcado com a adição de γ -32P-ATP numa solução contendo Tampão T4 quinase, T4 quinase e água, nas concentrações de: 3,5 pmol de oligonucleotídeo, 1 U/ μ L de T4 quinase, 1 μ L de γ -32P-ATP (3 Ci/mmol), 1 μ L de tampão T4 Kinase Buffer (10 X) em 10 μ L de volume de reação. Após incubação à 37 °C por 10 minutos, o excesso de γ -32P-ATP foi retirado com resina Sephadex G-25. As colunas (Microspin G-25) foram colocadas em um tubo de micro centrífuga e submetidos à centrifugação a 3000 RPM por 1 minuto. A coluna foi então transferida para um novo tubo e todo o volume da sonda marcada foi aplicado no centro da resina. Após centrifugação, o eluato contendo a sonda foi recolhido, e no dia do ensaio, a atividade da sonda foi determinada. No ensaio, foi utilizado sonda com atividade de 25000 cpm/ μ L.

A um tubo de microcentrífuga foram adicionados: 4 μ L de tampão de ligação 5X (MgCl₂ 5 mM; EDTA 2,5 mM; DTT 2,5 mM; NaCl 300 mM; Tris-HCl 50 mM pH 7,5; Poly-dIdC 0,25 μ g/ μ L; glicerol 20%) (Sigma); extrato nuclear em quantidade suficiente para 2 μ g de proteína para as culturas mistas e água milliQ. A reação ocorreu por 20 minutos à temperatura ambiente. Após esse tempo, os tubos contendo o meio de reação foram colocados em gelo e 1 μ L da sonda marcada (25.000 cpm) foi adicionado. A reação ocorreu por 30 minutos em temperatura ambiente. A corrida foi visualizada pela adição de 1 μ L de Azul de Bromofenol ao controle negativo, sem o extrato nuclear. Após esse tempo, o conteúdo total do meio de reação foi aplicado no gel de poliacrilamida 5,5% [acrilamida/bisacrilamida (37,5:1)] e submetido à eletroforese por 2 horas a 150- V em tampão de corrida 0,5 x TBE (1 X TBE = Tris 90 mM, Ácido Bórico 90 mM, EDTA 1 mM) (Labsynth; Sigma). Ao final da corrida, o gel foi secado à vácuo em 80 °C por aproximadamente 2h e exposto ao filme radiográfico (Medix). A exposição ocorreu por 2 a 7 dias, a -80 °C.

3.5.2 *Revelação e Análise*

Os filmes foram revelados em sala escura em máquina de revelação automática Hyper Processor (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EUA). As imagens foram fotocopiadas digitalmente em resolução 600 dpi e a densidade óptica das bandas foi analisada com auxílio

do programa *Image J*. Os dados de densidade óptica foram normalizados como percentagem dos grupos controles e os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média.

3.6 Western Blotting

A preparação das amostras de células foi baseada no protocolo descrito por Feinstein et al. (145). As células foram coletadas em PBS gelado acrescido de inibidores de proteases e fosfatases (Thermo Scientific) e centrifugadas a 2.000 g por 5 minutos a 4°C e congelados a -80 °C. A extração do conteúdo citosólico e nuclear foi realizada do mesmo modo como descrito para o EMSA.

Para lise total celular, utilizamos o tampão RIPA (Tris-HCl 50mM, NaCl 150mM, EDTA 1mM, Deoxicolato de sódio 0,25%, NP-40 1%) acrescido de 10 µl/ml do cocktail de inibidores de proteases e fosfatases e 0,5 mM PMSF. As células foram lisadas com ajuda de um rodinho e centrifugadas por 5 min a 12000 x g a 4°C. O sobrenadante foi transferido e foi dosado proteína pelo mesmo método de Bradford (144).

O ensaio de *Western blot* utilizado foi baseado no descrito por Laemmli (1970). As proteínas foram ajustadas para concentrações de 0,5 ou 1 µg/µl em tampão de amostra 2x Laemmli Sample Buffer (BioRad) e fervidas por 5 minutos a 95°C. O conteúdo total do meio de reação foi aplicado no gel de SDS-poliacrilamida 10% (acrilamida/bisacrilamida (37,5:1), 10 % SDS) (Amresco) para que ocorresse a separação das proteínas contidas na amostra. No mesmo gel foi adicionado um padrão de peso molecular (Precision Plus Protein™ Dual Color Standards BioRad). Para a eletroforese, foi utilizado um tampão de corrida consistindo em 25 mM de Tris-base (Amresco), 0,192 M de glicina e 0,1 % de SDS. O gel foi submetido à eletroforese por aproximadamente 2 horas a 90 V. Ao final da corrida, as proteínas separadas e contidas no gel foram transferidas eletroforéticamente para uma membrana de nitrocelulose (BioRad) ou PVDF (Millipore, Burlington, MA, EUA) por 2 horas a 400 mA. Para a transferência foi utilizado um tampão contendo 25 mM de tris-base, 192 mM de glicina, 20 % de metanol e água bidestilada. Após a transferência, as membranas foram coradas com solução de vermelho de Ponceau (0,5% Ponceau-S; 5% ácido tricloro acético e água bidestilada) (Amresco) para confirmar se a mesma quantidade de proteína foi carregada (REF), em seguida, as membranas foram lavadas com água até tirar todo o excesso da solução corante. As membranas foram deixadas por 2h à temperatura ambiente em uma solução contendo TBS (100 mM tris-base; 0,9 % NaCl), 5 % de leite desnatado ou BSA (soro

albumina bovina, Amresco) e 0,1 % de tween 20 (LabSynth) para bloquear ligações inespecíficas com o anticorpo. Após essa etapa, as membranas foram incubadas com os seguintes anticorpos primários diluído em solução de bloqueio “overnight” a 4°C: Cx43 (1:1000, Santa Cruz), CX3CL1 (1:2000, Abcam), CX3CR1 (1:500, Santa Cruz), CD200 (1:2000, Abcam), CD200R (1:500, Santa Cruz), HMGB1 (1:2000, Abcam), Gapdh (1:10000, controle interno, Santa Cruz) e β -actina (1:40000, controle interno, AbCam). As membranas foram lavadas 3 vezes com TBS-T (TBS; 0,1 % Tween 20) e incubadas com o anticorpo secundário (1:2000 a 1:40000) por 2 horas sob agitação à temperatura ambiente. Após sucessivas lavagens com TBS-T, as proteínas reconhecidas pelos anticorpos foram reveladas pelo reagente Luminata™ (Millipore) e analisadas quantitativamente através da análise de densidade óptica utilizando sistema de detecção ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad) e o software Image Lab (Bio-Rad).

3.6.1 Proteínas do sobrenadante (meio de cultura)

Para análise das proteínas secretadas no meio extracelular pelas células em cultura, realizamos a precipitação mesmas de acordo com o protocolo de precipitação por metanol/clorofórmio descrito por (146).

Após os tratamentos descritos anteriormente, os sobrenadantes das culturas celulares foram coletados e precipitados pela adição de igual volume de metanol e 0,25 vezes o volume de clorofórmio (LabSynth). A mistura sobrenadante/ metanol/ clorofórmio foi “vortexada” e centrifugada durante 10 minutos a 20000 x g. A fase superior que corresponde ao meio de cultura de coloração rosa foi descartada e foi adicionado à interfase 500 μ l de metanol. A mistura foi novamente centrifugada 10 minutos a 20000 x g e o pellet de proteína foi completamente seco a 55-60°C para eliminação dos solventes. O pellet foi então ressuspendido diretamente em tampão de amostra Laemmli 1x e fervido durante 5 minutos à 99°C.

As amostras foram separadas em gel SDS-PAGE de 12,5% acrilamida/bis-acrilamida e foram transferidos (30 minutos a 400mA) para membranas de nitrocelulose. Para o *immunoblotting* utilizamos o mesmo procedimento descrito acima no item 3.6, com os seguintes anticorpos primários: Caspase 1 (1:1000, Cell Signalling), TGF β 1 (1:500, Santa Cruz) e IL1 β (1:1000, Cell Signalling).

Para controle do método, além de plaquearmos sempre a mesma quantidade de células por poço, utilizamos para tratamento das células sempre o mesmo volume de meio de cultura: 1,5 ml / poço em placa de 6 poços no tratamento de 24 horas e 1ml/ poço em placa de 6 poços no tratamento de hora. Também ressuspendemos o pellet do precipitado proteico em um volume de 150 μ l/ poço de tampão de amostra 1x.

3.7 Imunoprecipitação do Receptor Glicocorticoide

Para análise da formação de complexos proteicos com o GR, utilizamos o protocolo de imunoprecipitação para este receptor baseado em (147), com modificações.

Após os tratamentos descritos anteriormente, as células em cultura foram lisadas em tampão não denaturante (Tris-HCl 20mM, NaCl 137mM, Glicerol 10%, NP-40 1%, EDTA 2mM) (Amresco;LabSynth) acrescido de 10 μ l/ml do cocktail de inibidor de proteases e fosfatases (*Halt™ Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail*, Thermo) e 0,5 mM PMSF. O conteúdo do lisado celular foi centrifugado por 5 minutos, 2000 x g a 4°C e o sobrenadante transferido novo tubo. A quantidade de proteína no sobrenadante foi dosada de igual modo ao descrito no item 3.5 pelo método de Bradford (144). À uma quantidade correspondente a 200 μ g de proteína foi adicionado 1 μ l do anticorpo anti-GR (sc-1004x, Santa Cruz) e incubado sob leve agitação em geladeira por 12 a 16 horas. Em seguida, foram adicionados 20 μ l de proteína A/G agarose (*Pierce® Protein A/G Agarose*, ThermoScientific) e incubados por 3 horas sob leve agitação em geladeira. O complexo anticorpo/receptor GR ligado à proteína A/G agarose foi lavado 6 vezes em PBS 1x gelado através de leve e rápida centrifugação. O complexo foi eluído através da adição de 60 μ l de tampão de amostra Laemmli 2x e posterior agitação por 10 min a 70°C. Para controle negativo do experimento, a 200 μ g de proteína de amostra controle, foram adicionados 20 μ l de proteína A/G agarose, sem adição anterior do anticorpo primário, de igual modo e seguindo o mesmo procedimento realizado para as outras amostras. Por fim, o complexo foi separado em gel SDS-PAGE de 7,5% acrilamida/bis-acrilamida e transferido para membranas de PVDF. Utilizamos o mesmo procedimento de Western blot descrito acima no item 3.6, com os seguintes anticorpos primários: MR (1:2000, Sigma), p65-NFKB (RELA, 1:500, Santa Cruz) e GR (1:500, Santa Cruz). A análise semi-quantitativa de duas bandas que se destacaram entre as quatro bandas reveladas na maioria dos géis analisados (identificadas com 1* e 2* nas

figuras 4.26-28) estão apresentadas ao lado das figuras representativas dos géis. Os resultados foram normalizados em relação ao grupo ETOH (100%).

3.8 Ensaios de Viabilidade Celular

3.8.1 LDH – Lactato Desidrogenase

A viabilidade celular foi analisada utilizando o ensaio CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega), seguindo-se as recomendações do fabricante. Este ensaio colorimétrico permite a quantificação de morte/lise celular, baseado na mensuração da atividade da lactato desidrogenase (LDH) liberada do citosol de células com a membrana danificada para o sobrenadante, através da conversão do lactato em piruvato na presença de NAD⁺. Um poço controle é totalmente lisado com uma solução de lise, fornecida pelo kit, adicionada 45 minutos antes de cada tempo de exposição ao tratamento descrito anteriormente (ver item 3.3). Após os tempos de exposição, uma alíquota de 50 µL foi retirada de cada poço e transferida para uma placa de 96 poços, onde foi adicionado o substrato do kit e a leitura foi realizada após 30 minutos. Para a análise de absorbância foi utilizado o equipamento Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader (BioTek). A viabilidade celular foi calculada como percentagem dos poços totalmente lisados (100% de morte) e os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média.

3.8.2 Laranja de Acridina e Iodeto de Propídeo

A viabilidade celular também foi analisada utilizando o ensaio de laranja de acridina (AO, do inglês *acridine orange*) e iodeto de propídeo (PI) baseado nos protocolos descrito por (148-150). A AO pode cruzar a membrana plasmática de células viáveis e não viáveis, enquanto que o PI, somente ganha acesso aos compartimentos intracelulares quando as células perderam a integridade da membrana plasmática. O PI se intercala com os ácidos nucleicos, tornando o núcleo altamente fluorescente no espectro vermelho (151).

A AO é um corante metacromático que diferencia entre ácidos nucleicos de cadeia dupla (ds) e de cadeia simples (ss). Quando a AO se intercala em dsDNA emite fluorescência no espectro verde, e quando se intercala ssDNA ou RNA, emite fluorescência no espectro vermelho. Na microscopia de fluorescência, as células viáveis aparecem com núcleo e citoplasma verdes, com estrutura intacta, enquanto células apoptóticas, exibem um núcleo verde brilhante mostrando a condensação da cromatina como áreas verdes densas ou laranjas. Em resumo, o ensaio de coloração com AO/PI nos permite classificar as células em

diferentes estágios de morte celular: 1) células vivas, com núcleo e citoplasma verdes claros; 2) células apoptóticas precoces, que possuem núcleos verdes brilhantes com cromatina condensada ou fragmentada; 3) células apoptóticas tardias, que exibem cromatina laranja condensada e fragmentada e; 4) células necróticas, que exibem núcleo vermelho intenso devido principalmente a entrada de PI nas células.

Para a verificação da viabilidade celular, ambos os fenótipos de cultura foram plaqueados em placas de 96 poços, e 10 minutos antes do final dos tratamentos descritos anteriormente (ver item 3.3), foi adicionado AO em uma concentração final de 10 μ M e PI em uma concentração final de 10 μ g/ml. Imediatamente após, as células foram fotografadas no microscópio In Cell Analyzer 2200 (GE Life Sciences, Chicago, IL, EUA), randomicamente em 5 campos por poço, em aumento de 40X. Todos os tratamentos foram realizados em duplicata. Para análise dos resultados, calculamos a porcentagem de células mortas por necrose, apoptose (precoce e tardia) e total (necrose + apoptose) em relação ao número total de células por campo analisado (número total de células por campo = 100%).

3.9 PCR em tempo real

3.9.1 Isolamento e purificação do RNA

O RNA mensageiro foi extraído através da adição do reagente Trizol® (Invitrogen) diretamente na placa de cultura e transferido para tubo de 1,5ml, cerca de 400 μ l de Trizol® por cada poço contendo 1×10^6 células. A purificação do RNA foi realizada de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante. Resumidamente, cada amostra foi incubada por 3 minutos com 80 μ l de clorofórmio (Sigma) após vigorosa agitação e posterior centrifugação por 15 minutos, 12000 x g a 4°C. A fase aquosa foi transferida para outro tubo, e foi adicionado 10 μ g de glicogênio (BioRad) para melhorar a quantidade de RNA precipitado devido à pequena quantidade de amostra. À fase aquosa, foi adicionado 200 μ l de isopropanol (Sigma) e incubado por 10 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos, 12000 x g a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet de RNA foi ressuspensionado em 400 μ l de 75% etanol (Sigma). Após vortexar e centrifugar por 5 minutos, 7500 x g a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o mesmo procedimento foi realizado mais uma vez. O pellet foi seco ao ar livre por 10 minutos e ressuspensionado em 20 μ l de água DEPC (Amresco). Somente as amostras com RNA com razão $A_{260/280}$ maior que 1.6 foram posteriormente utilizadas para síntese de DNA.

Síntese de cDNA

Todos os reagentes utilizados nesta etapa são provenientes da empresa Promega, exceto quando especificado o fabricante.

Em um microtubo apropriado de 200µl (Axygen, Corning, NY, EUA), foram adicionados mix RT contendo 1 µl de inibidor de RNase, 1 µl de DNase I, 5 µl de RT *buffer M-MLV*, 1 µl de OligoDT (20) 100pmol/µl (Exxtend, Campinas, SP, Brasil) 1 µl de dNTPs 10mM, 2 µg do RNA purificado e quantidade suficiente de água DEPC (Amresco) para completar 19 µl. As amostras foram levadas ao termociclador (Life Eco TC-96, Bioer, Hangzhou, China) para inativar a DNase com o seguinte programa: 10 minutos a 37°C, seguido de 5 minutos a 75°C e 2 minutos a 37°C. No próprio termociclador, foi adicionado 1 µl de enzima transcriptase reversa *M-MLV Reverse Transcriptase* (200u/µl). A síntese ocorreu com o seguinte programa do termociclador: 1 hora a 37°C, seguidos de 15 minutos a 75°C, 2 minutos a 37°C e 15 minutos a 4°C. O DNA complementar foi armazenado em freezer -20°C até o ensaio de PCR em tempo real.

3.9.2 Corrida PCR em tempo real

Em microtubo apropriado de 200µl, sempre em gelo, foram adicionados concentrações apropriadas dos primers *forward* e *reverse* de cada gene a ser analisado (ver tabela 3.2), 1 µl do cDNA em concentração apropriada, 7,5 a 10µl de master mix SYBR® Green (SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix, BioRad) e quantidade suficiente para 15 ou 20 µl de reação de água DEPC. A corrida foi realizada no equipamento Rotor-Gene Qiagen 2 Plex (QIAGEN, Hilden, Alemanha) com as configurações apresentadas na Tabela 3.1.

Tabela 3.1. Configurações da corrida de PCR em tempo real.

		Tempo	Temperatura
Amplificação (40-45 ciclos)	Ativação da polimerase e denaturação do DNA	30 segundos	95°C
	Denaturação	15 segundos	95°C
	Anelamento/ extensão	30 segundos	60°C
Análise da curva de <i>melting</i>		65-95°C, com incrementos de 0,5°C a cada 5 segundos	

Uma curva padrão do cDNA, utilizando ao mínimo 3 concentrações diferentes (1:2, 1:5 e 1:10) foi realizada para cada gene e com base nesta curva foi calculada o *threshold* de cada, através do programa Rotor-Gene Q Series Software versão 2.3.1 (Qiagen). As amostras foram corridas em duplicata. O Ct resultante de cada amostra com base no *threshold* de cada gene foi plotado no software Excel® (Microsoft®) para obtenção dos resultados utilizando o método $2^{-\Delta \Delta C_T}$ e transformados para o número de vezes de aumento ou diminuição de expressão (*Fold change*) do gene em relação ao grupo controle (veículo etanol).

Tabela 3.2. Sequência de *primers* utilizada

Gene	Sequência do Primer: 5'→3'
Il6	F.:TGTTCTCAGGCAGATCTTGGA
	R.:ACAGTGCATCATCGCTGTTC
Tgfb1	F.:TGCTTCAGCTCCACAGAGAA
	R.:ACTTCCAACCCAGGTCCTTC
Tnf	F.:AAATGGGCTCCCTCTCATCAGTTC
	R.:TCTGCTTGGTGGTTTGCTACGAC
Nr3c1	F.:GAAAAGCCATCGTCAAAGGG
	R.:TGGAAGCAGTAGGTAAGGAGA
Casp1	F.:ATGCCGTGGAGAGAAACAAG
	R.:CCAGGACACATTATCTGGTG
Il1b	F.:CACCTCTCAAGCAGAGCACAG
	R.:GGGTTCCATGGTGAAGTCAAC
Fkbp5	F.:ATGTACTTGCCTCCCTTGAAG
	R.:GAACCCAATGCTGAGCTTATG
Gilz	F.:CAGGCCATGGATCTAGTGAA
	R.:AGCGTCTTCAGGAGCGTATT
Il1ra	F.:CAAGCTGTGCCTGTCTTGTGTCAA
	R.:ACCATCCTGGACAGGCAAGTGATT
Il10	F.:AAGGACCAGCTGGACAACAT
	R.:CTGGGGCATCACTTCTACCA

Gapdh	F.:GTATTGGGCCCGCCTGGTCACC
	R.:CGCTCCTGGAAGATGGTGATGG
Hsd11b1	F.: GGAGCCCATGTGGTATTGACTG
	R.: CTGCAAAAGCCATGTCTTCCAT

3.10 Análise dos resultados

Todos os grupos experimentais e controles foram submetidos a análise estatística aplicando o módulo Modelo linear generalizado traduzido do inglês *Generalized Linear Model* (GzLM). O GZLM é uma extensão do modelo linear generalizado que combina aspectos de ANOVA e modelos de regressão (152). Distribuição linear ou gama para dados contínuos foram escolhidas com base no critério de informação de Akaike (AIC) (153). Múltiplas comparações entre grupos foram realizadas e os erros ajustados por meio do pós-teste de Bonferroni, quando apropriado. Os resultados foram considerados como estatisticamente significativos para valores $p < 0,05$. Para estes parâmetros estatísticos utilizamos o programa SPSS Statistics V.21 (SPSS, IBM Inc., Chicago, EUA).

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização do Fenótipo de Culturas Primárias Mistas derivadas de Córtex Frontal de Ratos Neonatos Wistar

Pelo ensaio de imunofluorescência de dupla marcação, caracterizamos o fenótipo do nosso modelo de cultura primária mista de neurônios/células da glia derivadas do córtex frontal de ratos Wistar neonatos.

Observamos que as culturas obtidas eram compostas por $74.5 \pm 1.6\%$ de astrócitos, $10.3 \pm 0.7\%$ de microglia e $10.4 \pm 1\%$ de neurônios (figuras 4.1 e 4.2).

Figura 4.1 Composição celular de culturas primárias mistas derivadas do córtex frontal de ratos Wistar neonatos.

Resultados expressos em porcentagem de células imunorreativas para cada tipo celular (GFAP-astrócitos, Lect-FITC – microglia, MAP2 – neurônios) sobre o total de células marcadas com DAPI por campo $\pm$ erro padrão da média. Mínimos de 10 campos visuais por lâmina de quatro experimentos independentes foram analisados.

A cultura enriquecida de neurônios, caracterizada durante meu mestrado, foi composta por $75,47 \pm 2,79\%$ de neurônios; $8,04 \pm 0,51\%$ de microglia e $15,77 \pm 0,43\%$ de astrócitos (Ver Duque, Érica de Almeida. Efeitos dos glicocorticóides na inflamação induzida por LPS em culturas primárias fronto-corticais de ratos neonatos / Érica de Almeida Duque. -- São Paulo, 2013).

Figura 4.2. Fotomicrografias ilustrando a composição celular da cultura primária mista derivada do córtex frontal de ratos Wistar neonatos

Imunofluorescência realizada com anticorpos anti-GFAP (astrócitos), anti-MAP2 (neurônios), lectina de tomate-FITC (microglia) e DAPI (marcador nuclear). As cores das marcações utilizadas estão indicadas na figura. Escala = 100 μ m.

4.2 *Caracterização de Culturas enriquecidas de Astrócitos derivadas de Córtex Frontal de Ratos Neonatos Wistar*

Nas culturas enriquecidas de astrócitos, obtidas conforme descrito no item Materiais e Métodos 3.4, em todas as lâminas analisadas não observamos células MAP2 positivas, indicando a ausência de células neuronais em cultura, neste modelo e nestas condições experimentais. Na figura 4.3, observamos que este processo de separação por agitação no 14º DIV, seguida de tripsinização, resultou em uma composição celular de $94.9 \pm 1\%$ de astrócitos e $5 \pm 1\%$ de microglia.

Figura 4.3. Composição celular de cultura primária enriquecida de astrócitos derivada do córtex frontal de ratos Wistar neonatos.

Caracterização da composição celular resultante da separação por agitação das culturas primárias mistas derivadas de córtex frontal de ratos Wistar neonatos no 14^º DIV. (A) Imunofluorescência realizada com anticorpos anti-GFAP (astrócitos), lectina de tomate-FITC (microglia) e DAPI (marcador nuclear). As cores das marcações utilizadas estão indicadas na figura. Escala = 100 μ m. (B) Resultados expressos em número de células imunorreativas (% do total marcado com DAPI) $\pm$ erro padrão da média de 4 experimentos independentes. A seta indica a microglia.

4.3 Presença dos Receptores GR, MR, NLRP3, TLR4 e Proteínas das Junções tipo GAP (Conexina 43) em Astrócitos de Culturas Primárias Mistas derivadas de Córtex Frontal de Ratos Neonatos Wistar

Além da caracterização dos fenótipos das culturas, verificamos a presença dos receptores relacionados aos tratamentos utilizados, como os receptores de glicocorticoides (GR), os receptores de mineralocorticoides (MR), relacionados à resposta a corticosterona (figura 4.4) e os receptores responsáveis pela resposta ao LPS, os TLR4 (*toll like receptor 4* – figura 4.5). Nossas células alvo para caracterização destes receptores foram os astrócitos devido aos resultados anteriores obtidos em meu mestrado, sugerindo que os astrócitos eram as células alvo da ação dos GCs.

Como mostram as figuras abaixo, observamos que o GR de astrócitos em condições basais de cultivo, sem exposição a nenhum tipo de tratamento, está localizado na região nuclear dessas células. Entretanto é necessária a avaliação por microscopia confocal para estabelecermos a localização precisa, se no interior do núcleo ou no envoltório nuclear (figura 4.4A) deste receptor. Já o MR está presente difusamente por toda célula (figura 4.4B).

Figura 4.4. Presença dos receptores GR e MR em astrócitos de cultura primária mista derivada do córtex frontal de ratos Wistar neonatos

Fotomicrografias ilustrando presença de GR e MR em astrócitos de cultura primária mista derivada do córtex frontal de ratos Wistar neonatos. Imunofluorescência realizada com anticorpos anti-GFAP (astrócitos), anti-GR (Receptores de Glicocorticoides) (A), anti-MR (mineralocorticoides) (B) e DAPI (marcador nuclear). As cores das marcações utilizadas estão indicadas na figura. As setas indicam a localização do GR que coincide com a marcação nuclear. Escala = 50 μ m.

Observamos que os TLR4 também estão difusamente presentes nos astrócitos em nosso modelo de cultura mista de neurônios/células da glia (figura 4.5).

Também verificamos a presença do receptor intracelular NLRP3, componente do inflamassoma. Como podemos observar na figura 4.6, o NLRP3 está presente em astrócitos, em sua maior concentração na região do núcleo. Nesta figura, ainda podemos observar uma grande marcação para o NLRP3 em células não marcadas pelo anticorpo anti-GFAP (figura 4.6, setas), sugestivas de serem microglia.

Figura 4.5. Presença do receptor TLR4 em astrócitos de cultura primária mista derivada do córtex frontal de ratos Wistar neonatos

Fotomicrografias ilustrando presença do receptor TLR4 em astrócitos de cultura primária mista derivada do córtex frontal de ratos Wistar neonatos. Imunofluorescência realizada com anticorpos anti-GFAP (astrócitos), anti-TLR4 e DAPI (marcador nuclear). As cores das marcações utilizadas estão indicadas na figura. Escala = 50 μ m.

Os astrócitos se comunicam através de canais especializados chamados de junções do tipo GAP (GJC). As GJC são compostas pelo acoplamento de dois canais entre duas células adjacentes, cada um composto por seis subunidades de proteínas conexinas (Cx), principalmente Cx 43 e 30. Os glicocorticoides e a inflamação podem modular a função das GJC em astrócitos (131, 154).

Desta maneira, resolvemos avaliar se os astrócitos em cultura expressavam tais proteínas. Podemos observar na figura 4.7, a expressão difusa da proteína Conexina 43 neste tipo celular, com pontos mais densos na periferia e entre dois astrócitos.

Figura 4.6. Presença do receptor NLRP3 em astrócitos de cultura primária mista derivada do córtex frontal de ratos Wistar neonatos

Fotomicrografias ilustrando presença do receptor NLRP3 em astrócitos de cultura primária mista derivada do córtex frontal de ratos Wistar neonatos. Imunofluorescência realizada com anticorpos anti-GFAP (astrócitos), anti-NLRP3 e DAPI (marcador nuclear). As cores das marcações utilizadas estão indicadas na figura. As setas indicam presença de NLRP3 em células não marcadas com GFAP. Escala = 50 μ m.

Figura 4.7. Presença da proteína Conexina 43 em astrócitos de cultura primária mista derivada do córtex frontal de ratos Wistar neonatos

Fotomicrografias ilustrando presença da proteína Conexina 43 em astrócitos de cultura primária mista derivada do córtex frontal de ratos Wistar neonatos. Imunofluorescência realizada com anticorpos anti-GFAP (astrócitos), anti-CX43 e DAPI (marcador nuclear). As cores das marcações utilizadas estão indicadas na figura. As setas indicam área de contato entre astrócitos com marcação mais densa de CX43. Escala = 50 μ m.

4.4 Exposição Prolongada à Corticosterona, na Presença ou Ausência de RU486, Não Induz Morte Celular das Culturas Primárias Corticais

Primeiramente, analisamos se a exposição à CORT por 24 horas, por si só, seria capaz de modificar a viabilidade das células nos três diferentes fenótipos de cultura e se sim, se poderíamos já inferir sobre a participação de cada tipo celular neste fenômeno. Para tanto, a viabilidade celular foi analisada pelo ensaio colorimétrico baseado na liberação de LDH no sobrenadante pelas células mortas.

Na figura 4.8, podemos observar que em nenhum dos três fenótipos de cultura, mista de neurônios/células da glia (4.8.A), enriquecida de neurônios (4.8.B) e enriquecida de astrócitos (4.8C), a exposição à CORT por 24 horas modificou a viabilidade das células em cultura quando comparada ao grupo exposto ao veículo (EtOH).

Figura 4.8. Efeitos da exposição prolongada à corticosterona na viabilidade celular em culturas primárias do córtex frontal

Efeitos da exposição prolongada à CORT (1 μ M – 24 h) na viabilidade celular mensurada pela liberação de LDH no sobrenadante pelas células mortas de culturas mistas de neurônios/células da glia (A), enriquecida de neurônios (B) e enriquecida de astrócitos (C) derivadas de córtex frontal de ratos neonatos Wistar. Resultados expressos em porcentagem do grupo controle lise total (100% de morte) $\pm$ erro padrão da média de 3 (C) a 6 (A, B) experimentos independentes, em quadruplicata.

Em seguida, adicionamos ao tratamento com CORT, o antagonista do receptor GR, a mifepristona ou RU486, para assegurar que o antagonismo deste receptor, na presença ou ausência de CORT, por 24 horas, não induz morte celular nas mesmas condições experimentais, utilizando ensaio que mensura LDH.

Como podemos observar na figura 4.9, também não houve diferenças entre os grupos tratados com CORT (A-14.1 $\pm$ 0.7%, B-7.3 $\pm$ 0.6%, C-27.4 $\pm$ 3.7%) comparados aos respectivos grupos RU (A-16.0 $\pm$ 0.9%, B-7,4 $\pm$ 0.7%, C-18.0 $\pm$ 3.6%), como também estes comparados aos seus respectivos grupos controle ETOH (A-16.2 $\pm$ 1.0%, B-7,8 $\pm$ 0.6%, C-23.4 $\pm$ 2.9%). Ademais, também não houve diferenças

entre os grupos CORT e seus respectivos grupos RU CORT (A-15.2±1.0%, B-8.7±0.9%, C-29.0±4.0%). Logo, a adição do antagonista não modificou a morte celular comparado aos seus respectivos controles, nestas condições experimentais. A comparação entre os fenótipos não pode ser realizada diretamente, pois a suplementação dos meios de cultura é diferente no desenvolvimento e manutenção das mesmas.

Figura 4.9. Efeitos da exposição prolongada ao RU486, na Ausência ou Presença de Corticosterona, na viabilidade celular em culturas primárias do córtex frontal

Efeitos da exposição prolongada ao RU486 (10 μ M-24h), na presença ou ausência de CORT (1 μ M – 24 h) na viabilidade celular mensurada pela liberação de LDH no sobrenadante pelas células mortas de culturas mistas de neurônios/células da glia (A), enriquecida de neurônios (B) e enriquecida de astrócitos (C) derivadas de córtex frontal de ratos neonatos Wistar. Resultados expressos em porcentagem do grupo controle lise total (100% de morte) $\pm$ erro padrão da média de 3 (C) a 6 (A, B) experimentos independentes, em quadruplicata.

4.5 A Exposição prolongada à Corticosterona altera a secreção de Pró-IL-1 β , Caspase 1 (p10) e Tgf β 1 pelas Células em Culturas Primárias Corticais Mistas de Neurônios/Células da Glia

Para verificar se o tratamento prolongado com CORT modificava a secreção de proteínas para o meio extracelular, avaliamos o conteúdo proteico do sobrenadante (meio de cultura) após 24 horas de tratamento com CORT (1 μ M) ou seu veículo.

Pelo ensaio de *western blot*, observamos que a exposição à CORT por 24 horas aumentou a secreção celular das proteínas pró-IL-1 β (134.4±18.5%, $p<0.05$, figura 4.10A) e caspase-1 (p10) (147.5±19.9%, $p<0.001$, figura 4.10B) quando comparado ao grupo controle, tratado com ETOH (100%). Ainda, observamos uma diminuição da proteína anti-inflamatória Tgf β 1 (67.6±10%, $p<0.001$) no meio de cultura das células expostas à CORT quando comparado às células controle (100%, figura 4.10C).

Esses resultados sugerem que o tratamento prolongado com CORT pode promover um estado celular pró-inflamatório. Vale lembrar que, mesmo com o aumento do estado inflamatório, o tratamento com CORT não alterou a viabilidade das células em cultura mista de neurônios/ células da glia, como observamos na figura 4.8.

Figura 4.10. Efeitos da exposição prolongada à CORT na secreção de Pro-IL-1 β , Casp1 e Tgf β 1 em cultura primária Mista de Neurônios/Células da Glia

Efeitos da exposição prolongada à CORT (1 μ M – 24 h) na secreção de pro-il1 β (A), Caspase 1 clivada p10 (B) e TGF β 1 (C) mensurados pelo ensaio de *western blot* das culturas mistas de neurônios/células da glia derivadas de córtex frontal de ratos Wistar neonatos. (Acima) Imagens representativas do ensaio de *western blot*. (Abaixo) Análise densitométrica das bandas indicadas acima. Resultados expressos em porcentagem do grupo controle ETOH (100%) $\pm$ erro padrão da média de 3 (A, B) a 6 (C) experimentos independentes. * $p < 0.05$ e *** $p < 0.001$ vs grupo ETOH (GzLM, seguido de pós-teste Bonferroni).

4.6 Exposição Prévia à Corticosterona Potencializa a Morte Celular Induzida por LPS em Culturas Primárias Mistas de Neurônios/Células da Glia e Enriquecidas de Neurônios, mas não em Enriquecidas de Astrócitos

Utilizando o ensaio colorimétrico baseado na liberação de LDH no sobrenadante pelas células mortas, analisamos a viabilidade celular nos modelos de culturas mistas de neurônios/ células da glia, enriquecida de neurônios e enriquecida de astrócitos após tratamento prévio com CORT (1 μ M-24 h) seguido do tratamento com LPS (10 μ g/ml- 1h).

Como podemos observar na figura 4.11 A, o tratamento com LPS aumentou a morte celular, comparado ao grupo controle, somente nas culturas mistas (LPS-14.9 $\pm$ 1.1% vs ETOH- 7.4 $\pm$ 0.8%, $p < 0.01$). Já a exposição prévia à CORT seguida do tratamento com LPS, além de aumentar a morte celular comparada ao grupo controle (CORT LPS-19.4 $\pm$ 1.9% vs ETOH- 7.4 $\pm$ 0.8%, $p < 0.001$), potencializou a morte celular induzida por LPS (CORT LPS- 19.4 $\pm$ 1.9% vs LPS- 14.9 $\pm$ 1.1%, $p < 0.05$) (figura 4.11A).

Diferente do observado nas culturas mistas, nas culturas enriquecidas de neurônios (figura 4.11B), somente a exposição prévia à CORT seguida do tratamento com LPS aumentou a morte celular comparado ao grupo controle (LPS- $10.4 \pm 1.3\%$ vs ETOH- $4.9 \pm 0.6\%$, $p < 0.001$)).

Também podemos observar uma tendência de aumento na morte celular induzida por LPS nas culturas enriquecidas de astrócitos comparado ao grupo controle (LPS- $14.4 \pm 1.9\%$ e ETOH- $8.7 \pm 0.9\%$, $p = 0.053$) (figura 4.11B), que diminui quando há o tratamento prévio com CORT, sugerindo um efeito anti-inflamatório neste fenótipo de cultura.

Figura 4.11. Efeitos da exposição prévia à corticosterona seguido do tratamento com LPS na viabilidade celular das culturas primárias do córtex frontal

Efeitos da exposição prévia à CORT ($1 \mu\text{M}$ – 24 h) seguido do tratamento com LPS ($10 \mu\text{g/ml}$) por 1 hora sobre a viabilidade celular mensurada pela liberação de LDH no sobrenadante pelas células mortas de culturas mistas de neurônios/células da glia (A), enriquecida de neurônios (B) e enriquecida de astrócitos (C) derivadas do córtex frontal de ratos Wistar neonatos. Resultados expressos em porcentagem do grupo controle lise total (100% de morte) $\pm$ erro padrão da média de 3 (C) a 6 (A, B) experimentos independentes em duplicata. ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$ vs grupo ETOH; # $p < 0.05$ vs grupo LPS (GzLM, seguido de pós-teste Bonferroni).

4.7 Principal Tipo de Morte Celular induzida pela Exposição Prévia à Corticosterona muda de Apoptose para Necrose após Tratamento com LPS nas Culturas Primárias Mistas de Neurônios/Células da Glia, mas não em Enriquecidas de Astrócitos.

Com o intuito de analisar o tipo de morte celular induzida pela exposição prévia à CORT ($1 \mu\text{M}$ -24 h) seguido do tratamento com LPS ($10 \mu\text{g/ml}$ - 1h) observadas no item anterior (fig.4.12), realizamos o ensaio com laranja de acridina (AO) e iodeto de propídeo (PI).

Ao analisarmos as figuras 4.12 e 4.13, observamos que a alteração do microambiente celular, seja pela presença de CORT, pela exposição ao LPS ou pela combinação dos dois estímulos, diminuiu a viabilidade das células quando comparado ao grupo controle (ETOH- $16.0 \pm 1.5\%$) nas culturas mistas de neurônios/ células da glia (CORT- $22.9 \pm 1.7\%$; LPS- $23.8 \pm 2.5\%$ e CORT LPS-

29.2±2.0%, $p<0.5$, $p<0.01$ e $p<0.001$, respectivamente, figuras 4.12A-D e 4.13.A). Entretanto, ao analisarmos os tipos de morte celular, apoptose ou necrose, observamos que a exposição à CORT em um ambiente basal, sem tratamento, induz a morte celular por apoptose (ETOH-9.4±1.2% vs CORT-15.7±1.5%, $p<0.05$, figura 4.13B), enquanto em um ambiente inflamatório, induzido pelo tratamento com LPS, a morte celular observada é por necrose (ETOH-6.7±1.2% vs CORT LPS-14.9±1.5%, $p<0.05$, figura 4.13.C) .

Quando analisamos as culturas enriquecidas de astrócitos, observamos que essas células, nessas condições experimentais, são insensíveis aos efeitos da modificação do microambiente, independente dos tipos de tratamento, uma vez que não observamos quaisquer alterações na viabilidade celular em nenhuma das condições testadas (figuras 4.12E-H e 4.13D-F).

Figura 4.12. Tipos de morte celular decorrentes da exposição prévia à CORT seguido do tratamento com LPS nas culturas primárias derivadas do córtex frontal

Fotomicrografias ilustrando o tipo de morte celular decorrentes da exposição prévia à CORT (1 μ M, 24 h) seguida do tratamento com LPS (10 μ g/ml, 1 h) pelo ensaio de AO/PI em culturas primárias mista de neurônios/células da glia (A-D) e enriquecida de astrócitos (E-H) derivadas do córtex frontal de ratos Wistar neonatos. (A e E) Culturas tratadas com etanol, (B e F) Culturas tratadas com CORT (C e G) Culturas tratadas com etanol e LPS e (D e H) Culturas tratadas com CORT e LPS. As setas exemplificam células em necrose e as pontas de seta exemplificam células em apoptose. Escala = 100 μ m

Figura 4.13. Tipos de morte celular decorrentes da exposição prévia à CORT seguida pelo tratamento com LPS nas culturas primárias derivadas do córtex frontal

Tipo de morte celular decorrentes da exposição prévia à CORT (1 μ M, 24 h) seguida do tratamento com LPS (10 μ g/ml, 1 h) mensuradas pelo ensaio de AO/PI em culturas primárias mista de neurônios/células da glia (A-C) e enriquecida de astrócitos (D-F) derivadas do córtex frontal de ratos Wistar neonatos. Resultados expressos em porcentagem do total de células positivas para necrose e apoptose (A e D), somente para apoptose (B e E) e somente para necrose (C e F) sobre o total de células por campo analisado (mínimo de 5 campos por grupo) $\pm$ erro padrão da média de 2 experimentos independentes em duplicata. Cada experimento foi realizado com 3 culturas celulares provenientes de diferentes animais. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$ vs grupo ETOH (GzLM, seguido de pós-teste Bonferroni).

4.8 Exposição Prévia ao RU486, na Presença ou Ausência de CORT, Diminui a Viabilidade Celular das Células em Ambiente Controle Induzida pela Troca de Meio em Culturas Primárias Mistas de Neurônios/Células da Glia e Enriquecidas de Neurônios, mas não em Enriquecidas de Astrócitos

Para investigar se a morte celular observada era dependente de GR, verificamos se a exposição prévia ao RU486 (10 μ M-24h), na presença ou ausência de CORT (1 μ M), seguido do tratamento com LPS (10 μ g/ml-1h), induzia morte celular através ensaio de LDH (figura 4.14) e do ensaio com AO/PI (figuras 4.15 e 4.16).

Nas culturas mistas de neurônios/ células da glia (figura 4.14A), observamos que o tratamento com RU486, por si só, induz morte celular, independentemente da exposição à CORT (RU486-19.9 $\pm$ 1.5% e RU486 CORT-20.1 $\pm$ 2.0%, $p < 0.001$), apenas nos grupos em ambiente controle (sem LPS), comparado aos grupos sem adição de RU486 (ETOH-7.42 $\pm$ 0.85% e CORT-10.4 $\pm$ 1%), sugerindo que em ambiente controle o GR participa de funções para garantir a homeostase e a retirada deste já é citotóxica. Já em ambiente inflamatório induzido por LPS, a adição de RU486 não modifica o aumento da morte celular induzida pelo LPS (RU486 LPS-21.2 $\pm$ 2% vs LPS-14.9 $\pm$ 1.1%) ou pelo exposição prévia à CORT seguido de LPS (RU486 CORT LPS-18.8 $\pm$ 1.9% vs CORT LPS-19.4 $\pm$ 1.9%). Neste último caso, a falta de modulação por GR sugere que ele não participa da morte celular nestas condições experimentais, no qual há presença dos três tipos celulares analisados (figura 4.14A).

O mesmo praticamente ocorre nas culturas enriquecida de neurônios (figura 4.14B), pois novamente em ambiente controle, somente a presença de RU486 aumenta a morte celular (RU486-13.7 $\pm$ 1.8% e RU486 CORT-12.7 $\pm$ 1.5%) comparada ao grupo controle (ETOH-4.6 $\pm$ 0.7%). Esses resultados enfatizam a função essencial do GR nestas células, majoritariamente neurônios neste tipo de cultura, mas que também possui os três tipos celulares. Entretanto em ambiente inflamatório, a adição de RU486 reverteu o aumento de morte celular induzida por LPS no grupo previamente exposto à CORT (CORT LPS-10.4 $\pm$ 1.3% vs RU486 CORT LPS-8.3 $\pm$ 1.3%), mas não teve efeito na morte celular induzida pela exposição ao LPS somente, que não foi diferente do controle. Esses resultados sugerem que, quando em ambiente inflamatório, a retirada de GR pode ser benéfica ou que talvez não participe da morte celular nestas condições experimentais.

Não observamos mudança na morte induzida pelos tratamentos, na presença ou ausência de RU486, nas culturas enriquecida de astrócitos (figura 4.14C), nas quais majoritariamente temos astrócitos sem a presença de neurônios.

Figura 4.14. Efeitos da exposição prévia ao RU486, na presença ou ausência de corticosterona seguido do tratamento com LPS na viabilidade celular das culturas primárias do córtex frontal

Efeitos da exposição prévia ao RU486 (10 μ M – 24 h), na presença ou ausência de CORT (1 μ M) seguido do tratamento com LPS (10 μ g/ml) por 1 hora sobre a viabilidade celular mensurada pela liberação de LDH no sobrenadante pelas células mortas de culturas mistas de neurônios/células da glia (A), enriquecida de neurônios (B) e enriquecida de astrócitos (C) derivadas de córtex frontal de ratos Wistar neonatos. Resultados expressos em porcentagem do grupo controle lise total (100% de morte) $\pm$ erro padrão da média de 3(C) a 6(A,B) experimentos independentes em duplicata. * p <0.05, ** p <0.01 e *** p <0.001 vs. grupo ETOH; #### p <0.001 vs. respectivo grupo indicado (GzLM, seguido de pós-teste Bonferroni).

Do mesmo modo, analisamos a participação dos GR nos diferentes tipos de morte nas culturas mista de neurônios/ células da glia e enriquecida de astrócitos modulados por CORT, LPS e a combinação dos dois tratamentos pelo ensaio AO/PI (figuras 4.15 e 4.16).

Confirmando os resultados obtidos com o ensaio de LDH, nas culturas mista de neurônios/ células da glia, o tratamento com RU486 induziu morte celular, tanto por apoptose (RU486-17.2 $\pm$ 1.7% e RU486 CORT-17.2 $\pm$ 1.8% vs. ETOH-9.3 $\pm$ 1.2%, p <0.001, figura 4.16B) quanto por necrose (RU486-20.9 $\pm$ 1.9% e RU486 CORT-14.2 $\pm$ 1.7% vs. ETOH-6.7 $\pm$ 1.2%, p <0.001, figura 4.16C), e não modificou a apoptose induzida por CORT (15.3 $\pm$ 1.5%) num microambiente basal, sem LPS. Já em um microambiente inflamatório, induzido por LPS, a adição de RU486 ao meio não induziu morte por apoptose e também não alterou a necrose induzida por LPS mesmo na presença de CORT (RU486 CORT LPS- 17.5 $\pm$ 2% vs. CORT LPS-14.9 $\pm$ 1.6%, figura 4.16C).

Já nas culturas enriquecidas de astrócitos, verificamos que a exposição ao RU486 diminuiu a viabilidade dos astrócitos em cultura independente do

microambiente a que essas células foram expostas, basal ou com LPS (figura 4.16D-F), e que a morte celular induzida por RU486 é essencialmente por necrose (RU486- $9.7 \pm 1.3\%$ vs. ETOH- $1.9 \pm 0.5\%$, $p < 0.05$; RU486 CORT- $32.0 \pm 7.1\%$ vs. CORT- $2.4 \pm 0.6\%$, $p < 0.001$; RU486 LPS- $23.7 \pm 5.3\%$ vs. LPS- $2.0 \pm 0.5\%$, $p < 0.001$; RU486 CORT LPS- $11.0 \pm 2.3\%$ vs. CORT LPS- $2.9 \pm 0.9\%$, $p < 0.05$, figura 4.16F).

Entretanto, a participação do GR na viabilidade dos astrócitos é distinta se analisarmos a magnitude da resposta em cada um dos microambientes. Em um microambiente basal, sem LPS, a ausência de GR parece potencializar a morte por necrose induzida por CORT (RU486 CORT vs. RU486, $p < 0.01$), enquanto que em um microambiente inflamatório, na presença de LPS, a ausência deste receptor parece atenuar a morte celular por necrose na presença de CORT (RU486 CORT LPS vs. RU486 LPS, $p < 0.05$, figura 4.16F). Esses dados reforçam a diferença das funções de GR em um ambiente basal e um ambiente inflamatório nestas condições experimentais.

Figura 4.15. Tipos de morte celular decorrentes da exposição prévia ao RU486, na presença ou ausência de CORT, seguido do tratamento com LPS nas culturas primárias derivadas do córtex frontal

Fotomicrografias ilustrando o tipo de morte celular decorrentes da exposição prévia ao RU486 (RU, 10 μ M, 24 h), na presença ou ausência de CORT (1 μ M), seguida do tratamento com LPS (10 μ g/ml, 1 h) pelo ensaio de AO/PI em culturas primárias mista de neurônios/células da glia (A-D) e enriquecida de astrócitos (E-H) derivadas do córtex frontal de ratos Wistar neonatos. (A e E) Culturas tratadas com RU486, (B e F) Culturas tratadas com RU486 e CORT (C e G) Culturas tratadas com RU486 e LPS e (D e H) Culturas tratadas com RU486, CORT e LPS. As setas exemplificam células em necrose e as pontas de seta exemplificam células em apoptose. Escala= 100 μ m.

Figura 4.16. Tipos de morte celular decorrentes da exposição prévia ao RU486, na presença ou ausência de CORT, seguido do tratamento com LPS nas culturas primárias derivadas do córtex frontal

Tipo de morte celular decorrentes da exposição prévia ao RU486 (10 μ M, 24 h), na presença ou ausência de CORT (1 μ M), seguida do tratamento com LPS (10 μ g/ml, 1 h) mensuradas pelo ensaio de AO/PI em culturas primárias mista de neurônios/células da glia (A-C) e enriquecida de astrócitos (D-F) derivadas do córtex frontal de ratos Wistar neonatos. Resultados expressos em porcentagem do total de células positivas para necrose e apoptose (A e D), somente para apoptose (B e E) e somente para necrose (C e F) sobre o total de células por campo analisado (mínimo de 5 campos por grupo) $\pm$ erro padrão da média de 2 experimentos independentes em duplicata. Cada experimento foi realizado com 3 culturas celulares provenientes de diferentes animais. * p <0.05, ** p <0.01 e *** p <0.001 vs grupo ETOH; # p <0.05, ### p <0.01 e ### p <0.001 vs grupo CORT; & p <0.05 e &&& p <0.001 vs respectivo grupo sem RU; § p <0.05, §§ p <0.01 e §§§ p <0.001 vs respectivo grupo indicado (GzLM, seguido de pós-teste Bonferroni).

4.9 Exposição Prévia à Corticosterona Não Modifica Ativação do Fator de Transcrição NFKB Induzida por LPS em Culturas Primárias Corticais Mistas de Neurônios/Células da Glia.

Dados de nosso laboratório mostraram que a CORT nesta concentração (1 μ M) foi capaz de potencializar a ativação do NFKB induzida por LPS (10 μ g/mL, 2 horas) em células de cultura primária mista porém não em culturas enriquecidas de neurônios derivadas de embriões de ratos (125). Assim, decidimos avaliar se o mesmo ocorria em nosso modelo com neonatos após somente 1 hora de exposição ao LPS, tempo em que foi observado redução da viabilidade celular.

Como pode ser observado na figura 4.17, o LPS foi capaz de ativar o fator de transcrição NFKB (LPS-617.2 $\pm$ 200.4%) e a exposição prévia à CORT não foi capaz de alterar essa ativação (CORT LPS-538.0 $\pm$ 175.8%), ou seja, este hormônio não foi capaz de diminuir ou bloquear ativação do NFKB induzida por LPS, um dos mecanismos clássicos pelos quais os glicocorticoides exercem seus efeitos anti-inflamatórios. É importante destacar que somente a exposição à CORT (83.4 $\pm$ 13.6%) não alterou a atividade do NFKB, quando comparados ao grupo controle ETOH (100%) (figura 4.10).

Figura 4.17. Efeitos da exposição prévia à Corticosterona seguido pelo tratamento com LPS na ativação do fator de transcrição NFKB em culturas primárias mistas de neurônios/células da glia

Efeitos da exposição prévia à CORT (1 μ M - 24h) seguido pelo tratamento com LPS (10 μ g/mL - 1 hora) na ativação do fator de transcrição NFKB em culturas primárias mistas de neurônios/células da glia derivadas do córtex frontal de ratos neonatos Wistar. (À esquerda) Imagem representativa dos experimentos de EMSA. (À direita) Análise densitométrica da banda indicada e representada à esquerda. O gráfico representa resultados expressos em porcentagem do controle ETOH (100%) $\pm$ erro padrão da média de 12 experimentos independentes. ***p < 0.001 vs ETOH (GzLM, seguido de pós-teste Bonferroni).

Complementando estes resultados, realizamos o ensaio de *western blot* para RELA (subunidade p65 do NFKB) e verificamos a translocação nuclear desta proteína (razão entre fração nuclear e fração citosólica) como indício de ativação do fator de transcrição NFKB, entretanto não observamos diferenças entre os grupos analisados (figura 4.18).

Figura 4.18. Efeitos da exposição prévia à Corticosterona seguido pelo tratamento com LPS na translocação nuclear do NFKB em culturas primárias mistas de neurônios/células da glia

Efeitos da exposição prévia à CORT (1 μ M - 24h) seguido pelo tratamento com LPS (10 μ g/mL - 1 hora) na translocação da subunidade RELA (p65) do fator de transcrição NFKB em culturas primárias mistas de neurônios/células da glia derivadas do córtex frontal de ratos Wistar neonatos. (À esquerda) Imagem representativa dos experimentos de Western Blot. (À direita) Análise densitométrica normalizada da banda indicada e representada à esquerda. Resultados expressos em unidades arbitrárias da razão entre RELA nuclear e citosólico $\pm$ erro padrão da média de 7 experimentos independentes (GzLM, seguido de pós-teste Bonferroni).

4.10 Efeitos da Exposição Prévia ao RU486, na Presença ou Ausência de Corticosterona, na ativação do fator de transcrição NFKB induzida por LPS em Culturas Primárias Corticais

Para verificar o envolvimento dos receptores de glicocorticoides nos efeitos da CORT na ativação do fator de transcrição NFKB induzida por LPS (figura 4.17), culturas primárias mistas de neurônios/ células da glia foram expostas previamente à RU486 (10 μ M, 24h), na presença ou ausência de CORT (1 μ M) seguido do tratamento com LPS (10 μ g/ml, 1h) (figuras 4.19).

Observamos uma tendência na diminuição da ativação do fator de transcrição NFKB induzida por LPS (LPS-617.2 $\pm$ 200.4% vs RU LPS-229.2 $\pm$ 39.7%, $p=0.08$) quando adicionamos o antagonista de GR, que se torna menos evidente nas células previamente expostas à CORT ($p=0.13$) devido à grande variabilidade dos dados (figura 4.19).

Figura 4.19. Efeitos da exposição prévia ao RU486, na ausência ou presença de Corticosterona, seguido pelo tratamento com LPS na ativação do fator de transcrição NFKB em culturas primárias mistas de neurônios/células da glia

Efeitos da exposição prévia à ao RU486 (10 μ M-24h), na presença ou ausência de CORT (1 μ M) seguido pelo tratamento com LPS (10 μ g/mL - 1 hora) na ativação do fator de transcrição NFKB em culturas primárias mistas de neurônios/células da glia derivadas do córtex frontal de ratos neonatos Wistar. (À esquerda) Imagem representativa dos experimentos de EMSA. (À direita) Análise densitométrica da banda indicada e representada à esquerda. O gráfico representa resultados expressos em porcentagem do controle ETOH (100%) $\pm$ erro padrão da média de 5 a 8 experimentos independentes. ***p<0,001 vs ETOH (GzLM, seguido de pós-teste Bonferroni).

Também é importante destacar que a somente a exposição ao antagonista RU486, na presença ou não de CORT (RU486-81.0 $\pm$ 13.52% ou RU486 CORT-69.1 $\pm$ 16.3%) sem tratamento com LPS, não foi capaz de alterar a ativação do fator de transcrição NFKB neste modelo de cultura, comparado ao grupo controle ETOH (100%) (figura 4.19).

4.11 Efeitos da Exposição Prévia à Corticosterona na Localização Nuclear do Fator de Transcrição NFKB Induzida por LPS é alterada em Astrócitos de Culturas Primárias Corticais

Apesar de não observarmos um efeito da CORT (anti-inflamatório ou pró-inflamatório) na ativação do NFKB pelo EMSA e como resultados obtidos em meu mestrado sugeriram que os astrócitos eram as células alvo dos efeitos da CORT, resolvemos avaliar a contribuição deste tipo celular no efeito final da CORT, na presença de LPS, na atividade deste fator de transcrição.

Pela técnica de imunofluorescência de dupla-marcação, utilizando anticorpos anti-GFAP (astrócitos) e anti-RELA (p65, subunidade do NFkB), quantificamos a localização nuclear do NFkB como indicativo de sua ativação (ver figura 3.6). Os mesmos tratamentos e ensaios foram usados nos três diferentes os modelos de cultura: mista de neurônios/células da glia, enriquecidas de neurônios e enriquecidas de astrócitos.

Nossos resultados sugerem que os efeitos observados nos astrócitos são dependentes da composição celular do microambiente em que essas células se encontram. Na figura 4.20, podemos observar nos astrócitos de culturas mistas de neurônios/ células da glia (75% das células em cultura), que o tratamento com CORT por 24h diminuiu a localização de RELA neste tipo celular na ausência de LPS (CORT-2.6±0.7% vs ETOH-5.9±1.1%, $p<0.05$). Já o tratamento com LPS, como esperado e corroborando os dados obtidos por EMSA, aumentou a localização nuclear do RELA nos astrócitos, independentemente da exposição prévia à CORT (LPS-66.3±3.7% e CORT LPS-74.5±3.1% vs ETOH, $p<0.001$), evidenciando que a CORT não modulou este fator em ambiente inflamatório, neste tipo celular, quando em culturas mistas e nestas condições experimentais (figura 4.20A).

Os astrócitos em culturas enriquecidas de neurônios (figura 4.20B), cuja proporção neste modelo é de 15%, foram insensíveis ao tratamento com LPS somente (9.9±2.5%), porém o tratamento prévio com CORT seguido de LPS aumentou a localização nuclear do RELA (CORT LPS-13.8±2.7%) quando comparado ao grupo controle (ETOH-4.9±1.7%, $p<0.01$) (figura 4.20B). Estes resultados sugerem uma ação pró-inflamatória da CORT nos astrócitos quando em culturas enriquecidas de neurônios.

Interessantemente, os astrócitos em cultura enriquecida de astrócitos (figura 4.20C), os quais, desta vez, estão em maior proporção (95%) e sem a presença de neurônios (figura 4.3), responderam de maneira diferente do observado em cultura mista de neurônios/células da glia (figura 4.20A) como também, dos astrócitos em cultura enriquecida de neurônios (figura 4.20B). Neste modelo, verificamos que o tratamento com LPS aumentou a localização nuclear do RELA, mesmo com a exposição prévia à CORT, em relação ao grupo controle (LPS-19.4±2% e CORT LPS-11.5±1.6% vs ETOH-6.3±1.2%, $p<0.001$ e $p<0.05$), entretanto este aumento foi menor quando houve exposição prévia à CORT (LPS vs CORT LPS, $p<0.01$), sugerindo uma ação classicamente anti-inflamatória nos astrócitos nestas condições experimentais (figura 4.20C).

Figura 4.20. Efeitos da exposição prévia à Corticosterona na Localização Nuclear do Fator de Transcrição NFKB Induzida por LPS em Astrócitos de culturas primárias derivadas do córtex frontal

Efeitos da exposição prévia à CORT (1 μ M, 24 h) seguido do tratamento com LPS (10 μ g/ml, 1h) na localização nuclear do RELA em Astrócitos de culturas mista de neurônios/células da glia (A), enriquecidas de neurônios (B) e enriquecidas de astrócitos (C) derivadas do córtex frontal de ratos Wistar neonatos. (À esquerda) Fotomicrografias ilustrando a presença de RELA no núcleo de astrócitos (indicados pelas setas) através do ensaio de imunofluorescência realizada com anticorpos anti-GFAP (verde), anti-RELA (vermelho) e DAPI (marcador nuclear – azul). Os tratamentos estão indicados na figura. Escala = 100 μ m. (À direita) Resultados expressos em porcentagem de células com RELA nuclear e imunorreativas para GFAP (astrócitos) $\pm$ erro padrão da média de 4 experimentos independentes. * p <0.05, ** p <0.01 e *** p <0.001 vs ETOH; ### p <0.001 vs CORT; && p <0.01 vs LPS (GzLM, seguido de pós-teste Bonferroni).

4.12 Efeitos da Exposição ao RU486, na Presença ou Ausência de Corticosterona na Localização Nuclear do Fator de Transcrição NFKB Induzida por LPS em Astrócitos de Culturas Primárias Corticais

Pelos ensaios de imunofluorescência de dupla marcação, analisamos o envolvimento do GR nos efeitos da CORT acima observados, com os anticorpos anti-GFAP (astrócitos) e anti-RELA (subunidade p65 do NFKB) de igual modo ao experimento anterior.

Como podemos observar na figura 4.21A, em astrócitos de culturas mista de neurônios/ células da glia, na ausência de LPS, o bloqueio de GR aumentou a localização nuclear de RELA apenas na presença de CORT (RU486 CORT-17.2±2.7% vs. CORT-2.6±0.7% ou ETOH-5.9±1.1%, $p<0.001$), sugerindo que a CORT estaria atuando em outros receptores, como o MR. Já na presença de LPS, a exposição prévia à CORT não inibiu o aumento e nem potencializou a localização nuclear de RELA induzida por LPS neste tipo celular, efeito que foi parcialmente mediado por GR, uma vez que a exposição ao RU486 reduziu essa ação da CORT (CORT LPS-74.5±3.1% vs. RU486 CORT LPS-53.6±2.7%, $p<0.05$) nos astrócitos deste tipo de cultura (figura 4.21A).

Corroborando as diferenças encontradas até o momento, praticamente o oposto ocorreu em astrócitos provenientes de culturas enriquecidas de astrócitos (figura 4.21B). Na ausência de LPS, somente o bloqueio de GR foi capaz de aumentar a localização nuclear de RELA quando comparado ao grupo controle (RU486-19.7±1.8% vs. ETOH-6.4±1.2%, $p<0.05$). De maneira interessante, esse efeito desapareceu na presença de CORT (RU486 CORT-5.1±0.9% vs CORT-4.5±0.9% ou ETOH), sugerindo que o balanço de ativação dos receptores GR/MR deva ser importante na modulação da ativação do fator de transcrição NFKB em astrócitos quando os mesmos estão em microambiente basal (RU486 vs. RU486 CORT, $p<0.001$).

Na presença de LPS, o bloqueio de GR potencializou a localização nuclear de RELA induzida por LPS nos astrócitos (RU486 LPS-41.2±3.2% vs LPS-19.2±2%, $p<0.001$), o que, assim como na ausência de LPS, não foi observado quando as células foram expostas concomitantemente à CORT (RU486 LPS vs RU486 CORT LPS-16.7±1.8%, $p<0.001$, figura 4.21B). Esses resultados sugerem que a CORT, em ambiente inflamatório (presença de LPS), via receptores GR em astrócitos de culturas enriquecidas de astrócitos, é classicamente anti-inflamatória.

Figura 4.21. Efeitos da exposição prévia ao RU486, na Presença ou Ausência de CORT na Localização Nuclear do Fator de Transcrição NFKB Induzida por LPS em Astrócitos de culturas primárias derivadas do córtex frontal

Efeitos da exposição prévia ao RU486 (RU, 10 μ M, 24 h), na presença ou ausência de CORT (1 μ M), seguido do tratamento com LPS (10 μ g/ml, 1h) na localização nuclear do RELA em astrócitos de culturas mista de neurônios/células da glia (A) e enriquecidas de astrócitos (B) derivadas do córtex frontal de ratos Wistar neonatos. (À esquerda) Fotomicrografias ilustrando a presença de RELA no núcleo de astrócitos (indicados pelas setas) através do ensaio de imunofluorescência realizada com anticorpos anti-GFAP (verde), anti-RELA (vermelho) e DAPI (marcador nuclear – azul). Os tratamentos estão indicados na figura. Escala = 100 μ m. (À direita) Resultados expressos em porcentagem de células com RELA nuclear e imunorreativas para GFAP (astrócitos) $\pm$ erro padrão da média de 4 experimentos independentes. ***p<0.001 vs. ETOH; #p<0.05, ##p<0.01 e ####p<0.001 vs. grupos indicados (GzLM, seguido de pós-teste Bonferroni).

4.13 Inibição da Microglia durante a exposição à Corticosterona diminui a Localização Nuclear do Fator de Transcrição NFKB Induzida por LPS em Astrócitos de Culturas Primárias Mistas de Neurônios/ Células da Glia.

Os resultados anteriores sugerem que a microglia presente nos diferentes microambientes [cultura mista de neurônios / células da glia (10%), enriquecida de astrócitos (5%) e/ou enriquecida de neurônios (8%)], mesmo que em menor proporção, pode ser responsável pela resposta ao LPS dos astrócitos. Por esse motivo, nosso próximo passo foi inibir a microglia nessas culturas pela adição da minociclina (MINO-10 μ M), na presença ou ausência do tratamento com CORT (1 μ M, 24h) seguida do tratamento com LPS (10 μ g/mL, 1h).

Podemos observar na figura 4.22 que a exposição prolongada à minociclina, por si só, foi capaz de induzir a localização nuclear do RELA (MINO-15.2±2.3% vs. ETOH-5.9±1.1%, $p<0.001$), de igual modo ao observado em culturas de astrócitos com exposição somente ao RU486 (figura 4.21B). Ou seja, na ausência de um estímulo inflamatório, a inibição da microglia parece não ser benéfica para o microambiente. Ademais, a exposição concomitante à CORT, reverteu este aumento (MINO CORT-7±1.5% vs MINO, $p<0.01$) provocado pela minociclina, sugerindo uma ação anti-inflamatória dos GCs nestas condições experimentais. Diferente do encontrado nos resultados anteriores em ambiente inflamatório, com adição de LPS, a exposição à minociclina foi capaz de diminuir a localização nuclear do RELA em astrócitos, em relação ao grupo não tratado com MINO, em ambos os grupos tratados com LPS, independentemente do tratamento prévio com CORT (MINO LPS-21.6±2.8% vs. LPS-66.3±3.7%, MINO CORT LPS-27.0±2.4% vs. CORT LPS-74.5±3.1%, $p<0.001$). Esses dados sugerem que a microglia, de fato, é importante para a resposta dos astrócitos ao LPS, em relação à localização nuclear do RELA, nestas condições experimentais (figura 4.22).

Figura 4.22. Efeitos da exposição prévia a Minociclina, na Presença ou Ausência de CORT na Localização Nuclear do Fator de Transcrição NFKB Induzida por LPS em Astrócitos de culturas primárias derivadas do córtex frontal

Efeitos da exposição prévia à Minociclina (MINO, 10 μ M, 24 h), na presença ou ausência de CORT (1 μ M), seguido do tratamento com LPS (10 μ g/ml, 1h) na localização nuclear do RELA em Astrócitos de culturas mista de neurônios/células da glia derivadas do córtex frontal de ratos Wistar neonatos. (À esquerda) Fotomicrografias ilustrando a presença de RELA no núcleo de astrócitos (indicados pelas setas) através do ensaio de imunofluorescência realizada com anticorpos anti-GFAP (verde), anti-RELA (vermelho) e DAPI (marcador nuclear – azul). Os tratamentos estão indicados na figura. Escala = 100 μ m. (À direita) Resultados expressos em porcentagem de células com RELA nuclear e imunorreativas para GFAP (astrócitos) $\pm$ erro padrão da média de 3 experimentos independentes. *** $p<0.001$ vs. ETOH; # $p<0.05$, ## $p<0.01$ e ### $p<0.001$ vs. grupos indicados (GzLM, seguido de pós-teste Bonferroni).

4.14 *Exposição Prévia à Corticosterona potencializa a secreção de Il-1 β induzida por LPS em Culturas Primárias Mista de Neurônios/Células da Glia derivadas do Córtex Frontal*

O tratamento prolongado com CORT (1 μ M, 24 h) seguido da exposição aguda ao LPS (10 μ g/ml, 1h) pode modificar a secreção de proteínas no meio extracelular. Diante disso, o conteúdo proteico do meio de cultura após os diferentes tratamentos foi extraído e analisado por *western blot*. Quantificamos a presença da citocina Il-1 β , da enzima caspase 1 clivada (p10) e da proteína Tgf β 1.

Como podemos observar na figura 4.23A-C, não verificamos diferenças no perfil secretório das células em ambiente controle (CORT vs. ETOH) em nenhuma das proteínas analisadas. Entretanto, a exposição ao LPS desencadeou a secreção da forma ativa da citocina Il-1 β (figura 4.23A) somente no grupo previamente tratado com CORT (CORT LPS-166.6 $\pm$ 21.2%) comparado a todos os outros grupos de tratamento (ETOH-100%, CORT-79.5 $\pm$ 19.2% e LPS-123.6 $\pm$ 3.5%, $p < 0.001$, $p < 0.001$ e $p < 0.05$). Esses dados corroboram os dados até agora apresentados, em que o tratamento prévio com CORT potencializa os alguns aspectos da inflamação induzida por LPS em culturas mistas de neurônios/células da glia, nestas condições experimentais.

Já para a enzima Caspase 1 p10 (figura 4.23B), forma ativa da enzima, houve diminuição na liberação desta enzima ao meio extracelular induzida por LPS também somente no grupo tratado previamente com CORT (CORT LPS-64.1 $\pm$ 17.1%, $p < 0.05$) comparado ao controle (ETOH-100%) das culturas mista de neurônios/ células da glia, nestas condições experimentais.

Não observamos modulação da proteína anti-inflamatória TGF β 1 nos grupos tratados das culturas mista de neurônios/células da glia (figura 4.23C).

Figura 4.23. Efeitos da exposição à CORT na Secreção de Pro-Il-1 β , Casp1 e Tgf β 1 induzidas pelo tratamento com LPS em Cultura Primária Mista de Neurônios/Células da Glia

Efeitos da exposição prévia à CORT (1 μ M – 24 h) na secreção de pro-il1 β (A), caspase 1 clivada p10 (B) e TGF β 1 (C) induzidos pelo tratamento com LPS (10 μ g/ml, 1h), mensurados pelo ensaio de *western blot* das culturas mistas de neurônios/células da glia derivadas de córtex frontal de ratos Wistar neonatos. (Acima) Imagens representativas do ensaio de *western blot*. (Abaixo) Análise densitométrica das bandas indicadas acima. Resultados expressos em porcentagem do grupo controle ETOH (100%) $\pm$ erro padrão da média de 2 (A) a 4 (B, C) experimentos independentes. * $p < 0.05$ e *** $p < 0.001$ vs grupo ETOH (GzLM, seguido de pós-teste Bonferroni).

4.15 Exposição Prévia à Corticosterona Seguido por LPS Induz Expressão de Fatores Pro- e Anti-inflamatórios Diferenciadamente entre Culturas Primárias Mista de Neurônios/ Células da Glia e Enriquecida de Astrócitos

Para analisar se o perfil inflamatório/anti-inflamatório das células em cultura após os diferentes tratamentos era modulado pelo microambiente em que essas células estavam expostas, analisamos, por PCR em tempo real, se a exposição à CORT (1 μ M, 24 h) seguido de LPS (10 μ g/ml) durante 1 hora modificava a expressão gênica das células em cultura mista de neurônios/células da glia e em cultura enriquecida de astrócitos.

Na figura 4.24, os genes apresentados à esquerda da figura são genes de fatores pró-inflamatórios (*Il1b*, *Casp1*, *Nlrp3*, *Il6* e *Tnf*), enquanto que à direita da figura, estão genes de fatores anti-inflamatórios (*Tgfb1*, *Il1ra* e *Il10*) e fatores relacionados à disponibilidade (*Hsd11b1*) e resposta à CORT (*Nr3c1* ou *Gr*). Todos os grupos de tratamento foram normalizados e estão expressos em relação ao grupo controle (ETOH), iguais a 1-fold.

De uma maneira geral, a exposição à CORT em ambiente controle, sem adição de LPS, não alterou a expressão de nenhum dos genes analisados, pró- ou anti-inflamatórios (figura 4.24A-H) em ambos os fenótipos de cultura analisados.

Já após estímulo com LPS, verificamos aumento da expressão de *Il1b*, independentemente do tratamento prévio com CORT (LPS-8.8±2.8 *fold* e CORT LPS-9.2±2.3 *fold* vs. ETOH, $p<0.001$) nas culturas mistas, enquanto que nas enriquecidas de astrócitos, não houve diferenças, comparados ao grupo controle ETOH (figura 4.24A). A expressão do *Casp1*, gene da enzima que cliva pró-il-1 β em Il-1 β , estava aumentada somente no grupo tratado com LPS (LPS-6±2.5 *fold*, $p<0.05$), comparado à ETOH, e o tratamento prévio com CORT pareceu reverter este aumento nas culturas mistas. Nas culturas enriquecidas de astrócitos não houve modulação da expressão de *Casp1* por nenhum tratamento (figura 4.24B).

A jusante (*upstream*) na via de sinalização de *Casp1* e Il-1 β , o gene *Nlrp3*, do receptor do inflamassoma, não foi modulado em culturas mistas no momento analisado, mas foi fortemente modulado no grupo com exposição prévia à CORT seguido de LPS (CORT LPS-13.5±6.8 *fold* vs. ETOH, $p<0.001$), nas culturas enriquecidas de astrócitos (figura 4.24C).

A expressão de *Il6*, outra citocina pró-inflamatória comumente ativada pelo LPS, não foi modulada pela exposição ao LPS nas culturas mistas, mas aumentou nas culturas enriquecida de astrócitos, somente após exposição prévia à CORT seguida de LPS (CORT LPS-10.8±9 *fold* vs. ETOH, $p<0.05$), no momento analisado (figura 4.24D).

Na sequência e fechando o grupo de fatores pró-inflamatórios, analisamos a expressão de *Tnf*, citocina pró-inflamatória também ativada pelo LPS. Nas culturas mistas houve aumento da expressão somente no grupo previamente exposto à CORT (CORT LPS-4.1±1.8 *fold* vs. ETOH, $p<0.01$), enquanto que nas culturas enriquecidas de astrócitos, ambos os grupos expostos ao LPS apresentaram aumento da expressão (LPS-34.1±13.5 *fold* e CORT LPS-32.2.1±6.9 *fold* vs. ETOH, $p<0.001$, figura 4.24E).

Para os fatores anti-inflamatórios analisados como *Tgfb1*, gene ligado à sobrevivência celular e proliferação, não verificamos modulação em ambos os fenótipos de cultura, mas houve uma tendência de aumento ($p=0.06$) somente

no grupo previamente exposto à CORT seguido de LPS nas culturas enriquecidas de astrócitos (figura 4.24F). A expressão de *Il1ra*, gene do antagonista endógeno do receptor de IL-1, não foi modulada por LPS em ambos os fenótipos de cultura analisados no momento analisado (figura 4.24G). Já para o gene de *Il10*, citocina anti-inflamatória modulada por GCs, houve o mesmo padrão de aumento de expressão, após tratamento com LPS, em ambos os fenótipos de cultura somente no grupo previamente exposto à CORT (CORT LPS, mistas- 4.2 ± 1 fold e enr. Astrócitos- 6.2 ± 4.7 fold, $p < 0.01$ e $p < 0.05$ respectivamente, figura 4.24H).

Mensuramos também a expressão gênica de *Hsd11b1*, enzima redutase 11 β -hidroxidesidrogenase tipo 1, que converte cortisona em corticosterona em ratos, e, portanto, aumenta a disponibilidade de CORT no microambiente. Como esperado, houve diminuição no grupo tratado somente com CORT (CORT- 0.6 ± 0.1 fold, $p < 0.01$) nas culturas mistas, mas não houve modulação nas culturas enriquecidas de astrócitos (figura 4.24I).

O último gene desta série foi o do próprio receptor de glicocorticoides, o *Nr3c1*. Não observamos modulação, comparada ao grupo controle, em nenhum dos modelos de cultura testados (figura 4.24J) nas condições experimentais testadas.

Figura 4.24. Expressão gênica de fatores Pro- e Anti-inflamatórios em culturas primárias Mistas de Neurônios/ Células da Glia e Enriquecida de Astrócitos

Efeitos da exposição prévia à CORT (1 μ M – 24 h) seguido pelo tratamento com LPS (10 μ g/ml, 1h) na expressão dos genes *Il1b* (A), *Casp1* (B), *Nlrp3* (C), *Il6* (D), *Tnf* (E), *Tgfb1* (F), *Il1ra* (G), *Il10* (H), *Hsd11b1* (I) e *Nr3c1* (J) mensurados pelo ensaio de PCR em tempo real nas culturas mistas de neurônios/células da glia (colunas à esquerda) e enriquecida de astrócitos (colunas à direita) derivadas de córtex frontal de ratos Wistar neonatos. Resultados expressos em *fold change* do controle ETOH (=1) $\pm$ erro padrão da média de 3 experimentos independentes. * p <0.05, ** p <0.01 e *** p <0.001 vs. grupo ETOH; # p <0.05, ## p <0.01 e ### p <0.001 vs. grupo CORT; & p <0.05 e && p <0.01 vs. grupo LPS (GzLM, seguido de pós-teste Bonferroni).

4.16 LPS aumenta a presença de heterodímeros GR-RELA e GR-MR em Culturas Primárias Mista de Neurônios/Células da Glia mas não em Enriquecidas de Astrócitos.

Levando em consideração os dados obtidos, principalmente em culturas mistas de neurônios/ células da glia, decidimos avaliar, por imunoprecipitação, se o GR estaria formando complexos proteicos com outros fatores e se sim, se este efeito era dependente dos tratamentos e mais ainda, do microambiente em que as células se encontravam.

Um dos complexos formados por GR é com a subunidade RELA do NFKB. Verificamos que em todos os grupos de tratamento em ambos os modelos de cultura primária há a presença do complexo GR-RELA (figura 4.25). Podemos observar o aumento do complexo GR-RELA apenas no grupo tratado com LPS nas culturas mistas de neurônios/células da glia (banda 2: LPS-199±46% vs. ETOH-100%, $p<0.05$, figura 4.25A), enquanto que não houve modulação nas culturas enriquecida de astrócitos (figura 4.25B).

Figura 4.25. Presença de RELA ligada ao complexo GR em culturas primárias derivadas do córtex frontal de ratos Wistar neonatos

Ensaio de imunoprecipitação (IP) de GR mostrando a presença de RELA após exposição prévia à CORT (1 μ M – 24 h) seguido pelo tratamento com LPS (10 μ g/ml, 1h) em culturas mista de neurônios/células da glia (A) e enriquecida de astrócitos (B) derivadas do córtex frontal de ratos Wistar neonatos. Imagem à esquerda representativa das células imunoprecipitadas com GR (IP de GR) e posterior ensaio de *western blot* para RELA. C-: Controle negativo–IP sem o anticorpo GR; C+: controle positivo – amostra lise total sem IP. À direita, análise densitométrica das bandas indicadas na imagem à esquerda. Resultados expressos em porcentagem do grupo controle ETOH (100%) $\pm$ erro padrão da média de 3 experimentos independentes. * $p<0.05$ vs. grupo ETOH, # $p<0.05$ vs. grupo CORT (GzLM, seguido de pós-teste Bonferroni).

A presença do heterodímero GR-MR foi confirmada em todos os grupos de tratamento e em ambos os modelos testados (figura 4.26). Ainda, na análise semi-quantitativa, o heterodímero GR-MR aumentou no grupo somente com tratamento prévio com CORT seguido de LPS (CORT LPS: banda 1- 217±40.8% e banda 2- 226.2±58% vs. ETOH-100%, $p<0.001$ e $p<0.05$) nas culturas mista de neurônios/ células da glia (figura 4.26A). Já nas culturas enriquecidas de

astrócitos (figura 4.26B), embora ainda não estatisticamente significativa, verificamos uma forte tendência de aumento no grupo tratado somente com CORT ($421.4 \pm 268.5\%$, $p=0.06$).

Figura 4.26. Presença de MR ligada ao complexo GR em culturas primárias derivadas do córtex frontal de ratos Wistar neonatos

Ensaio de imunoprecipitação (IP) de GR mostrando a presença de MR após exposição prévia à CORT ($1 \mu\text{M} - 24 \text{ h}$) seguido pelo tratamento com LPS ($10 \mu\text{g/ml}$, 1 h) em culturas mista de neurônios/células da glia (A) e enriquecida de astrócitos (B) derivadas do córtex frontal de ratos Wistar neonatos. Imagem à esquerda representativa das células imunoprecipitadas com GR (IP de GR) e posterior ensaio de *western blot* para MR. C-: Controle negativo-IP sem o anticorpo GR; C+: controle positivo – amostra lise total sem IP. À direita, análise densitométrica das bandas indicadas na imagem à esquerda. Resultados expressos em porcentagem do grupo controle ETOH (100%) $\pm$ erro padrão da média de 3 experimentos independentes. * $p<0.05$ e *** $p<0.001$ vs. grupo ETOH, # $p<0.05$ e ### $p<0.001$ vs. grupo CORT (GzLM, seguido de pós-teste Bonferroni).

Por último, analisamos a própria presença de GR como controle do método. A presença de GR foi confirmada em todos os grupos e não houve modulação em nenhum dos tratamentos e modelos de cultura utilizados, nestas condições experimentais (figura 4.27A e B).

Figura 4.27. Presença dos receptores de glicocorticoides no ensaio de imunoprecipitação em culturas primárias derivadas do córtex frontal de ratos Wistar neonatos

Ensaio de imunoprecipitação (IP) de GR mostrando a presença de GR após exposição prévia à CORT ($1 \mu\text{M} - 24 \text{ h}$) seguido pelo tratamento com LPS ($10 \mu\text{g/ml}$, 1 h) em culturas mista de neurônios/células da glia (A) e enriquecida de astrócitos (B) derivadas do córtex frontal de ratos Wistar neonatos. Imagem à esquerda representativa das células imunoprecipitadas com GR (IP de GR) e posterior ensaio de *western blot* para o próprio GR. C-: Controle negativo-IP sem o anticorpo GR; C+: controle positivo – amostra lise total sem IP. À direita, análise densitométrica das bandas indicadas na imagem à esquerda. Resultados expressos em porcentagem do grupo controle ETOH (100%) $\pm$ erro padrão da média de 3 experimentos independentes. (GzLM, seguido de pós-teste Bonferroni).

4.17 Expressão de *Gilz* e *Fkbp5* Induzida por CORT nas Culturas Primárias Mistas de Neurônios/ Células da Glia e Enriquecida de Astrócitos

Contemplando os resultados de imunoprecipitação e evocando os resultados de expressão gênica, levantamos a hipótese que o GR poderia ter sua atividade genômica modificada pela presença de proteínas como o RELA e pela heterodimerização com MR nos tratamentos e modelos de cultura utilizados. Para isso, mensuramos, por PCR em tempo real, a expressão de genes sabidamente modulados por GCs, como *Gilz* e *Fkbp5*.

Não observamos modulação de *Gilz* nas culturas mistas de neurônios/ células da glia (figura 4.28A, à esquerda), já a expressão nas culturas enriquecida de astrócitos seguiu o padrão esperado, com aumento da expressão *Gilz* nos grupos tratados previamente com CORT (CORT- 3.8 ± 1.3 fold e CORT LPS- 4.1 ± 1 fold, $p < 0.001$) (figura 4.28A, à direita).

Praticamente o mesmo ocorreu na expressão de *Fkbp5*. Observamos aumento da expressão deste gene somente no grupo previamente tratado com CORT seguido de LPS (CORT LPS- 3.6 ± 0.9 fold, $p < 0.05$) nas culturas mistas de neurônios/ células da glia (figura 4.28B, à esquerda) e forte modulação de *Fkbp5* em ambos os grupos onde houve tratamento prévio com CORT (CORT- 10.7 ± 3.2 fold e CORT LPS- 7.1 ± 3 fold, $p < 0.05$ e $p < 0.001$) nas culturas enriquecida de astrócitos (figura 4.28B, à direita).

Estes dados sugerem que as células em culturas mistas de neurônios/ células da glia, frente ao tratamento prolongado com CORT e posterior insulto inflamatório, possuem um receptor de glicocorticoides com atividade transcricional modificada, talvez pela heterodimerização com MR.

Figura 4.28. Expressão dos genes *Gilz* e *Fkbp5* em culturas primárias Mistas de Neurônios/ Células da Glia e Enriquecida de Astrócitos

Efeitos da exposição prévia à CORT (1 μ M – 24 h) seguido pelo tratamento com LPS (10 μ g/ml, 1h) na expressão dos genes *Gilz* (A) e *Fkbp5* (B) mensurados pelo ensaio de PCR em tempo real nas culturas mistas de neurônios/células da glia (coluna à esquerda) e enriquecida de astrócitos (coluna à direita) derivadas de córtex frontal de ratos Wistar neonatos. Resultados expressos em numero *fold change* do controle ETOH (=1) $\pm$ erro padrão da média de 3 experimentos independentes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$ vs. grupo ETOH; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ e ### $p < 0.001$ vs. grupo CORT; & $p < 0.05$ e && $p < 0.01$ vs. grupo LPS (GzLM, seguido de pós-teste Bonferroni).

4.18 Exposição prolongada à Corticosterona Aumenta a Proteína Conexina 43 em Culturas Primárias de Córtex Frontal

Até o momento, nossos resultados sugerem que o tratamento prévio com a CORT pode modular a resposta dos astrócitos frente a um estímulo inflamatório como o LPS. Com intuito de analisar quais os mecanismos moleculares responsáveis por esta modulação, analisamos algumas proteínas chaves nas interações celulares e mais precisamente nas interações dos astrócitos, como a proteína conexina 43.

Em culturas enriquecidas de astrócitos observamos um aumento da proteína CX43 somente nos grupos tratados com CORT (CORT-265.5 $\pm$ 63.1% e CORTLPS-225.8 $\pm$ 33.6%, $p < 0.001$), corroborando os dados da literatura neste tipo celular (figura 4.29B). Já nas culturas mista de neurônios/ células da glia, observamos uma tendência no aumento

induzido por CORT ($169.5 \pm 27.8\%$, $p=0.06$) e verificamos aumento da CX43 no grupo com tratamento prévio com CORT seguido de LPS (CORT LPS- $180.3 \pm 41.7\%$, $p<0.05$) figura 4.29A).

Figura 4.29. Efeitos da exposição à CORT seguida de LPS na proteína Conexina 43 em culturas primárias mista de neurônios/células da Glia e enriquecida de astrócitos

Efeitos da exposição prévia à CORT ($1 \mu\text{M}$ - 24h) seguido pelo tratamento com LPS ($10 \mu\text{g/mL}$ - 1 hora) na proteína CX43 de culturas primárias mistas de neurônios/células da glia (A) e enriquecidas de astrócitos (B) derivadas do córtex frontal de ratos Wistar neonatos. (Acima) Imagem representativa dos experimentos de *western blot*. (Abaixo) Análise densitométrica normalizada da banda indicada e representada acima de cada gráfico. Resultados expressos em % ETOH $\pm$ erro padrão da média de 4 experimentos independentes. $*p<0.05$ e $***p<0.001$ vs. grupo ETOH (GzLM, seguido de pós-teste Bonferroni).

4.19 Exposição prolongada à Corticosterona não modula HMGB1 em Culturas Primárias de Córtex Frontal

A alarmina Hmgb1 (*High mobility group box-1*) participa do “*priming*” celular induzido por estresse crônico e por essa razão, verificamos por *western blot*, se a exposição prévia à CORT ($1 \mu\text{M}$ -24h) seguido do tratamento com LPS ($10 \mu\text{g/ml}$ -1h) modificavam a quantidade de proteína Hmgb1 em nossos modelos de cultura mista de neurônios/ células da glia e enriquecida de astrócitos (figura 4.30). Não verificamos modulação desta proteína em nenhum dos tratamentos realizados e em nenhum dos modelos de cultura, em nossas condições experimentais.

Figura 4.30. Efeitos da exposição à CORT seguida de LPS na proteína HMGB1 em culturas primárias mista de neurônios/células da Glia e enriquecida de astrócitos

Efeitos da exposição prévia à CORT (1 μ M - 24h) seguido pelo tratamento com LPS (10 μ g/mL - 1 hora) na proteína HMGB1 de culturas primárias mistas de neurônios/células da glia (A) e enriquecidas de astrócitos (B) derivadas do córtex frontal de ratos Wistar neonatos. (Acima) Imagem representativa dos experimentos de *western blot*. (Abaixo) Análise densitométrica normalizada da banda indicada e representada acima de cada grafico. Resultados expressos em % ETOH $\pm$ erro padrão da média de 4 experimentos independentes (GzLM).

4.20 Efeitos da Exposição Prévia à Corticosterona Seguido de LPS não modula Fatores "ON/OFF" em Culturas Primárias de Córtex Frontal

O contato célula-célula, através de proteínas que se complementam chamadas de fatores "on/off", pode modificar a resposta celular frente a um estímulo inflamatório como o LPS, por exemplo. Por essa razão, analisamos alguns destes fatores e se eles eram modificados pela exposição prévia à CORT (1 μ M-24) seguido de LPS (10 μ g/ml-1h) em nossos modelos de cultura mista de neurônios/células da glia e enriquecida de astrócitos.

De maneira geral, não verificamos a modulação destes fatores pelos tratamentos analisados em ambos os fenótipos de cultura (figura 4.31).

Houve apenas aumento do receptor CX3CR1, majoritariamente presente em microglia, cuja ação é inibida quando liga à seu complemento CX3CL1, nas culturas mistas, induzido apenas pelo tratamento com LPS (LPS-158 $\pm$ 24.5% vs ETOH-100%, $p < 0.05$, figura 4.31E). E também observamos um aumento de CD200 somente em culturas mistas em ambos os grupos expostos ao LPS, que foi

independente da exposição prévia à CORT (LPS-1783±894% e CORT LPS-2173±1165% vs ETOH-100%, $p<0.05$). O contato de CD200 com seu receptor CD200R também exerce ação inibitória (figura 4.31G).

Figura 4.31. Efeitos da exposição à CORT seguida de LPS os fatores “ON/OFF” em culturas primárias mista de neurônios/células da Glia e enriquecida de astrócitos

Efeitos da exposição prévia à CORT (1 μ M - 24h) seguido pelo tratamento com LPS (10 μ g/mL - 1 hora) nas proteínas Sirpa (A,B), CX3CL1 (C,D) CX3CR1 (E,F) de culturas primárias mistas (à esquerda) e enriquecidas de astrócitos (à direita) e das proteínas CD200 (G) e CD200R (H) de culturas primárias mistas de neurônios/células da glia derivadas do córtex frontal de ratos Wistar neonatos. (Acima de cada gráfico) Imagem representativa dos experimentos de western blot. (Gráfico) Análise

densitométrica normalizada da banda indicada. Resultados expressos em % ETOH (100%) $\pm$ erro padrão da média de 4 experimentos independentes. * $p < 0.05$ vs. grupo ETOH (GzLM, seguido de pós-teste Bonferroni).

5 DISCUSSÃO

5.1 Caracterização das Culturas Primárias

Diversos protocolos para obtenção de culturas primárias neuronais capazes de gerar diferentes padrões (fenótipos) em termos de composição de neurônios, células da glia e seus subtipos estão disponíveis na literatura científica. Na grande maioria deles, as culturas são confeccionadas com encéfalo de fetos de aproximadamente 18 dias intra-uterinos e utilizadas entre o 10° e 12° dias *in vitro*. Porém, o uso de ratos neonatos (P1-P4) na confecção de culturas primárias de células do sistema nervoso central tem sido cada vez mais relatado, uma vez que se minimiza o número de animais, já que as matrizes podem ser preservadas e pode se estudar as células num estado de maturação mais avançado e ao longo de seu desenvolvimento (155, 156). Embora seja ainda bastante discutido se células, principalmente neurônios, obtidas de fetos tenham uma melhor sobrevivência em cultura que células provenientes de neonatos, já existem vários protocolos disponíveis mostrando o sucesso de se cultivar células, inclusive neurônios, provenientes de diferentes regiões do encéfalo de neonatos e inclusive animais adultos (157, 158).

Kivell et al., (2000) discutem que áreas rostrais do encéfalo são mais fáceis de serem mantidas em cultura e mostraram, usando um protocolo muito similar ao descrito nesse estudo, que embora culturas de neurônios do tronco encefálico provenientes de fetos (14, 16 e 20 dias pré-natais) tenham maior porcentagem de neurônios e mais neurônios bipolares que culturas confeccionadas com encéfalos de neonatos (P1 – P6), que apresentam maior quantidade de neurônios multipolares e a sobrevivência das células em cultura é comparável em todas as idades testadas (155). Além disso, esses autores também mostraram que a razão neurônios/células da glia em cultura se manteve constante com o tempo em todas as idades testadas e que os neurônios foram viáveis por até 9 dias em cultura. Ainda, nas culturas de neonatos, a porcentagem de astrócitos foi de 50 a 72%, bem parecida com as porcentagens obtidas da padronização das culturas mistas utilizadas nos nossos experimentos, no qual obtivemos aproximadamente 74% de astrócitos, 10% de microglia e 10% de neurônios.

O uso de meios de cultura quimicamente bem definidos, como o Neurobasal® e *Hibernate*®, complementos como o B27® e F12® e a porcentagem de soro no meio de cultura ou inibidores do crescimento de células da glia, como o citosina-arabinosídeo (AraC) são extremamente importantes para a diferenciação dos fenótipos celulares encontrados em culturas tanto de fetos como neonatos (138, 159-162) e a variação de cada um desses compostos pode explicar as diferenças encontradas nos diferentes protocolos.

Por exemplo, Ahlemeyer & Baumgart-Vogt (135), usando camundongos C57Bl/6J neonatos, obtiveram culturas primárias corticais no 6º DIV com 5% de células imunorreativas para astrócitos e menos que 1% de células imunorreativas para oligodendrócitos utilizando meio de cultura Neurobasal/®B27®. Wang et al., (163) obtiveram mais de 95% de neurônios em cultura no 9º e 10º DIV em meio DMEM/F12 suplementado com 15% de soro fetal bovino, 5% de soro de cavalo e adição no 3º DIV de 1 µM de AraC por 48 horas em culturas primárias derivadas de córtex frontal de ratos neonatos da linhagem Sprague-Dawley (124). Numakawa et al., (2007) (164), utilizando ratos neonatos, com dois dias de vida (P2), obtiveram 80% de neurônios no 5º DIV em culturas corticais mantidas em DMEM/F12 suplementado com 5% de soro de bezerro neonato pré-colostro e 5% de soro de cavalo. Este último, com dados semelhantes aos obtidos em nosso fenótipo de cultura enriquecida de neurônios.

Existem inúmeros protocolos para a obtenção de culturas enriquecida de astrócitos que utilizam diferentes estratégias experimentais para a separação deste tipo celular. Vários deles utilizam a remoção mecânica por agitação enquanto outros utilizam a remoção enzimática por tripsinização de culturas mistas. Entretanto, outros métodos como seleção da célula alvo pelo uso de substâncias (AraC) (165), separação por gradientes de Percol® (166), separação por “beads” magnéticos (167), separação por seleção negativa ou positiva com o auxílio de placas revestidas com anticorpos, o chamado “immunopanning” (168) são também utilizados.

Optamos pelo método de separação mecânica por agitação no 14ºDIV, descrito por Ni et al. (2010) com pequenas modificações nos tempo e velocidade de agitação das culturas, uma vez que existem diferentes protocolos de separação mecânica para remoção da microglia resultando em fenótipos muito semelhantes (139). Por exemplo, Johann et al. (2015) utilizaram o método de agitação de culturas mistas derivadas de camundongos neonatos no 10º DIV por 3 h à 230 RPM com composição de 95% de microglia no sobrenadante e 90% de

astrócitos aderido (169). McCarthy e Vellis (1980) utilizaram o método de agitação no 10º DIV de culturas mistas corticais de ratos neonatais a 250 RPM por 15-18 horas e obtiveram 95% de astrócitos (170). A mesma porcentagem de pureza foi obtida por Lin et al.(2016), pela agitação no 7º DIV de cultura mista de tecido cortical de camundongos adultos a 180 RPM por 18 h seguido de 4 a 5 ciclos de tripsinização (171). E também por Morte et al, (2018), através de culturas mistas corticais de camundongos neonatos plaqueadas em poços revestidos com L-ornitina em meio contendo 10% Soro fetal bovino desprovido de hormônios da tireoide e 1% Glutamax® por 7 dias (172). Todos com pureza final semelhante a nossa com 95% de astrócitos.

Com isso, baseados na literatura e na morfologia das células obtidas em cultura, concluímos que os protocolos de cultura aqui descritos foram capazes de gerar células viáveis e podem ser considerados bons modelos para estudos *in vitro*.

O sistema imune tem função importante em manter a homeostase tecidual e em resposta a infecções e danos (15). Tradicionalmente, a inflamação envolve a síntese e liberação de mediadores inflamatórios, e no SNC, pode ser tanto neuroprotetora como neurotóxica, dependendo do tipo de dano, intensidade e duração da resposta inflamatória e composição dos infiltrados inflamatórios (27, 173).

Neste estudo, utilizamos como modelo de inflamação o tratamento com LPS, componente majoritário da parede celular de bactérias Gram-negativas. O LPS tem a capacidade de ativar o sistema imune inato, levando à síntese e secreção de mediadores inflamatórios essenciais para a resposta imune inata e subsequente resposta adaptativa do hospedeiro (15). No SNC, a microglia e os astrócitos expressam receptores capazes de reconhecer não somente patógenos (PAMPs) como também ligantes endógenos (DAMPs) liberados após dano tecidual ou estresse (6, 73). A microglia expressa a maioria dos TLRs, dentre eles o receptor TLR4 (*Toll-like receptor 4*) que reconhece e transduz o sinal gerado pelo LPS (6, 41).

A presença de TLR4 em células do SNC outras que não a microglia segue um assunto controverso (24, 27, 41, 174, 175). Holm et al., (2012) demonstraram em cultura pura de astrócitos confeccionadas com o encéfalo total de camundongos neonatos, que estes não expressam TLR4 nem CD14, um componente do receptor de alta afinidade ao LPS, e por isso não seriam diretamente sensíveis a este PAMP. Neste mesmo estudo, os autores mostraram que a ativação dos astrócitos por LPS ocorreu somente na presença de microglia, sugerindo

que esta célula poderia liberar fatores solúveis, tais como as citocinas TNF- α e IL-1 β , que contribuiriam para resposta dos astrócitos ao estímulo inflamatório (41). Por outro lado, Saijo et al., (2009) sugerem que os astrócitos expressam TLR4 em baixos níveis, mas não expressam CD14 e, portanto, são menos sensíveis ao LPS que a microglia (176). Ambos utilizaram encéfalos totais de camundongos C57BL/6, mas com idades diferentes, P1-3 e P0, e métodos de separação diferentes, por gradiente de Percoll e *beads* magnéticas, respectivamente. McCarthy et al., (2017) pela separação por gradiente de Percoll® seguido de purificação por *beads* magnéticas, também do encéfalo de camundongos C57BL/6, porém adultos, observaram presença de TLR4 em baixos níveis e CD14 praticamente ausente, mas presença de outros componentes da cascata de sinalização do receptor como MyD88, Trif, Traf3 e Traf6 (33). Nakano et al, (2015) observaram co-localização de TLR4 e GFAP em áreas sensoriais dos órgãos cingulocorticulares de camundongos adultos (177). Resultados semelhantes ao nosso foram encontrado por Ko et al.,(2015), utilizando também cultura enriquecida de astrócitos derivadas de córtex frontal de ratos neonatos (178).

Em nosso modelo de cultura mista de neurônios/ células da glia, verificamos que os astrócitos apresentaram difusa marcação para este receptor por todo corpo celular. Resultados anteriores de nosso grupo também verificaram forte marcação deste receptor em microglia e discreta marcação em neurônios (dados não mostrados).

Verificamos também a presença do receptor intracelular NLRP3 (*NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3*), componente essencial do complexo do inflamassoma. Estudos recentes vêm demonstrando que o NLRP3 pode ser modulado por glicocorticoides. Busillo et al. (2011) mostraram que a exposição de macrófagos à dexametasona (DEX) aumenta a transcrição gênica e tradução proteica do NLRP3 e que após estímulo com ATP, essas células têm sua resposta pró-inflamatória amplificada, medida pelos níveis de IL-1 β , TNF- α e IL-6, quando comparado aos macrófagos somente desafiados com ATP (28). Frank et al. (2014) demonstraram que na microglia de hipocampo de ratos adrenalectomizados tratados cronicamente com CORT há aumento da expressão gênica de NLRP3 e que sua resposta pró-inflamatória induzida por LPS está potencializada (medida pelos níveis de IL-1 β , TNF- α , IL-6 e NLRP3) quando comparada à microglia de ratos não tratados (132).

No SNC, a expressão de NLRP3 parece não ser restrita à microglia. Em modelo de cultura mista, observamos a presença do NLRP3 na região nuclear dos astrócitos. Outros estudos também apontam a presença deste receptor neste tipo celular (169, 179, 180).

Alfonso-Loeches et al. (2014) observaram uma localização difusa de NLRP3 no citoplasma de astrócitos corticais de camundongos (179). Johann et al. (2015) identificaram que os astrócitos da medula espinhal de camundongos expressam NLRP3, inclusive, em maior proporção do que a observada em microglia desta mesma região (169). Entretanto, ainda há um desacordo sobre esse assunto na literatura. Gustin et al. (2015) argumentam que somente a microglia expressa NLRP3 e os demais componentes que formam o inflamassoma (ASC e caspase 1), sendo este complexo, portanto, funcional nesta célula. Nos astrócitos, devido à baixa ou nenhuma expressão dos componentes observada pelos autores, o complexo não teria atividade (167). Recentemente, Slowik et al., (2018) mostraram, em culturas primárias enriquecida de astrócitos derivadas do córtex de camundongos, a expressão de NLRP3 e ASC dispersa em toda célula, além do aumento do mRNA e proteína após hipóxia (181).

A localização celular exata destes receptores também é objeto de estudo e ainda não foi elucidada. Wang et al. (2013), utilizando microscopia confocal, mostraram que o NLRP3 está localizado no citoplasma de macrófagos de camundongos e não está associado a nenhuma outra organela (182). Essas diferenças encontradas podem ser devidas às variações quanto a expressão de NLRP3 entre os astrócitos de diferentes regiões do SNC, como destacado na revisão feita por Khakh e Sofroniew (2015)(183).

Verificamos também a presença dos receptores de glicocorticoides (GR) e o de mineralocorticoides (MR). Ambos são expressos em neurônios e células da glia, mas com distribuição variável (184-186). Os GRs são mais amplamente expressos em todo encéfalo com maior nível nos centros de regulação do estresse, como o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), córtex pré-frontal, hipocampo, amígdala e redes neuronais monoaminérgicas ascendentes. No entanto, a expressão de GR muda ao longo da vida, pois são altamente expressos na primeira semana de vida nos neurônios da região CA3 do hipocampo e núcleos supraquiasmáticos, que desaparecem com o decorrer do tempo (186, 187).

Já os MR são expressos em maior quantidade nos neurônios das áreas límbicas, particularmente no hipocampo, septo lateral e amígdala (186-188). Em nosso modelo de cultura mista de neurônios/células da glia, derivadas do córtex frontal, há presença de ambos os receptores nos astrócitos (189, 190).

Nosso alvo de caracterização foi o astrócito devido a indícios de que esta célula participaria ou seria a responsável pelo fenômeno de potencialização da morte celular induzida pelo LPS, após exposição prolongada, além disso, os neurônios e a microglia são muito mais bem estudados e a presença destes receptores é mais bem estabelecida (103, 133, 187, 191). Entretanto, a localização subcelular destes receptores nos tipos celulares não está bem descrita em cultura, muito menos ainda, em astrócitos, pois a maior parte dos estudos visa localizar estes receptores em neurônios e em cortes de tecido. Apesar de não podermos afirmar se a localização do GR é nuclear ou perinuclear em nossa cultura, esperávamos um padrão mais parecido com o encontrado para MR, com dispersão por toda a célula, já que os astrócitos estão em ambiente controle, não estimulados e com meio de cultura livre de hormônios esteroides.

Unemura et al. (2012), utilizando um modelo de cultura semelhante ao nosso, com culturas primárias enriquecida de astrócitos corticais de ratos Wistar neonatos, demonstraram por imunocitoquímica, que o GR estava localizado no núcleo dos astrócitos mesmo após tratamento com GCs, entretanto, os autores não citam se utilizaram meio livre de hormônios, como também não utilizam microscopia confocal para verificar a sublocalização dos receptores (130). Embora não tenha sido o objetivo do estudo, pelos resultados mostrados por Pusceddu et al., (2016), é possível observar o GR no núcleo de outros tipos celulares, além do neurônio marcado, em culturas mistas corticais de ratos (192). Três estudos antigos caracterizam a presença de GR e MR em astrócitos de culturas primárias derivadas de cerebelo, hipocampo e encéfalo de ratos neonatos (185, 190, 193), mas a maioria só relata a localização subcelular após tratamento com dexametasona e, portanto, nuclear. Ademais, um deles mostrou que a quantidade destes receptores variou em função do tempo em cultura dos astrócitos, sendo maior a concentração de GR em culturas com 20 a 30 dias, comparada às culturas com 10 dias *in vitro* (193).

Em astrócitos da amígdala lateral de ratos, Johnson et al., (2005) localizaram GR em processos gliais próximos de sinapses e também no núcleo destas células, mas não citaram se as quantidades eram semelhantes entre os compartimentos subcelulares (191). A presença de GR também foi observada por Tatro et al.,(2009) em astrócitos de culturas de prosencéfalo fetal humano, sem relatar a localização subcelular (194), e por Battle et al., (2015), em astrócitos de tecido de hipocampo de ratos, mas com fraca marcação distribuída em toda célula (195). Li et al.,(2018) fizeram ensaio de co-localização por imunofluorescência

tanto para GR e MR com GFAP+ e verificaram baixa co-localização MR+/GFAP+ e GR+/GFAP+ em medula espinhal e gânglio da raiz dorsal de ratos. A co-localização destes receptores foi maior em neurônios (196). Esses resultados sugerem que os GR de astrócitos em cultura são mais sensíveis do que os em tecido, mas outros experimentos devem ser feitos para esclarecer este fenômeno.

5.2 Glicocorticoides, Morte Celular e Priming

Os GCs são os principais hormônios sinalizadores de estresse e os fármacos anti-inflamatórios mais prescritos para o tratamento de inflamação crônica (83) e na redução de edema cerebral (197). Entretanto, concentrações elevadas de GCs são encontradas em pacientes depressivos e vem sendo relacionadas à fisiopatologia de doenças psiquiátricas e neurodegenerativas.

De fato, dados de nosso laboratório mostraram que o estresse agudo de contenção (1 h) em ratos adultos leva a comportamento do tipo ansioso, além de elevar os níveis de corticosterona mensurados imediatamente após estresse (198). Estudos em humanos revelam uma forte correlação negativa entre os níveis de cortisol e o volume do hipocampo em pacientes com depressão maior (199, 200). A hipótese é que a perda do volume está relacionada com atrofia neuronal e glial, já que estudos mostram que o estresse induz a atrofia de dendritos de neurônios piramidais do hipocampo de ratos (201, 202) e remodelamento de astrócitos no córtex infra límbico, com redução de volume, processos, número de ramificações e densidade de GFAP, o que não resultou em perda numérica (203). Entretanto, estudos *post-mortem* no córtex pré-frontal e hipocampo de indivíduos com histórico de depressão mostram redução no número de células da glia (204-206), mas não no núcleo basolateral da amígdala (BLA)(207). Desta maneira, analisamos se a exposição prolongada a CORT (24 h, 1 μ M) era capaz de provocar a morte celular em nossos modelos de cultura com variados fenótipos.

Em nosso modelo, não evidenciamos nenhum efeito citotóxico da CORT em condições basais. Da mesma maneira, Yao et al., (2007) não observaram diminuição da viabilidade de culturas neuronais de hipocampo de embriões de ratos após tratamento com dexametasona (DEX 1-10 μ /24 h), assim como Nakatani et al., (2014) em culturas neuronais de hipocampo de embriões camundongos e Roy e Sapolsky (2003), em culturas mistas de hipocampo de

embriões de ratos, estes últimos, na mesma concentração e tempo de exposição estudados aqui (208-210). Por outro lado, Liu et al., (2011) observaram diminuição da viabilidade e aumento de células em apoptose em culturas neuronais de hipocampo de ratos neonatos expostas ao mesmo tratamento aqui utilizado (211), o mesmo verificado por Zhu et al., (2006), em culturas neuronais de hipocampo de embriões de ratos, expostas por somente 1 hora de CORT (0.5-1 μ M) ou DEX (0.5-5 μ M), mensurados após 23 horas da exposição (212).

A citotoxicidade induzida por CORT, entretanto, parece ser tempo e dose dependente. Em culturas organotípicas de hipocampo de ratos, Kurek et al., (2016) não observaram morte celular por necrose ou apoptose após exposição à CORT por 24 horas, porém, após 72 horas, a morte celular por apoptose foi revelada (213). Em relação à concentração, há vários estudos que evidenciaram o efeito citotóxico da CORT quando as células foram expostas a concentrações muito superiores à fisiológica e às alcançadas pelo estresse. Por exemplo, Crochemore et al., (2005) observaram aumento da morte celular por apoptose em culturas neuronais de hipocampo de ratos neonatos expostos a 10 μ M de DEX por 48 horas (214). Outros dois estudos observaram, também com a DEX, aumento da morte celular por apoptose e necrose em culturas neuronais de hipocampo de camundongos com concentrações superiores a 50 μ M e 100 μ M, por 24 e 72 horas de exposição, respectivamente (210, 215).

Os diferentes resultados podem ser devidos a diferentes metodologias e suplementações do meio de cultura, que podem modificar o fenótipo e consequente proporções celulares, o que pode conferir maior ou menor resistência à CORT. Além disso, as culturas são ora de camundongos, ora de ratos em diferentes estágios de desenvolvimento. Nesta linha, estudos *in vivo* mostraram que, de fato, a fase de desenvolvimento celular é importante para os efeitos citotóxicos da CORT. Llorens-Martin et al., (2011) observaram que o estresse por nado forçado somente induziu apoptose em neurônios recém-formados (até 1 semana) no giro denteado de camundongos, sugerindo uma ação da CORT na modulação do desenvolvimento neuronal (216). Estudos que utilizaram uma única injeção de DEX em camundongos (P7) ou ratos (P3) observaram apoptose em células progenitoras da camada granular externa do cerebelo e neurônios do subículo dorsal do hipocampo, respectivamente (217, 218). Este último estudo também mostrou apoptose em células GFAP+, entretanto a maior parte das células em apoptose era neurônios. Esses autores sugerem, ainda, que o córtex não foi sensível a apoptose induzida por DEX (218).

Os efeitos dos GCs diretamente em astrócitos são menos relatados e os relatos existentes não são conclusivos. Yu et al., (2011) não observaram morte celular por apoptose em astrócitos de hipocampo de ratos neonatos e adultos injetados com DEX, nem em culturas enriquecidas de astrócitos derivadas de hipocampo de ratos neonatos tratados com DEX (10 μ M-48 h) (73). O mesmo foi visto por Henkel et al., (2014), no qual astrócitos derivados de córtex de ratos neonatos expostos à DEX 0.5 μ M por 7 dias foram resistentes à apoptose (219). Latt et al., (2018) observaram morte celular por apoptose em cultura primária de glia hipocampais de camundongos apenas com alta concentração de CORT (500 μ M), entretanto os autores não informaram a composição fenotípica dessas culturas. Em estudo *in vivo*, Gonzalez-Perez et al., (2011) verificaram que o estresse, por barulhos intermitentes ao longo do dia, durante 10 dias consecutivos, reduziu a quantidade de células GFAP+ recém formadas e aumentou a proporção de células GFAP+/Casp3+ na zona subgranular do giro denteado de camundongos, importante área de neurogênese, corroborando os dados de GCs alterando o desenvolvimento celular (215, 220).

Nos estudos que observaram morte celular induzida por GCs ou estresse, este efeito foi mediado por GR, uma vez que o uso de RU-486 (antagonista de GR) reverteu o fenômeno (212, 216, 221-223). Os estudos na literatura descrevem somente efeitos protetores do RU486 quando utilizada na presença de outros fármacos ou estímulos, como os descritos acima, mas não é frequente o relato dos efeitos provocados somente pelo fármaco, principalmente nas células do SNC. Nesse sentido, alguns estudos mostraram que o tratamento somente com RU486 não foi capaz de induzir a morte em linhagem de células endoteliais humanas (224), pericitos de ratos (225), células HT22, da linhagem neuronal derivada de hipocampo de camundongos (140) e hipocampo de ratos neonatos (226).

Vem sendo amplamente sugerido que o estresse ou doses elevadas de GCs podem levar a adaptações e modificações para manter a homeostase e o que tem sido proposto é que essas modificações podem levar exacerbar as respostas subsequentes, dependendo do estímulo (ver (123, 186)). Por exemplo, os GCs podem aumentar o dano cerebral induzido por trauma, isquemia e convulsões, sendo os neurônios particularmente sensíveis a esses efeitos (123). Uma das possíveis adaptações é o “*priming*” celular, no qual um estresse agudo ou crônico amplificaria as respostas neuroinflamatórias a um desafio imune subsequente. Nosso laboratório e outros mostraram que os GCs sensibilizam as respostas neuroinflamatórias e comportamentais a uma subsequente ativação imune periférica, como

por exemplo, o LPS (57, 124, 129, 227-234). Os mecanismos de sensibilização induzidos pelos GCs ainda são desconhecidos e cada vez mais estudos têm surgido com esse objetivo. Neste sentido, a ordem do desafio imune, se antes ou depois dos GCs, a concentração e a duração da exposição aos GCs parecem ser cruciais para determinar se esses hormônios serão sensibilizadores ou imunossupressores (123, 235).

Neste contexto, foi mostrado que concentrações elevadas de GCs *in vivo* suprimiram os níveis basais da expressão do mRNA de CX3CL1 (fractalkina), seu receptor CX3CR1 e CD22 no hipocampo de ratos, fatores que restringem respostas inflamatórias, e também aumentaram a expressão de mRNA de IL-1 β (232). Nossos resultados suportam esses achados uma vez que a exposição prolongada à CORT aumentou a secreção de pró-IL-1 β para o meio de cultura. Observamos também aumento, induzido por CORT, da secreção de caspase 1 clivada, que como já mencionado anteriormente, é um componente do complexo inflamassoma, e primariamente responsável pela maturação das citocinas IL-1 β e IL-18. Estudos recentes têm atribuído outras funções à caspase-1, dentre elas, a de regular as respostas celulares frente ao estresse (ver (236)). A secreção de caspase 1 foi vista em macrófagos após infecção por salmonela (237) e em queratinócitos após irradiação UV (238), mas o motivo pelo qual ela é secretada é ainda pouco conhecido (236). Uma possibilidade é que isso aconteça para que ocorra a maturação da pró-IL-1 β a IL-1 β no meio extracelular, propagando, assim, a cascata inflamatória (239, 240). Em nosso modelo, tanto a secreção de pró-IL-1 β quanto da enzima caspase1 clivada estão aumentadas na presença de CORT.

Além do aumento de fatores inflamatórios (pró-IL-1 β e Casp1), nós observamos a diminuição de TGF β 1 no meio extracelular. O TGF β 1 é conhecidamente um fator anti-inflamatório, induzido também pelos GCs, como componente de suas ações anti-inflamatórias. O TGF β 1 pertence a uma família de proteínas sinalizadoras multifuncionais com funções de controle do crescimento celular, diferenciação, imunossupressão e reparo após lesão tecidual. No SNC, é presumidamente secretado pela microglia e astrócitos apenas em resposta a um insulto (para revisão ver (241)). Este aumento de fatores pró-inflamatórios, diminuição de fatores anti-inflamatórios e ausência de morte celular observados em nossas condições experimentais sugerem que a CORT estaria sensibilizando (*priming*) as células em cultura.

Frank et al., (2007, 2010) observaram que o estresse por choque inescapável na cauda (IS) aumentou o número de células MHCII+ no hipocampo e giro denteado de ratos e que

estes se co-localizavam com Iba-1, marcador de microglia, e não com GFAP, marcador de astrócitos. Os autores verificaram também aumento da expressão do RNAm de MHCII e CD200 após IS no hipocampo, confirmando após isolamento da microglia, que este aumento de expressão vinha, em sua maior parte, deste tipo celular (229, 230). No estudo seguinte, no qual a CORT (2.5 mg/kg, s.c) foi injetada e as análises foram feitas 28 horas depois, verificou-se aumento de RNAm de *Tlr2* e *Il6* e aumento das proteínas IL-1 α , IL-6, IL-2, IL-4, MIP2 e RANTES (230). Mais tarde, o mesmo grupo, utilizando o mesmo modelo de estresse (IS) e analisando a mesma região do SNC, mostrou aumento de RNAm de *Ikba* e *Hmgb1*, este último também aumentado na microglia isolada pós-estresse. Além disso, também foi observado aumento das proteínas NLRP3 e NFkB, mensurados imediatamente após IS (55), caracterizando um estado de sensibilização e destacando a importância da microglia neste fenômeno.

O *priming* das células apenas é confirmado se na exposição subsequente a um estímulo inflamatório há uma exacerbação da resposta (132, 230). Desta maneira, é bem aceito que o LPS pode induzir inflamação no SNC com uma única injeção periférica (242), sendo muito utilizado como modelo de neuroinflamação. Por isso, nosso próximo passo foi confirmar se este fenômeno estava de fato ocorrendo em nosso modelo experimental.

Nossos dados sugerem que o *priming* pode ocorrer também na ausência do estímulo inflamatório, já que a simples troca para um meio mais rico em nutrientes (reperfusão) induziu a morte celular por apoptose nos grupos expostos somente à CORT em culturas mistas.

Em nosso modelo, o tratamento com LPS induziu morte celular, efeito potencializado pela exposição prévia à CORT em culturas mista de neurônios/células da glia. Neste caso, diferente do observado após a reperfusão do sistema, cuja morte celular foi principalmente por apoptose, houve predominância de células em necrose, observadas tanto pelo ensaio de LDH como pelo ensaio de AO/PI. Esses dados, aliados aos dados anteriores, sugerem que a exposição à CORT pode ter sensibilizado nossas células das culturas mistas.

Frank et al., (2007,2010), nos estudos já citados, demonstraram que tanto o estresse quanto a administração *in vivo* de CORT potencializou a resposta pró-inflamatória da microglia do hipocampo isolada e exposta, *ex vivo*, ao LPS (229, 230), estabelecendo uma relação direta entre a elevação de CORT e a sensibilização da microglia do hipocampo de ratos. Entretanto, neste estudo eles verificaram somente parâmetros inflamatórios sem

mensurar os parâmetros relacionados à morte celular. O mesmo foi visto por De Pablos et al. (2006), no qual mostraram que o estresse induz perda neuronal e potencializa a perda de astrócitos e neurônios no local da injeção, comparados aos animais não estressados e injetados com LPS, em ratos submetidos a 9 dias de estresse crônico imprevisível, seguido de desafio inflamatório com LPS intra-cortical (128). Este mesmo grupo, mais tarde (2014), mostrou que o mesmo modelo de estresse seguido de injeção de LPS na substância negra, também potencializou a perda de neurônios dopaminérgicos e astrócitos da região (227).

Pelos nossos ensaios de morte celular, não podemos afirmar qual tipo celular está em necrose ou apoptose, entretanto o fenótipo do modelo, a morfologia celular, e o fato da literatura mostrar principalmente morte neuronal e astrocitária, sugerem que essas células são as que estão provavelmente morrendo em nosso modelo.

Outro fato que corrobora a teoria de *priming* é que somente o grupo previamente exposto à CORT e exposto ao LPS, em culturas enriquecidas de neurônios, apresentou aumento de morte celular. Esta morte celular pode ser devida à presença de células da glia (23%), sendo 8% microglia e 15% astrócitos, que mesmo em menor proporção, podem ainda responder ao estímulo, já que foram previamente sensibilizadas pela CORT. Lehnardt et al. (2003) relatam que a morte neuronal depende da presença de microglia, pois o LPS não induziu morte neuronal em modelo de cultura enriquecida de neurônios, composto por 90-95% deste tipo celular (174), mas levou a extensa morte neuronal em culturas primárias mistas de ratos. Os autores verificaram também que o efeito citotóxico do LPS foi dependente da presença do receptor TLR4, já que o LPS não induziu morte em culturas derivadas de camundongos *tlr4 knockout*. Corroborando nossos dados e os de Lehnardt, Nimmervoll et al. (2013) relataram que a inflamação induzida por LPS causou rápidas alterações no padrão de disparos espontâneos dos neurônios do córtex de ratos neonatos em cultura organotípica com consequente aumento de morte dependente de citocinas secretadas pela microglia (243). Nenhum dos estudos acima citados analisou a contribuição dos outros tipos celulares nesta resposta.

Nossos dados também sugerem que a ausência, ou a drástica redução de neurônios e microglia em cultura, tornam os astrócitos insensíveis ao *priming* celular, uma vez que em culturas enriquecidas de astrócitos, não verificamos aumento de morte celular em nenhuma condição testada, corroborando os dados em que os astrócitos parecem ser mais resistentes aos efeitos da CORT quanto à morte celular induzida por este hormônio (73).

Há uma vasta literatura sugerindo que os efeitos da CORT no contexto analisado aqui são mediados pelos GR (124, 129, 227). Nossos dados parcialmente corroboram tais achados à medida que observamos diferenças entre a exposição ao RU486 e CORT em ambiente controle (sem LPS) e em ambiente inflamatório (com LPS), sugerindo que o efeito da CORT na morte celular, não é totalmente dependente de GR e que outros fatores contribuem para a morte observada. Ainda, podemos inferir que a morte celular e o tipo de morte induzido, necrose ou apoptose, podem depender do fenótipo da cultura, pois revelamos a toxicidade ao RU486 em ambiente controle, nas culturas mistas e enriquecidas de neurônios, que foi perdida na presença de LPS. Já em culturas enriquecidas de astrócitos, a toxicidade ao RU486 se manteve inclusive na presença de LPS.

Estes resultados despertam a curiosidade sobre as ações do RU486 nos diferentes tipos de células do SNC e tornam as possibilidades muito mais complexas. Sabe-se que além de ser antagonista GR, o RU486 também é antagonista dos receptores nucleares de progesterona (PRs), PR-A e PR-B (244). A progesterona também é um neuroesteroide com funções desde crescimento e diferenciação celular até um papel na formação de mielina (245). Esses receptores nucleares são constitutivamente encontrados em neurônios e induzidos nas células da glia após uma lesão (246). Além destes receptores, existem mais três receptores de membrana e dois componentes de membrana, amplificando os mecanismos de ação deste hormônio, e mais, estes últimos receptores parecem não serem bloqueados por RU486 (247). Existem dados na literatura que apontam que os astrócitos sintetizam a progesterona a partir do colesterol (248), realçando a possível importância deste hormônio no funcionamento desta célula e do SNC. Sun et al., (2016) descreve que os receptores de progesterona de membrana Pgrmc1 estão envolvidos na secreção de BDNF maduro pela glia, promovendo sobrevivência neuronal e sinaptogênese, destacando a importância da glia na neuroproteção exercida pela progesterona (249).

É importante destacar que as células das culturas mistas de neurônios/ células da glia e enriquecidas de astrócitos foram mantidas em meio de cultura suplementado com soro livre de hormônios esteroides, enquanto que as culturas enriquecidas de neurônios foram mantidas em meio rico em hormônios provenientes do composto B27, necessário para a manutenção deste fenótipo em cultura. Assim, nas culturas mistas e enriquecidas de astrócitos, onde a CORT por si só não induziu morte celular por necrose, e a única fonte de

esteroides foi o tratamento com CORT, podemos afirmar que esta morte celular observada é devido a ações desencadeadas pelo próprio fármaco, o RU486.

Embora não haja muitos estudos sobre os efeitos citotóxicos deste fármaco tanto *in vivo* quanto *in vitro*, nossos resultados sugerem que o bloqueio dos GR e PRs seja a causa primária de morte induzida pelo RU486, realçando um papel essencial destes receptores na manutenção celular frente a estímulos como a reperfusão (em nosso caso, a simples troca do meio de cultura), uma vez que não foi observado efeito citotóxico do RU486 nas 24 horas que antecedem a troca do meio. Estes efeitos parecem ser não genômicos e rápidos, mediados pela ativação de cascatas de sinalização intracelular, visto que o tratamento por apenas uma hora com LPS foi capaz de modificar tal fenômeno. Outro achado apresentado aqui que corrobora a importância dos GR e PRs é o observado em culturas enriquecidas de astrócitos, no qual em todos os grupos expostos ao RU486, houve aumento da morte. Em relação especificamente ao GR, nos astrócitos, a exposição à CORT, em ambiente inflamatório, foi protetora, uma vez que diminuiu a morte celular comparada ou mesmo grupo sem CORT, sugerindo uma possível participação de MR nesses efeitos protetores. A mesma lógica pode se aplicar às culturas enriquecidas de neurônios, pois os hormônios contidos no suplemento B27, após bloqueio dos GR/PRs pelo RU486, podem agir preferencialmente em MR.

A maior parte dos estudos mostra que exposição à CORT leva a apoptose celular e não à necrose enquanto que nossos dados sugerem que o tipo de morte celular induzido por CORT depende do estímulo posterior, por exemplo, após um estímulo “estéril”, a CORT induziria apoptose, caso contrário, provocaria necrose. Esse cenário nos levou às seguintes perguntas: será que o “*priming*” celular é o responsável por este fenômeno? Quais são os mecanismos desta mudança?

A análise aqui realizada apresenta uma maneira simplificada de mostrar o tipo de morte celular observado, uma vez que a confirmação dos diferentes tipos de morte é complexa e outros parâmetros, além dos avaliados em nosso estudo, devem ser analisados, para propriamente classificá-las dentro das categorias de apoptose e necrose. De fato, estudos sobre os diferentes tipos de morte celular vêm se expandindo rapidamente na literatura e com isso, inúmeros tipos de morte e suas características vem sendo descritas (250).

5.3 Glicocorticoides, NFkB e Interações Celulares

Uma das ações anti-inflamatórias dos GCs se dá pela inibição direta ou indireta da ativação de fatores de transcrição, principalmente do NF κ B. Porém, estudos recentes vêm mostrando que os GCs não são totalmente anti-inflamatórios, podendo mesmo ser pró-inflamatórios e que esta mudança pode depender, em parte, da ordem temporal entre a exposição à CORT, do desafio inflamatório e do tipo celular (230, 251), como já mencionado. Nosso laboratório mostrou que níveis elevados de GCs, observados após estresse crônico imprevisível ou administração de CORT, são capazes de potencializar a ativação do NF κ B induzida por LPS sistêmico no córtex frontal e hipocampo, e que este efeito é dependente da ativação de GR, pois o tratamento prévio com o RU486, antagonista de GR, bloqueia estes efeitos (124).

Nossos resultados mostraram que em células corticais derivadas de ratos neonatos, o LPS é capaz de ativar o NF κ B 1 hora após o início da exposição, entretanto, neste modelo, a exposição prévia à CORT não modificou a ativação de NF κ B induzida por LPS, não a impedindo e tampouco a potencializando. Esses resultados divergem daqueles observados em modelo de cultura cortical mista derivada de embriões de ratos, em dados prévios de nosso laboratório (125). Uma das explicações pode residir na possível diferença quanto à expressão de GR entre as culturas de embriões e a de neonatos (193, 218), também relatada no desenvolvimento do cérebro humano (37, 186, 252), já que mais ou menos GR pode acarretar em diferenças na resposta frente à exposição à CORT, observadas, por exemplo, entre as próprias regiões do SNC, nas quais GR tem expressão variável (134, 186). Entretanto, nossos resultados são claros em revelar a ausência do efeito anti-inflamatório clássico da CORT. Ainda, a adição de RU486 também não modificou a ativação de NF κ B induzida por LPS. Estes resultados corroboram a hipótese que a morte celular induzida por mifepristona, observada em nossos experimentos, é provavelmente devido à efeitos não genômicos e mais rápidos, e não devida a ativação do NF κ B, nas culturas mistas nesta condições.

Apesar de não verificarmos potencialização do NF κ B induzida pelo LPS após exposição prolongada à CORT nos experimentos realizados com lisados celulares, nós verificamos que a sensibilização à CORT de fato ocorreu, já que houve potencialização pela exposição à CORT da secreção da citocina IL-1 β ao meio extracelular, induzida pelo LPS, caracterizando um microambiente pro-inflamatório em culturas mistas.

Il-1 β é uma potente citocina capaz de ativar a imunidade inata, induzindo a expressão de várias outras citocinas e quimiocinas inflamatórias, favorecendo a infiltração de leucócitos, aumentando a atividade fagocítica e bactericida das células imunes, melhorando a atividade do sistema complemento e facilitando a ativação das respostas imunes adaptativas. As concentrações aumentadas no plasma ou no SNC de Il-1 β estão sendo correlacionadas à gravidade de doenças como Alzheimer, Parkinson, esclerose múltipla, epilepsia, depressão, ansiedade e autismo (revisado em (253)).

Em estudo recente, Zhang et al., (2018) mostraram que a injeção intracerebroventricular de Il-1 β (10 ng) por 14 dias consecutivos induziu comportamento do tipo ansioso e anedonia em ratos, com aumento da concentração sérica de CORT, de TNF α e Il-6, e diminuição de BDNF na amígdala. Além disso, os autores observaram que o tratamento destes ratos com RU486 atenuou estes parâmetros (254), sugerindo participação do GR na ação central da Il-1 β . Outros trabalhos do mesmo grupo mostraram que injeções subagudas de Il-1 β induziram a secreção de CORT, ativaram a microglia e respostas inflamatórias no hipocampo, diminuíram a secreção de acetilcolina e prejudicaram a memória (255, 256).

Além da secreção aumentada de Il-1 β pelas células, verificamos também que o LPS elevou a expressão dos RNAm da *Casp1* e *Tnf*. Não verificamos aumento na expressão de RNAm dos outros fatores pró-inflamatórios analisados (*Il-6* e *Nlrp3*) que também são comumente modulados pelo LPS nestas condições (55, 231). Esta ausência de modulação não necessariamente significa que o LPS não modulou estes genes, já que a expressão do RNAm pode ser um processo transiente, ocorrendo em momentos diferentes após o estímulo. Por exemplo, Kelly et al., (2018) mostraram que o pico de expressão do RNAm destas citocinas após injeção subcutânea de LPS em camundongos, é entre 2 a 6 horas após o tratamento com LPS, logo, podemos inferir que somente os processos mais rápidos poderiam ser observados em 1 hora de tratamento, como aqui analisados (257). Importante mencionar que nos nossos dados anteriores, onde houve potencialização da resposta inflamatória ao LPS pela CORT, em culturas embrionárias de córtex, foi observada após 2 horas do LPS, o que pode explicar o porquê não vimos esta potencialização aqui, frente à ativação do NFKB (125).

O fator de necrose tumoral α (Tnf α), assim como a Il-1 β , é uma citocina com inúmeras funções fisiológicas e seu excesso é visto em diversas doenças periféricas e centrais (258,

259). A liberação desta citocina também é potencializada pelo estresse ou exposição à CORT seguida de estímulo inflamatório com LPS (57, 229, 230).

Resultados de nosso laboratório sugerem que a exposição previa à CORT potencializa a expressão do mRNA tanto de *Il1b* quanto de *Tnf* induzida por LPS, de maneira concentração dependente, produzindo a clássica curva em U invertida dos glicocorticoides, já que doses baixas e altas de CORT são anti-inflamatórias, enquanto que concentrações intermediárias são pró-inflamatórias (260). Esse efeito também se mostrou região dependente, sendo observado no córtex frontal e hipocampo, porém não no hipotálamo de ratos (57). Nesses experimentos, entretanto, a atividade do NFKB e os efeitos decorrentes de sua ativação foram medidos utilizando um homogenato de células, fazendo, assim, com que a contribuição de cada tipo celular não pudesse ser analisada.

Como já mencionado anteriormente, a função do NFKB no SNC depende do tipo celular onde ele é ativado. Trabalhos sugerem que enquanto a ativação neuronal deste fator seria benéfica e poderia estar envolvida em processos de plasticidade neuronal e desenvolvimento celular (261), sua ativação em células da glia, principalmente na microglia, estaria envolvida nos processos inflamatórios e degenerativos, com aumento da síntese e liberação de citocinas e produção de espécies reativas de oxigênio (6, 44). Por esse motivo resolvemos verificar a localização do fator de transcrição NFKB especificamente nos diferentes tipos celulares. A localização nuclear do RELA foi utilizada como um indicativo de ativação do fator de transcrição NFKB.

Resultados de nosso laboratório sugerem uma possível ação constitutiva do NFKB em neurônios, que apresentaram uma elevada localização nuclear do RELA, tanto em ambiente basal como em ambiente inflamatório com LPS. Além disso, os neurônios não modificam esta alta localização nuclear de RELA quando estão em maior número, em cultura enriquecida de neurônios, ou quando estão em menor número, em culturas mistas, mantendo um padrão constante de RELA nuclear, independentemente da exposição à CORT ou LPS (dados não publicados). Neste sentido, a literatura descreve a ativação constitutiva do NFKB em neurônios glutamatérgicos no hipocampo e córtex cerebral, como também em outras partes do encéfalo, como amígdala, bulbo olfatório, cerebelo e hipotálamo; e sugere ainda a participação do NFKB no aprendizado e na memória, plasticidade estrutural, diferenciação celular, neurogênese e neuroproteção (261).

Seguindo o raciocínio de separação da resposta por tipo celular, o mesmo foi realizado para a localização nuclear de RELA em microglia. Dados anteriores de nosso laboratório mostraram que este tipo celular apresenta baixa localização nuclear de RELA em ambiente controle (sem LPS), que se torna praticamente 100% após adição de LPS, independentemente do tratamento prévio com CORT e se em ambiente com mais astrócitos (culturas mistas) ou mais neurônios (enriquecida de neurônios) (dados não publicados). Esses resultados demonstram que a microglia é extremamente sensível ao insulto inflamatório com LPS, fato amplamente descrito na literatura (229, 230, 235).

Enquanto os neurônios e a microglia não apresentaram diferenças nas respostas frente a variações das diferentes composições fenotípicas, os astrócitos mostraram-se bastante sensíveis aos GCs. Nossos dados anteriores demonstraram que a localização nuclear de RELA variou entre os modelos de cultura mista e enriquecida de astrócitos nas mesmas condições analisadas para os neurônios e microglia (dados não publicados). Por esse motivo, neste estudo voltamos a nossa atenção a este tipo celular.

Como pressuposto e corroborando os dados anteriores, os astrócitos foram extremamente sensíveis à CORT e à mudança de microambiente dependente do fenótipo da cultura, como também entre os ambientes controles e inflamatórios, com adição de LPS, em relação à localização nuclear de RELA. Esses resultados são bastante interessantes, à medida que a exposição à CORT resulta em uma ação anti-inflamatória clássica nos astrócitos em ambiente controle (sem LPS), pois houve redução da localização nuclear de RELA, em diferentes fenótipos de cultura.

Os efeitos da CORT mudam drasticamente na presença de LPS e são modulados pela proporção de células em cultura. Van Loo et al. (2009) em modelo de cultura primária de glia de encéfalo camundongos neonatos, observaram que a exposição prévia à DEX não foi capaz de reduzir a localização nuclear de RELA em culturas tratadas com IL-1 β (262), igualmente ao observado por nós em culturas mistas. A semelhança entre o nosso modelo de cultura mista e o modelo de cultura de glia de van Loo é a presença de 10% de microglia. Esses dados estão em linha com nossos resultados anteriores onde não vemos efeito anti-inflamatório da CORT quando em ambiente inflamatório. Ademais, esses resultados corroboram dados da literatura que relatam que a microglia pode atuar modulando a resposta inflamatória dos astrócitos ao secretar citocinas que irão por sua vez, ativar os astrócitos (40, 46, 133, 195, 229).

Entretanto, se isso fosse verdade absoluta, em nossa cultura enriquecida de astrócitos, no qual temos 5% de microglia, nós veríamos a mesma resposta com bloqueio ou falta do efeito anti-inflamatório pela CORT. Nossos resultados contradizem esta hipótese, pois verificamos que a CORT manteve seu efeito anti-inflamatório, em relação a localização nuclear de RELA, mesmo em ambiente inflamatório. Esses resultados nos deixam algumas perguntas: será que a redução pela metade da microglia já seria suficiente para mudar completamente a resposta à CORT dos astrócitos? Ou será que ausência da comunicação com neurônios é mais significativa para esta resposta? Ou ainda, somente quando há presença dos três tipos celulares, a microglia modula os astrócitos? Ou são os neurônios que modulam a resposta dos astrócitos nestas condições?

Os astrócitos eram tidos como elementos somente de suporte como já mencionado, mas essa ideia vem mudando ao longo do tempo e inúmeros estudos vêm descrevendo novas funções fisiológicas e atribuindo a contribuição dos astrócitos em várias doenças neuropsiquiátricas (74, 263). Nesse sentido, ao analisar a literatura científica do NFkB neste tipo celular, no contexto inflamatório, esse fator está associado a ações pró-inflamatórias após trauma da medula espinhal (264) e em modelo de EAE (79) em camundongos, pois ambos os estudos verificaram melhora na recuperação dos animais quando inibiram transgenicamente o NFkB em astrócitos. Outro estudo relata que há presença de NFkB em astrócitos do córtex de ratos após traumatismo craniano por percussão fluida (265) que está relacionada ao inchaço dos astrócitos neste modelo. Além disso, o aumento de NFkB em astrócitos foi correlacionado à patogênese da doença de Huntington (266).

Muito pouco se sabe sobre como os astrócitos se adaptam ao estresse celular induzido pelos GCs. Existem alguns trabalhos na literatura científica que relatam algumas ações do tratamento com GCs em astrócitos, já descritos anteriormente, como por exemplo, a inibição da proliferação (73) e diminuição do número de astrócitos (130). O estresse crônico pode ativar os astrócitos e aumentar a expressão e síntese de GFAP (267) ou pode causar atrofia, com menos ramificações e menos GFAP, relatado em encéfalos de ratos submetidos a estresse crônico imprevisível ou psicossocial (203, 268). Recentemente, Champeil-Potokar et al. (2016) mostraram que o tratamento prolongado (2 e 6 dias) com CORT (100nM) de culturas enriquecidas de astrócitos estimulou a reciclagem de glutamato, aumentando sua recaptação pelos astrócitos e a síntese da enzima glutamina sintetase, deste modo, controlando a quantidade de glutamato na fenda sináptica e promovendo proteção aos

neurônios contra a excitotoxicidade glutamatérgica, além também de relatarem alterações no citoesqueleto dos astrócitos após tratamento com CORT (269). Os mecanismos celulares ainda não estão claros e demandam mais estudos para elucidar como os GCs e o estresse podem regular as funções dos astrócitos, tanto as aumentando como também as diminuindo.

Diante dos efeitos observados com CORT nos astrócitos, verificamos se os mesmos eram mediado por GR. Nas culturas enriquecidas de astrócitos, em ambiente inflamatório, o bloqueio de GR pelo RU486 potencializou a localização nuclear de RELA, que foi revertida pela exposição concomitante à CORT, sugerindo que nestas condições a ação anti-inflamatória de CORT, nos astrócitos, é mediada por GR. Já nos astrócitos de culturas mistas, também em ambiente inflamatório, o bloqueio de GR atenuou a localização nuclear de RELA induzida por LPS, sugerindo o oposto do que vimos nas culturas enriquecidas de astrócitos, ou seja, um efeito pró-inflamatório de CORT também mediado por GR. Esses dados sugerem, ainda, que possa haver um *crosstalk* entre o receptor GR e o NFKB, pois o GR participaria da manutenção da localização nuclear do RELA induzida por LPS. Rao et al. (2011) relata que a co-ativação de GR e NFKB modifica o repertório de genes regulados por cada um e esta associação resulta em novos sítios de regulação no DNA, alterando as vias de sinalização de ambos (270). Esse *crosstalk* pode ocorrer em vários momentos, desde a translocação nuclear à transcrição dos genes, já que em muitos deles as vias se sobrepõem com uso comum de co-chaperonas, co-ativadores e vias de sinalização como as quinases p38 MAPK, JNK, PKC, PKA e ERK1/2. As interações GR-NFKB são uma via de mão dupla, já que pode existir a repressão de GR na via NFKB e do NFKB na via do GR. Essas interações vêm sendo creditadas como possíveis mecanismos de resistência aos glicocorticoides (revisado em (97)). Se isso de fato ocorre, este fenômeno explicaria, pelo menos em parte, as diferentes respostas encontradas em nosso estudo.

Seguindo esse racional, após a imunoprecipitação de GR, verificamos a presença do complexo GR-RELA em todos os grupos analisados, corroborando dados da literatura os quais relatam que, mesmo na ausência do ligante, o GR pode interagir com as subunidades RELA e p50 do NFKB, assim como também pode interagir com a proteína inibitória do NFKB (Ikb) (271), evidenciando a estreita proximidade entre as vias de sinalização do GR e NFKB. Nossos dados mostram que o tratamento com LPS aumenta a expressão do complexo GR-RELA nas células de cultura mista, um efeito não modulado pela exposição prévia à CORT. Por

outro lado, em culturas enriquecidas de astrócitos, verificamos a presença do complexo GR-RELA, mas ele não foi modulado por nenhum tratamento. Não achamos dados na literatura científica da formação desse complexo em astrócitos. Nossos resultados dão indícios que as interações GR-NFKB nestes modelos de cultura podem realmente acontecer e são diferentes frente à composição fenotípica.

Outro resultado interessante encontrado nas culturas mistas foi o fato de que, em ambiente controle sem LPS, o tratamento prévio com RU486 aumentou a localização nuclear do NFKB em astrócitos somente na presença de CORT, e o contrário foi visto nas culturas enriquecidas de astrócitos, sugerindo que o bloqueio de GR pode levar os GCs a atuarem em outros receptores, como por exemplo, o MR, e este por sua vez poderia aumentar a localização nuclear do RELA. De fato, foi mostrado que o bloqueio dos GR pode exacerbar a ação dos MR também presentes (272, 273). Crochemore et al., (2005) mostraram, em cultura hipocampal de ratos neonatos, que a aldosterona, agonista dos MR, diminui o número de neurônios em apoptose induzida pelo tratamento com DEX, enquanto que a administração do antagonista de MR, a espironolactona, aumenta o número de neurônios em apoptose (214). Entretanto, em uma abordagem diferente, Ogita et al., (2012) relataram uma ação pró-inflamatória de MR no hipocampo de camundongos injetados perifericamente com TMT (trimetilestanho), conhecido por causar degeneração neuronal. O TMT, concomitante com aldosterona ou mifepristona, teve sua neurotoxicidade aumentada, enquanto que no tratamento concomitante com espironolactona, a neurotoxicidade do TMT foi reduzida (274). Esses trabalhos mostram, em sua maior parte, os efeitos opostos destes dois receptores, corroborando a teoria de que o balanço da ativação entre MR/GR pode ser essencial para o efeito final, pressupondo que a ação conjunta de ambos mantém a homeostase, enquanto que a ativação preferencial de um ou outro leva a doenças ou proteção (273, 275). O “desbalanço” entre os receptores no córtex pré-frontal e regiões hipotalâmicas vem sendo implicado como uma das causas da depressão maior em pacientes (44). Animais SHR são ratos que desenvolvem espontaneamente a hipertensão e são utilizados para estudar esta doença. Brocca et al., (2017) confirmaram que este modelo possui 2.5 vezes mais RNAm de MR, além de possuir um aumento de imunorreatividade para MR em células GR+ no hipocampo comparada a ratos controle. O estudo ainda correlaciona este aumento de MR hipocampal à expressão aumentada de fatores pró-inflamatórios como a enzima Cox-2 e a proteína NLRP3 (276). Outros estudos verificaram que o uso de

antagonista de MR ou deleção genética do MR em células mieloides é protetor em modelos de isquemia em camundongos (277, 278).

Outra possibilidade que poderia explicar nossos resultados é a formação de heterodímeros de GR-MR, já que ambos GR e MR são observados na mesma célula (astrócito) em nosso modelo de cultura mista. A formação dos heterodímeros MR/GR foi mostrada *in vitro* (279-282) e foi relatada como dependentes de concentrações mais altas de CORT (283), ou seja, os MR, com 10 vezes mais afinidade que os GR pela CORT, formam predominantemente homodímeros em baixas concentrações, entretanto, em altas concentrações de CORT, como em situações de estresse e nos picos circadianos, a ocupação de GR aumenta, assim como a probabilidade da formação de heterodímeros (280, 283). Ademais, esses heterodímeros podem ocupar o mesmo GRE em hipocampo (284). Recentemente, Pressman et al. (2016) amplificaram as possibilidades e mostraram que os GR se ligam como dímeros e até tetrâmeros predominantemente às regiões promotoras no DNA (285).

Em nossos modelos, de fato, observamos a presença do complexo GR-MR em todos os grupos de tratamento, da mesma forma ao visto com p65. De maneira muito interessante, nossos resultados mostraram que a exposição prévia à CORT parece facilitar a formação desses heterodímeros num ambiente inflamatório, porém não basal, uma vez que presença do complexo GR-MR estava aumentada nos grupos expostos à CORT e tratados com LPS em culturas mistas de neurônios/ células da glia. A presença do complexo GR-MR foi observada em todos os grupos de tratamento em culturas enriquecidas de astrócitos, mas foi não observado modulação frente aos tratamentos. Mais experimentos estão sendo realizados para a confirmação desses achados e será confirmada posteriormente.

Ainda pouco se sabe sobre o resultado biológico desse processo, mas a possibilidade da formação de heterodímeros, e mais ainda tetrâmeros, pode ampliar muito a diversidade funcional dos receptores, já que os GCs modulam uma grande quantidade de genes (280, 286).

Em vista disto, analisamos os fatores relacionados ao funcionamento do GR (*Nr3c1*) como sua própria expressão, além da expressão da enzima 11 β HSD1 (*Hsd11b1*), que aumentaria a concentração *in situ* de CORT, pois ela converte a cortisona, inativa, em corticosterona, ativa, mas nenhum dos dois genes foi modulado em ambiente inflamatório com LPS em ambos os fenótipos analisados (287). A falta de regulação do próprio gene nos

grupos expostos à CORT pode indicar que a função destes receptores está comprometida, já que estudos relatam que há uma diminuição na expressão de GR após estresse crônico ou na presença de altas concentrações de GCs (288-291).

De maneira inesperada, porém muito interessante, a falta de responsividade do GR foi confirmada, pois a expressão dos genes *Gilz* e *Fkbp5*, efeitos genômicos clássicos decorrentes ativação de GR, não foram moduladas pela exposição à CORT em culturas mista de neurônios/células da glia, mas foi visto nas culturas enriquecidas de astrócitos (292, 293). Esses resultados sugerem fortemente que o GR em culturas mistas tem sua transcrição genômica prejudicada, por exemplo, pela presença de heterodímeros MR/GR, e por isso vemos potencialização de fatores inflamatórios pela exposição à CORT em culturas mistas, o que não acontece em culturas enriquecidas de astrócitos.

Nosso próximo passo para estudar essas interações celulares foi eliminar a influência da microglia e manter a neuronal das culturas mistas de neurônios/células da glia, já que obtivemos indícios que a microglia pode modular a respostas inflamatórias neste modelo, como já mencionado. Com o uso da minociclina, inibidor da microglia muito utilizado, observamos que houve considerável diminuição da localização nuclear de RELA induzida por LPS em astrócitos de culturas mistas, mas não as reverteu a patamares controle. Esses resultados sugerem que a microglia realmente participa ativamente da resposta do astrócitos ao LPS, corroborando nossos dados anteriores e dados da literatura, no qual a resposta dos astrócitos ao LPS pode depender da presença de uma microglia funcional (41). Recentemente, Norden et al. (2016) mostrou que existe uma indução temporal na expressão de citocinas pró-inflamatórias acompanhada primeiramente pelo aumento da imunorreatividade de Iba-1 e em seguida pelo aumento de GFAP, após desafio sistêmico com LPS em camundongos (294).

Nossos dados também sugerem a existência de outros mecanismos além da potencialização exercida pela microglia, já que a inibição deste tipo celular não foi capaz de reverter totalmente os efeitos observados. Esses mecanismos seriam também provavelmente dependente de CORT nesse complexo balanço de sinalização nos astrócitos. Também não podemos descartar a ação da própria minociclina em astrócitos (126), à medida que verificamos que somente o uso da minociclina em ambiente controle também elevou a localização nuclear de RELA em astrócitos, revertida pela exposição à CORT.

Coincidentemente, esses resultados são similares ao encontrado com o uso de RU486 em ambiente controle de culturas enriquecidas de astrócitos.

Existem alguns trabalhos que questionam a especificidade da minociclina na inibição da microglia e sugerem, inclusive, que ela teria um efeito em astrócitos (295, 296). Deste modo, podemos inferir que a interação dos astrócitos com os outros tipos celulares é importante para que essas células respondam aos estímulos inflamatórios induzidos por LPS, como também é importante na modulação da sinalização pelos GCs, ora pró-inflamatória, ora anti-inflamatória, nestas condições experimentais. Os mecanismos destas interações requerem mais estudos e objetivamos alcançá-los nos nossos próximos passos.

Como já mencionado anteriormente, tanto os neurônios como a microglia, podem modular a resposta dos astrócitos via sinais “on/off” físicos e humorais (52). Em nossos modelos e tratamentos, não observamos a modulação dos fatores “on/off” que controlam a ativação/inibição de neurônio e microglia por contato célula-célula, sugerindo que a CORT ou o LPS, nessas condições, não modulem tal controle e que outros mecanismos sejam mais importantes.

Além dos fatores diretos, outros fatores, como os fatores humorais, também podem influenciar a resposta dos astrócitos, que depende das junções do tipo GAP (GJC), compostas majoritariamente pelas conexinas 30 e 43. A função das Cx43 em danos no SNC vem sendo estudada e atualmente existem duas vertentes conflitantes entre os efeitos neuroprotetores, como tamponamento, via dissipação entre as células, de substâncias potencialmente excitotóxicas após dano tecidual por isquemia; e os efeitos neurotóxicos, relacionadas à propagação de gradientes iônicos e morte neuronal (297, 298).

Nossos resultados mostraram que a CORT aumenta a expressão de CX43, tanto no ambiente controle como no ambiente inflamatório. Esses dados são diferentes dos mencionados por Sun et al, 2012, no qual o estresse crônico por 28 dias diminui a expressão de Cx43 no córtex pré-frontal, que é revertida pelo uso de antidepressivos, como a fluoxetina. Vários estudos com estresse também reportaram diminuição dessa proteína (para revisão ver (299)), entretanto, vários outros verificaram aumento das conexinas, tanto Cx 30 como Cx43 mas principalmente cx43, em encéfalos de pacientes com Alzheimer e em modelos murinos desta doença inclusive, ao redor das placas de proteína β -amiloide (36, 300, 301). Em nosso caso aqui reportado, como não houve modulação entres os ambientes nem entre os fenótipos de cultura, é possível que este aumento não seja o mecanismo de

ação do fenômeno observado, o que não quer dizer que não podem ter os influenciados. Ainda pouco se sabe sobre o efeito biológico desta modulação e os resultados ainda são contraditórios.

De uma maneira geral, nossos resultados mostram que a sinalização dos GCs no sistema nervoso central é extremamente complexa, cuja manipulação pode levar a efeitos benéficos ou deletérios. Se ocorrerá um ou outro depende das concentrações, duração da exposição, microambiente e do estímulo associado à presença desses hormônios. Nossos resultados colocam os astrócitos como peças fundamentais no direcionamento de tais ações e mais ainda, mostram a importância dos GR nas modulações mediadas pela CORT (figura 5.1). Outra contribuição importante do nosso trabalho é que se soma à complexidade inerente da via é que a interação dos GR com outras proteínas, como a subunidade RELA do NFKB, e até mesmo outros receptores, como os MR, nos diferentes tipos celulares pode predizer as ações desses hormônios no sistema nervoso central. Assim, conhecer as particularidades de suas sinalizações é fundamental para que possamos identificar pontos chaves passíveis de manipulações específicas, nos permitindo controlar, no organismo, os resultados dessas manipulações em cada situação.

Figura 5.1. Astrócitos: centrais regulatórias

Esquema ilustrando as possibilidades de interação dos astrócitos. Astrócitos reativos interagem com inúmeros tipos de células, recebendo (a), integrando, sinalizando e transmitindo (b) sinais moleculares no SNC. Fonte: Pekny et al., (2016).(302)

6 CONCLUSÃO

- Astrócitos em cultura mista de neurônios/células da glia possuem os receptores GR, MR, NLRP3 e TLR4, bem como Conexina 43, canais das junções tipo GAP;
- A exposição prolongada à corticosterona potencializou a morte celular induzida por LPS em cultura mista de neurônios/células da glia, devido provavelmente ao *priming* celular observado pelo aumento da secreção de fatores pró-inflamatórios (pró-IL-1 β e Casp1) e diminuição dos fatores anti-inflamatórios (TGF β 1) no meio de cultivo, e da expressão aumentada dos genes pró-inflamatórios (*Il-1 β* e *Tnf*) em células de culturas mista de neurônios/células da glia;
- O tipo de morte celular induzido pela exposição à corticosterona muda de apoptose em ambiente controle, para necrose em ambiente inflamatório com LPS, em culturas mistas de neurônios/células da glia;
- O bloqueio dos receptores de glicocorticoides pelo RU486 deflagra respostas diferentes em relação à morte celular. Em ambiente controle, sem LPS, o RU486 induz morte celular por necrose após a troca do meio de cultura, e em ambiente inflamatório, não modifica a morte celular induzida por LPS em células de culturas mista de neurônios/células da glia e enriquecidas de neurônios, mas não em enriquecidas de astrócitos. Portanto, os efeitos da CORT na viabilidade celular são parcialmente dependentes de GR;
- A função genômica dos receptores de glicocorticoides está comprometida em células de culturas primárias mistas de neurônios/células da glia expostas à corticosterona, pois não induz expressão dos genes *Gilz* e *Fkbp5*.
- Os receptores de glicocorticoides e/ou de progesterona são essenciais para a sobrevivência das células em culturas enriquecida de astrócitos.
- A corticosterona não exerceu sua atividade anti-inflamatória clássica nas células em cultura mista, uma vez que este hormônio não foi capaz de diminuir a ativação do NF κ B induzida pelo LPS.
- Os astrócitos se mostraram altamente responsivos ao LPS quanto à localização nuclear de RELA;
- A corticosterona teve suas funções anti-inflamatórias mantidas nos astrócitos de culturas enriquecida de astrócitos, principalmente em ambiente inflamatório;

- As interações celulares são necessárias para a ação dos astrócitos uma vez que astrócitos de culturas enriquecidas de neurônios e enriquecidas de astrócitos foram menos sensíveis ao LPS do que os mesmos em culturas mistas;
- A microglia participa da resposta dos astrócitos ao LPS em relação à localização nuclear do RELA;
- Os fatores “on/off” analisados, como também a alarmina HMGB1, não foram modulados e parecem não participarem dos fenômenos acima descritos;
- A corticosterona leva ao aumento da proteína Cx43 (junções do tipo GAP).

REFERÊNCIAS*

1. Iwasaki A, Medzhitov R. Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nat Immunol.* 2015 Apr;16(4):343-53.
2. Rankin LC, Artis D. Beyond Host Defense: Emerging Functions of the Immune System in Regulating Complex Tissue Physiology. *Cell.* 2018 Apr 19;173(3):554-67.
3. Schwartz M, Baruch K. The resolution of neuroinflammation in neurodegeneration: leukocyte recruitment via the choroid plexus. *EMBO J.* 2014 Jan 7;33(1):7-22.
4. Shishido SN, Varahan S, Yuan K, Li X, Fleming SD. Humoral innate immune response and disease. *Clin Immunol.* 2012 Aug;144(2):142-58.
5. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature.* 2008 Jul 24;454(7203):428-35.
6. Saijo K, Glass CK. Microglial cell origin and phenotypes in health and disease. *Nat Rev Immunol.* 2011 Nov;11(11):775-87.
7. Akira S. Innate immunity and adjuvants. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. 2011 Oct 12;366(1579):2748-55.
8. Palm NW, Medzhitov R. Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity. *Immunological reviews.* [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. 2009 Jan;227(1):221-33.
9. Strowig T, Henao-Mejia J, Elinav E, Flavell R. Inflammasomes in health and disease. *Nature.* [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. 2012 Jan 19;481(7381):278-86.
10. Rathinam VA, Vanaja SK, Fitzgerald KA. Regulation of inflammasome signaling. *Nat Immunol.* [Research Support, N.I.H., Extramural Review]. 2012 Apr;13(4):333-2.
11. Henao-Mejia J, Elinav E, Strowig T, Flavell RA. Inflammasomes: far beyond inflammation. *Nat Immunol.* [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. 2012 Apr;13(4):321-4.
12. Yang CS, Shin DM, Jo EK. The Role of NLR-related Protein 3 Inflammasome in Host Defense and Inflammatory Diseases. *International neurology journal.* 2012 Mar;16(1):2-12.
13. Chovatiya R, Medzhitov R. Stress, inflammation, and defense of homeostasis. *Mol Cell.* 2014 Apr 24;54(2):281-8.
14. Medzhitov R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell.* [Historical Article]. 2010 Mar 19;140(6):771-6.
15. Glass CK, Saijo K, Winner B, Marchetto MC, Gage FH. Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell.* 2010 Mar 19;140(6):918-34.
16. Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci.* 1999 Sep;22(9):391-7.
17. Feuerstein GZ, Wang X, Barone FC. The role of cytokines in the neuropathology of stroke and neurotrauma. *Neuroimmunomodulation.* 1998 May-Aug;5(3-4):143-59.

*De acordo com: Estilo Vancouver

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: https://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

18. Floyd RA. Neuroinflammatory processes are important in neurodegenerative diseases: an hypothesis to explain the increased formation of reactive oxygen and nitrogen species as major factors involved in neurodegenerative disease development. *Free Radic Biol Med*. 1999 May;26(9-10):1346-55.
19. Gonzalez-Scarano F, Baltuch G. Microglia as mediators of inflammatory and degenerative diseases. *Annu Rev Neurosci*. 1999;22:219-40.
20. Nguyen MD, Julien JP, Rivest S. Innate immunity: the missing link in neuroprotection and neurodegeneration? *Nat Rev Neurosci*. 2002 Mar;3(3):216-27.
21. Allan SM, Rothwell NJ. Cytokines and acute neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci*. 2001 Oct;2(10):734-44.
22. Wyss-Coray T, Mucke L. Inflammation in neurodegenerative disease--a double-edged sword. *Neuron*. 2002 Aug 1;35(3):419-32.
23. Waisman A, Liblau RS, Becher B. Innate and adaptive immune responses in the CNS. *Lancet Neurol*. 2015 Sep;14(9):945-55.
24. Tang SC, Arumugam TV, Xu X, Cheng A, Mughal MR, Jo DG, et al. Pivotal role for neuronal Toll-like receptors in ischemic brain injury and functional deficits. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Aug 21;104(34):13798-803.
25. Buchanan MM, Hutchinson M, Watkins LR, Yin H. Toll-like receptor 4 in CNS pathologies. *J Neurochem*. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. 2010 Jul;114(1):13-27.
26. Jung DY, Lee H, Jung BY, Ock J, Lee MS, Lee WH, et al. TLR4, but not TLR2, signals autoregulatory apoptosis of cultured microglia: a critical role of IFN-beta as a decision maker. *J Immunol*. [Comparative Study Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2005 May 15;174(10):6467-76.
27. Hanamsagar R, Hanke ML, Kielian T. Toll-like receptor (TLR) and inflammasome actions in the central nervous system. *Trends in immunology*. 2012 Jul;33(7):333-42.
28. Busillo JM, Azzam KM, Cidlowski JA. Glucocorticoids sensitize the innate immune system through regulation of the NLRP3 inflammasome. *J Biol Chem*. [Research Support, N.I.H., Intramural]. 2011 Nov 4;286(44):38703-13.
29. Robblee MM, Kim CC, Porter Abate J, Valdearcos M, Sandlund KL, Shenoy MK, et al. Saturated Fatty Acids Engage an IRE1alpha-Dependent Pathway to Activate the NLRP3 Inflammasome in Myeloid Cells. *Cell Rep*. 2016 Mar 22;14(11):2611-23.
30. Dostert C, Petrilli V, Van Bruggen R, Steele C, Mossman BT, Tschopp J. Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science*. 2008 May 2;320(5876):674-7.
31. Liston A, Masters SL. Homeostasis-altering molecular processes as mechanisms of inflammasome activation. *Nat Rev Immunol*. 2017 Mar;17(3):208-14.
32. Awad F, Assrawi E, Louvrier C, Jumeau C, Georgin-Lavialle S, Grateau G, et al. Inflammasome biology, molecular pathology and therapeutic implications. *Pharmacol Ther*. 2018 Jul;187:133-49.
33. McCarthy GM, Bridges CR, Blednov YA, Harris RA. CNS cell-type localization and LPS response of TLR signaling pathways. *F1000Res*. 2017;6:1144.
34. Herculano-Houzel S. The glia/neuron ratio: how it varies uniformly across brain structures and species and what that means for brain physiology and evolution. *Glia*. 2014 Sep;62(9):1377-91.

35. Bandeira F, Lent R, Herculano-Houzel S. Changing numbers of neuronal and non-neuronal cells underlie postnatal brain growth in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Aug 18;106(33):14108-13.
36. Giaume C, Koulakoff A, Roux L, Holcman D, Rouach N. Astroglial networks: a step further in neuroglial and gliovascular interactions. *Nat Rev Neurosci*. 2010 Feb;11(2):87-99.
37. Giaume C. Astroglial Wiring is Adding Complexity to Neuroglial Networking. *Front Neuroenergetics*. 2010;2.
38. Cerbai F, Lana D, Nosi D, Petkova-Kirova P, Zecchi S, Brothers HM, et al. The neuron-astrocyte-microglia triad in normal brain ageing and in a model of neuroinflammation in the rat hippocampus. *PLoS One*. 2012;7(9):e45250.
39. Jha MK, Jeon S, Suk K. Glia as a Link between Neuroinflammation and Neuropathic Pain. *Immune Netw*. 2012 Apr;12(2):41-7.
40. Posfai B, Cserep C, Orsolits B, Denes A. New Insights into Microglia-Neuron Interactions: A Neuron's Perspective. *Neuroscience*. 2018 May 19.
41. Holm TH, Draeby D, Owens T. Microglia are required for astroglial Toll-like receptor 4 response and for optimal TLR2 and TLR3 response. *Glia*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2012 Apr;60(4):630-8.
42. Kim WG, Mohny RP, Wilson B, Jeohn GH, Liu B, Hong JS. Regional difference in susceptibility to lipopolysaccharide-induced neurotoxicity in the rat brain: role of microglia. *J Neurosci*. 2000 Aug 15;20(16):6309-16.
43. Kreutzberg GW. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci*. 1996 Aug;19(8):312-8.
44. Marin-Teva JL, Cuadros MA, Martin-Oliva D, Navascues J. Microglia and neuronal cell death. *Neuron Glia Biol*. 2011 Feb;7(1):25-40.
45. Glezer I, Simard AR, Rivest S. Neuroprotective role of the innate immune system by microglia. *Neuroscience*. 2007 Jul 29;147(4):867-83.
46. Ransohoff RM. A polarizing question: do M1 and M2 microglia exist? *Nat Neurosci*. 2016 Jul 26;19(8):987-91.
47. Zhang X, Shan P, Qureshi S, Homer R, Medzhitov R, Noble PW, et al. Cutting edge: TLR4 deficiency confers susceptibility to lethal oxidant lung injury. *J Immunol*. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. 2005 Oct 15;175(8):4834-8.
48. Ouchi Y, Yoshikawa E, Sekine Y, Futatsubashi M, Kanno T, Ogusu T, et al. Microglial activation and dopamine terminal loss in early Parkinson's disease. *Ann Neurol*. 2005 Feb;57(2):168-75.
49. Gerhard A, Pavese N, Hotton G, Turkheimer F, Es M, Hammers A, et al. In vivo imaging of microglial activation with [11C](R)-PK11195 PET in idiopathic Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*. 2006 Feb;21(2):404-12.
50. Pradhan S, Andreasson K. Commentary: Progressive inflammation as a contributing factor to early development of Parkinson's disease. *Exp Neurol*. 2013 Mar;241:148-55.
51. Mizuno T, Doi Y, Mizoguchi H, Jin S, Noda M, Sonobe Y, et al. Interleukin-34 selectively enhances the neuroprotective effects of microglia to attenuate oligomeric amyloid-beta neurotoxicity. *The American journal of pathology*. 2011 Oct;179(4):2016-27.
52. Biber K, Neumann H, Inoue K, Boddeke HW. Neuronal 'On' and 'Off' signals control microglia. *Trends Neurosci*. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. 2007 Nov;30(11):596-602.

53. Boncompagni S, Arthurton L, Akujuru E, Pearson T, Steverding D, Protasi F, et al. Membrane glucocorticoid receptors are localised in the extracellular matrix and signal through the MAPK pathway in mammalian skeletal muscle fibres. *J Physiol*. 2015 Jun 15;593(12):2679-92.
54. Mizuno T, Kawanokuchi J, Numata K, Suzumura A. Production and neuroprotective functions of fractalkine in the central nervous system. *Brain Res*. 2003 Jul 25;979(1-2):65-70.
55. Weber MD, Frank MG, Tracey KJ, Watkins LR, Maier SF. Stress induces the danger-associated molecular pattern HMGB-1 in the hippocampus of male Sprague Dawley rats: a priming stimulus of microglia and the NLRP3 inflammasome. *J Neurosci*. 2015 Jan 7;35(1):316-24.
56. Pabon MM, Bachstetter AD, Hudson CE, Gemma C, Bickford PC. CX3CL1 reduces neurotoxicity and microglial activation in a rat model of Parkinson's disease. *J Neuroinflammation*. 2011;8:9.
57. Munhoz CD, Sorrells SF, Caso JR, Scavone C, Sapolsky RM. Glucocorticoids exacerbate lipopolysaccharide-induced signaling in the frontal cortex and hippocampus in a dose-dependent manner. *J Neurosci*. 2010 Oct 13;30(41):13690-8.
58. Wang J, Gan Y, Han P, Yin J, Liu Q, Ghanian S, et al. Ischemia-induced Neuronal Cell Death Is Mediated by Chemokine Receptor CX3CR1. *Scientific reports*. 2018 Jan 11;8(1):556.
59. Suzumura A. Neuron-microglia interaction in neuroinflammation. *Curr Protein Pept Sci*. 2013 Feb;14(1):16-20.
60. Tian L, Ma L, Kaarela T, Li Z. Neuroimmune crosstalk in the central nervous system and its significance for neurological diseases. *J Neuroinflammation*. 2012;9:155.
61. Koning N, Swaab DF, Hoek RM, Huitinga I. Distribution of the immune inhibitory molecules CD200 and CD200R in the normal central nervous system and multiple sclerosis lesions suggests neuron-glia and glia-glia interactions. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 2009 Feb;68(2):159-67.
62. Sundahl N, Bridelance J, Libert C, De Bosscher K, Beck IM. Selective glucocorticoid receptor modulation: New directions with non-steroidal scaffolds. *Pharmacol Ther*. 2015 Aug;152:28-41.
63. Lyons A, Downer EJ, Crotty S, Nolan YM, Mills KH, Lynch MA. CD200 ligand receptor interaction modulates microglial activation in vivo and in vitro: a role for IL-4. *J Neurosci*. 2007 Aug 1;27(31):8309-13.
64. Volterra A, Meldolesi J. Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat Rev Neurosci*. 2005 Aug;6(8):626-40.
65. Magistretti PJ. Neuron-glia metabolic coupling and plasticity. *Experimental physiology*. 2011 Apr;96(4):407-10.
66. Tikka T, Fiebich BL, Goldsteins G, Keinänen R, Koistinaho J. Minocycline, a tetracycline derivative, is neuroprotective against excitotoxicity by inhibiting activation and proliferation of microglia. *J Neurosci*. 2001 Apr 15;21(8):2580-8.
67. Rash JE, Yasumura T, Dudek FE, Nagy JI. Cell-specific expression of connexins and evidence of restricted gap junctional coupling between glial cells and between neurons. *J Neurosci*. 2001 Mar 15;21(6):1983-2000.
68. Allaman I, Belanger M, Magistretti PJ. Astrocyte-neuron metabolic relationships: for better and for worse. *Trends Neurosci*. 2011 Feb;34(2):76-87.
69. Scemes E, Spray DC. Extracellular K(+) and Astrocyte Signaling via Connexin and Pannexin Channels. *Neurochemical research*. 2012 Apr 6.

70. Scemes E, Spray DC. Extracellular K(+) and astrocyte signaling via connexin and pannexin channels. *Neurochemical research*. 2012 Nov;37(11):2310-6.
71. Bennett MV, Garre JM, Orellana JA, Bukauskas FF, Nedergaard M, Saez JC. Connexin and pannexin hemichannels in inflammatory responses of glia and neurons. *Brain Res*. 2012 Dec 3;1487:3-15.
72. Wallraff A, Kohling R, Heinemann U, Theis M, Willecke K, Steinhauser C. The impact of astrocytic gap junctional coupling on potassium buffering in the hippocampus. *J Neurosci*. 2006 May 17;26(20):5438-47.
73. Yu S, Yang S, Holsboer F, Sousa N, Almeida OF. Glucocorticoid regulation of astrocytic fate and function. *PLoS One*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2011;6(7):e22419.
74. Sofroniew MV. Astrogliosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014 Nov 7;7(2):a020420.
75. Almad A, Maragakis NJ. A stocked toolbox for understanding the role of astrocytes in disease. *Nat Rev Neurol*. 2018 Jun;14(6):351-62.
76. Middeldorp J, Hol EM. GFAP in health and disease. *Prog Neurobiol*. 2011 Mar;93(3):421-43.
77. Cekanaviciute E, Fathali N, Doyle KP, Williams AM, Han J, Buckwalter MS. Astrocytic transforming growth factor-beta signaling reduces subacute neuroinflammation after stroke in mice. *Glia*. 2014 Aug;62(8):1227-40.
78. Min KJ, Yang MS, Kim SU, Jou I, Joe EH. Astrocytes induce hemeoxygenase-1 expression in microglia: a feasible mechanism for preventing excessive brain inflammation. *J Neurosci*. 2006 Feb 8;26(6):1880-7.
79. Brambilla R, Persaud T, Hu X, Karmally S, Shestopalov VI, Dvorianchikova G, et al. Transgenic inhibition of astroglial NF-kappa B improves functional outcome in experimental autoimmune encephalomyelitis by suppressing chronic central nervous system inflammation. *J Immunol*. 2009 Mar 1;182(5):2628-40.
80. Kim RY, Hoffman AS, Itoh N, Ao Y, Spence R, Sofroniew MV, et al. Astrocyte CCL2 sustains immune cell infiltration in chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*. 2014 Sep 15;274(1-2):53-61.
81. Argaw AT, Asp L, Zhang J, Navrazhina K, Pham T, Mariani JN, et al. Astrocyte-derived VEGF-A drives blood-brain barrier disruption in CNS inflammatory disease. *The Journal of clinical investigation*. 2012 Jul;122(7):2454-68.
82. Gavillet M, Allaman I, Magistretti PJ. Modulation of astrocytic metabolic phenotype by proinflammatory cytokines. *Glia*. 2008 Jul;56(9):975-89.
83. Schweingruber N, Reichardt SD, Luhder F, Reichardt HM. Mechanisms of glucocorticoids in the control of neuroinflammation. *J Neuroendocrinol*. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. 2012 Jan;24(1):174-82.
84. Busillo JM, Cidlowski JA. The five Rs of glucocorticoid action during inflammation: ready, reinforce, repress, resolve, and restore. *Trends Endocrinol Metab*. 2013 Jan 8.
85. Gomez-Sanchez EP. The mammalian mineralocorticoid receptor: tying down a promiscuous receptor. *Experimental physiology*. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S. Review]. 2010 Jan;95(1):13-8.
86. Joels M, de Kloet ER. Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in the brain. Implications for ion permeability and transmitter systems. *Prog Neurobiol*. 1994 May;43(1):1-36.

87. McEown K, Treit D. Mineralocorticoid receptors in the medial prefrontal cortex and hippocampus mediate rats' unconditioned fear behaviour. *Horm Behav.* 2011 Nov;60(5):581-8.
88. McEwen BS, De Kloet ER, Rostene W. Adrenal steroid receptors and actions in the nervous system. *Physiol Rev.* 1986 Oct;66(4):1121-88.
89. Sierra A, Gottfried-Blackmore A, Milner TA, McEwen BS, Bulloch K. Steroid hormone receptor expression and function in microglia. *Glia.* 2008 Apr 15;56(6):659-74.
90. De Kloet ER, Vreugdenhil E, Oitzl MS, Joels M. Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocr Rev.* 1998 Jun;19(3):269-301.
91. de Kloet ER, Joels M, Holsboer F. Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci.* 2005 Jun;6(6):463-75.
92. Bartholome B, Spies CM, Gaber T, Schuchmann S, Berki T, Kunkel D, et al. Membrane glucocorticoid receptors (mGCR) are expressed in normal human peripheral blood mononuclear cells and up-regulated after in vitro stimulation and in patients with rheumatoid arthritis. *FASEB J.* [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2004 Jan;18(1):70-80.
93. Lowenberg M, Verhaar AP, Bilderbeek J, Marle J, Buttgereit F, Peppelenbosch MP, et al. Glucocorticoids cause rapid dissociation of a T-cell-receptor-associated protein complex containing LCK and FYN. *EMBO Rep.* 2006 Oct;7(10):1023-9.
94. Perez MH, Cormack J, Mallinson D, Mutungi G. A membrane glucocorticoid receptor mediates the rapid/non-genomic actions of glucocorticoids in mammalian skeletal muscle fibres. *J Physiol.* 2013 Oct 15;591(20):5171-85.
95. Shaqura M, Li X, Al-Khrasani M, Shakibaei M, Tafelski S, Furst S, et al. Membrane-bound glucocorticoid receptors on distinct nociceptive neurons as potential targets for pain control through rapid non-genomic effects. *Neuropharmacology.* 2016 Dec;111:1-13.
96. Li MD, Yang X. A Retrospective on Nuclear Receptor Regulation of Inflammation: Lessons from GR and PPARs. *PPAR research.* 2011;2011:742785.
97. Bekhbat M, Rowson SA, Neigh GN. Checks and balances: The glucocorticoid receptor and NFkB in good times and bad. *Front Neuroendocrinol.* 2017 Jul;46:15-31.
98. Sabban EL, Kvetnansky R. Stress-triggered activation of gene expression in catecholaminergic systems: dynamics of transcriptional events. *Trends Neurosci.* 2001 Feb;24(2):91-8.
99. Weber CM, Eke BC, Maines MD. Corticosterone regulates heme oxygenase-2 and NO synthase transcription and protein expression in rat brain. *J Neurochem.* 1994 Sep;63(3):953-62.
100. Whitehead D, Carter DA. cAMP response element-binding protein phosphorylation and DNA binding activity are increased in the anterior pituitary gland following glucocorticoid depletion. *J Mol Endocrinol.* 1997 Dec;19(3):291-7.
101. Karin M, Chang L. AP-1--glucocorticoid receptor crosstalk taken to a higher level. *J Endocrinol.* 2001 Jun;169(3):447-51.
102. Unlap MT, Joje RS. Dexamethasone attenuates NF-kappa B DNA binding activity without inducing I kappa B levels in rat brain in vivo. *Brain Res Mol Brain Res.* 1997 Apr;45(1):83-9.
103. Desmet SJ, De Bosscher K. Glucocorticoid receptors: finding the middle ground. *The Journal of clinical investigation.* 2017 Apr 3;127(4):1136-45.
104. Oakley RH, Cidlowski JA. Cellular processing of the glucocorticoid receptor gene and protein: new mechanisms for generating tissue-specific actions of glucocorticoids. *J Biol Chem.* 2011 Feb 4;286(5):3177-84.

105. Ligr M, Li Y, Logan SK, Taneja S, Melamed J, Lepor H, et al. Mifepristone inhibits GRbeta coupled prostate cancer cell proliferation. *J Urol*. 2012 Sep;188(3):981-8.
106. Sousa AR, Lane SJ, Cidlowski JA, Staynov DZ, Lee TH. Glucocorticoid resistance in asthma is associated with elevated in vivo expression of the glucocorticoid receptor beta-isoform. *J Allergy Clin Immunol*. 2000 May;105(5):943-50.
107. Shahidi H, Vottero A, Stratakis CA, Taymans SE, Karl M, Longui CA, et al. Imbalanced expression of the glucocorticoid receptor isoforms in cultured lymphocytes from a patient with systemic glucocorticoid resistance and chronic lymphocytic leukemia. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999 Jan 27;254(3):559-65.
108. Derijk RH, Schaaf MJ, Turner G, Datson NA, Vreugdenhil E, Cidlowski J, et al. A human glucocorticoid receptor gene variant that increases the stability of the glucocorticoid receptor beta-isoform mRNA is associated with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 2001 Nov;28(11):2383-8.
109. Hinds TD, Jr., Ramakrishnan S, Cash HA, Stechschulte LA, Heinrich G, Najjar SM, et al. Discovery of glucocorticoid receptor-beta in mice with a role in metabolism. *Mol Endocrinol*. 2010 Sep;24(9):1715-27.
110. DuBois DC, Sukumaran S, Jusko WJ, Almon RR. Evidence for a glucocorticoid receptor beta splice variant in the rat and its physiological regulation in liver. *Steroids*. 2013 Feb;78(2):312-20.
111. Stechschulte LA, Wuescher L, Marino JS, Hill JW, Eng C, Hinds TD, Jr. Glucocorticoid receptor beta stimulates Akt1 growth pathway by attenuation of PTEN. *J Biol Chem*. 2014 Jun 20;289(25):17885-94.
112. Pruett SB, Fan R, Zheng Q. Characterization of glucocorticoid receptor translocation, cytoplasmic I κ B, nuclear NF κ B, and activation of NF κ B in T lymphocytes exposed to stress-inducible concentrations of corticosterone in vivo. *Int Immunopharmacol*. 2003 Jan;3(1):1-16.
113. Quan N, He L, Lai W, Shen T, Herkenham M. Induction of I κ B α mRNA expression in the brain by glucocorticoids: a negative feedback mechanism for immune-to-brain signaling. *J Neurosci*. 2000 Sep 1;20(17):6473-7.
114. De Bosscher K, Vanden Berghe W, Haegeman G. The interplay between the glucocorticoid receptor and nuclear factor- κ B or activator protein-1: molecular mechanisms for gene repression. *Endocr Rev*. 2003 Aug;24(4):488-522.
115. McKay LI, Cidlowski JA. CBP (CREB binding protein) integrates NF- κ B (nuclear factor- κ B) and glucocorticoid receptor physical interactions and antagonism. *Mol Endocrinol*. 2000 Aug;14(8):1222-34.
116. Rivest S. Regulation of innate immune responses in the brain. *Nat Rev Immunol*. 2009 Jun;9(6):429-39.
117. Tolosa E, Ashwell JD. Thymus-derived glucocorticoids and the regulation of antigen-specific T-cell development. *Neuroimmunomodulation*. 1999 Jan-Apr;6(1-2):90-6.
118. Cato AC, Wade E. Molecular mechanisms of anti-inflammatory action of glucocorticoids. *Bioessays*. 1996 May;18(5):371-8.
119. Cronstein BN, Kimmel SC, Levin RI, Martiniuk F, Weissmann G. A mechanism for the antiinflammatory effects of corticosteroids: the glucocorticoid receptor regulates leukocyte adhesion to endothelial cells and expression of endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 and intercellular adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Nov 1;89(21):9991-5.
120. Getting SJ, Flower RJ, Perretti M. Inhibition of neutrophil and monocyte recruitment by endogenous and exogenous lipocortin 1. *Br J Pharmacol*. 1997 Mar;120(6):1075-82.

121. De Bosscher K, Vanden Berghe W, Haegeman G. Mechanisms of anti-inflammatory action and of immunosuppression by glucocorticoids: negative interference of activated glucocorticoid receptor with transcription factors. *J Neuroimmunol*. 2000 Sep 1;109(1):16-22.
122. Beck IM, Vanden Berghe W, Vermeulen L, Yamamoto KR, Haegeman G, De Bosscher K. Crosstalk in inflammation: the interplay of glucocorticoid receptor-based mechanisms and kinases and phosphatases. *Endocr Rev*. 2009 Dec;30(7):830-82.
123. Sorrells SF, Caso JR, Munhoz CD, Sapolsky RM. The stressed CNS: when glucocorticoids aggravate inflammation. *Neuron*. 2009 Oct 15;64(1):33-9.
124. Munhoz CD, Lepsch LB, Kawamoto EM, Malta MB, Lima Lde S, Avellar MC, et al. Chronic unpredictable stress exacerbates lipopolysaccharide-induced activation of nuclear factor-kappaB in the frontal cortex and hippocampus via glucocorticoid secretion. *J Neurosci*. 2006 Apr 5;26(14):3813-20.
125. Munhoz CD. Glucocorticoids (GCs) potentiate LPS-induced inflammatory response in frontal cortex by changing the expression of anti and pro-inflammatory genes. *Society for Neuroscience* 2007.
126. Sorrells SF, Caso JR, Munhoz CD, Hu CK, Tran KV, Miguel ZD, et al. Glucocorticoid signaling in myeloid cells worsens acute CNS injury and inflammation. *J Neurosci*. 2013 May 1;33(18):7877-89.
127. Sugama S, Takenouchi T, Fujita M, Kitani H, Conti B, Hashimoto M. Corticosteroids limit microglial activation occurring during acute stress. *Neuroscience*. 2012 Dec 20;232C:13-20.
128. de Pablos RM, Villaran RF, Arguelles S, Herrera AJ, Venero JL, Ayala A, et al. Stress increases vulnerability to inflammation in the rat prefrontal cortex. *J Neurosci*. 2006 May 24;26(21):5709-19.
129. Frank MG, Thompson BM, Watkins LR, Maier SF. Glucocorticoids mediate stress-induced priming of microglial pro-inflammatory responses. *Brain Behav Immun*. 2012 Feb;26(2):337-45.
130. Unemura K, Kume T, Kondo M, Maeda Y, Izumi Y, Akaike A. Glucocorticoids decrease astrocyte numbers by reducing glucocorticoid receptor expression in vitro and in vivo. *J Pharmacol Sci*. 2012;119(1):30-9.
131. Sun JD, Liu Y, Yuan YH, Li J, Chen NH. Gap junction dysfunction in the prefrontal cortex induces depressive-like behaviors in rats. *Neuropsychopharmacology*. 2012 Apr;37(5):1305-20.
132. Frank MG, Hershman SA, Weber MD, Watkins LR, Maier SF. Chronic exposure to exogenous glucocorticoids primes microglia to pro-inflammatory stimuli and induces NLRP3 mRNA in the hippocampus. *Psychoneuroendocrinology*. 2014 Feb;40:191-200.
133. Frank MG, Weber MD, Watkins LR, Maier SF. Stress sounds the alarm: The role of the danger-associated molecular pattern HMGB1 in stress-induced neuroinflammatory priming. *Brain Behav Immun*. 2015 Aug;48:1-7.
134. Duque Ede A, Munhoz CD. The Pro-inflammatory Effects of Glucocorticoids in the Brain. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2016;7:78.
135. Ahlemeyer B, Baumgart-Vogt E. Optimized protocols for the simultaneous preparation of primary neuronal cultures of the neocortex, hippocampus and cerebellum from individual newborn (P0.5) C57Bl/6J mice. *J Neurosci Methods*. 2005 Dec 15;149(2):110-20.
136. Strober W. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr Protoc Immunol*. 2001 May;Appendix 3:Appendix 3B.

137. Cao Z, West C, Norton-Wenzel CS, Rej R, Davis FB, Davis PJ. Effects of resin or charcoal treatment on fetal bovine serum and bovine calf serum. *Endocr Res.* 2009;34(4):101-8.
138. Velasco I, Velasco-Velazquez MA, Salazar P, Lajud N, Tapia R. Influence of serum-free medium on the expression of glutamate transporters and the susceptibility to glutamate toxicity in cultured cortical neurons. *J Neurosci Res.* 2003 Mar 15;71(6):811-8.
139. Ni M, Aschner M. Neonatal rat primary microglia: isolation, culturing, and selected applications. *Curr Protoc Toxicol.* 2010 Feb;Chapter 12:Unit 12 7.
140. Behl C, Trapp T, Skutella T, Holsboer F. Protection against oxidative stress-induced neuronal cell death--a novel role for RU486. *Eur J Neurosci.* 1997 May;9(5):912-20.
141. Yrjanheikki J, Keinanen R, Pellikka M, Hokfelt T, Koistinaho J. Tetracyclines inhibit microglial activation and are neuroprotective in global brain ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Dec 22;95(26):15769-74.
142. Schmitz T, Krabbe G, Weikert G, Scheuer T, Matheus F, Wang Y, et al. Minocycline protects the immature white matter against hyperoxia. *Exp Neurol.* 2014 Apr;254:153-65.
143. Piccioli P, Porcile C, Stanzione S, Bisaglia M, Bajetto A, Bonavia R, et al. Inhibition of nuclear factor-kappaB activation induces apoptosis in cerebellar granule cells. *J Neurosci Res.* 2001 Dec 15;66(6):1064-73.
144. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976 May 7;72:248-54.
145. Feinstein DL, Galea E, Cermak J, Chugh P, Lyandvert L, Reis DJ. Nitric oxide synthase expression in glial cells: suppression by tyrosine kinase inhibitors. *the Journal of Neurochemistry.* 1994;62:811-4.
146. Hornung V, Bauernfeind F, Halle A, Samstad EO, Kono H, Rock KL, et al. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat Immunol.* 2008 Aug;9(8):847-56.
147. Kaboord B, Perr M. Isolation of proteins and protein complexes by immunoprecipitation. *Methods Mol Biol.* 2008;424:349-64.
148. Foglieni C, Meoni C, Davalli AM. Fluorescent dyes for cell viability: an application on prefixed conditions. *Histochemistry and cell biology.* 2001 Mar;115(3):223-9.
149. Baskic D, Popovic S, Ristic P, Arsenijevic NN. Analysis of cycloheximide-induced apoptosis in human leukocytes: fluorescence microscopy using annexin V/propidium iodide versus acridin orange/ethidium bromide. *Cell Biol Int.* 2006 Nov;30(11):924-32.
150. Atale N, Gupta S, Yadav UC, Rani V. Cell-death assessment by fluorescent and nonfluorescent cytosolic and nuclear staining techniques. *J Microsc.* 2014 Jul;255(1):7-19.
151. Jones KH, Kniss DA. Propidium iodide as a nuclear counterstain for immunofluorescence studies on cells in culture. *J Histochem Cytochem.* 1987 Jan;35(1):123-5.
152. Salway R, Wakefield J. Gamma generalized linear models for pharmacokinetic data. *Biometrics.* 2008 Jun;64(2):620-6.
153. Donohue MC, Overholser R, Xu R, Vaida F. Conditional Akaike information under generalized linear and proportional hazards mixed models. *Biometrika.* 2011 Sep;98(3):685-700.
154. Retamal MA, Froger N, Palacios-Prado N, Ezan P, Saez PJ, Saez JC, et al. Cx43 hemichannels and gap junction channels in astrocytes are regulated oppositely by proinflammatory cytokines released from activated microglia. *J Neurosci.* 2007 Dec 12;27(50):13781-92.

155. Kivell BM, McDonald FJ, Miller JH. Serum-free culture of rat post-natal and fetal brainstem neurons. *Brain Res Dev Brain Res*. 2000 Apr 14;120(2):199-210.
156. Azmitia EC. Microcultures of dissociated primary central nervous system neurons. In: Conn PM, editor. *Cell Culture*. San Diego: Academic Press; 1990. p. 263 - 75.
157. Lesuisse C, Martin LJ. Immature and mature cortical neurons engage different apoptotic mechanisms involving caspase-3 and the mitogen-activated protein kinase pathway. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2002 Aug;22(8):935-50.
158. Brewer GJ, Torricelli JR. Isolation and culture of adult neurons and neurospheres. *Nat Protoc*. 2007;2(6):1490-8.
159. Brewer GJ. Serum-free B27/neurobasal medium supports differentiated growth of neurons from the striatum, substantia nigra, septum, cerebral cortex, cerebellum, and dentate gyrus. *J Neurosci Res*. 1995 Dec;42(5):674-83.
160. Geller HM, Cheng KY, Goldsmith NK, Romero AA, Zhang AL, Morris EJ, et al. Oxidative stress mediates neuronal DNA damage and apoptosis in response to cytosine arabinoside. *J Neurochem*. 2001 Jul;78(2):265-75.
161. Lesuisse C, Martin LJ. Long-term culture of mouse cortical neurons as a model for neuronal development, aging, and death. *J Neurobiol*. 2002 Apr;51(1):9-23.
162. Xie C, Markesbery WR, Lovell MA. Survival of hippocampal and cortical neurons in a mixture of MEM+ and B27-supplemented neurobasal medium. *Free Radic Biol Med*. 2000 Mar 1;28(5):665-72.
163. Wang Q, Gong Q, Wu Q, Shi J. Neuroprotective effects of Dendrobium alkaloids on rat cortical neurons injured by oxygen-glucose deprivation and reperfusion. *Phytomedicine*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2010 Feb;17(2):108-15.
164. Numakawa Y, Matsumoto T, Yokomaku D, Taguchi T, Niki E, Hatanaka H, et al. 17beta-estradiol protects cortical neurons against oxidative stress-induced cell death through reduction in the activity of mitogen-activated protein kinase and in the accumulation of intracellular calcium. *Endocrinology*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2007 Feb;148(2):627-37.
165. Hamby ME, Uliasz TF, Hewett SJ, Hewett JA. Characterization of an improved procedure for the removal of microglia from confluent monolayers of primary astrocytes. *J Neurosci Methods*. 2006 Jan 15;150(1):128-37.
166. Frank MG, Wieseler-Frank JL, Watkins LR, Maier SF. Rapid isolation of highly enriched and quiescent microglia from adult rat hippocampus: immunophenotypic and functional characteristics. *J Neurosci Methods*. 2006 Mar 15;151(2):121-30.
167. Gustin A, Kirchmeyer M, Koncina E, Felten P, Losciuto S, Heurtaux T, et al. NLRP3 Inflammasome Is Expressed and Functional in Mouse Brain Microglia but Not in Astrocytes. *PLoS One*. 2015;10(6):e0130624.
168. Foo LC, Allen NJ, Bushong EA, Ventura PB, Chung WS, Zhou L, et al. Development of a method for the purification and culture of rodent astrocytes. *Neuron*. 2011 Sep 8;71(5):799-811.
169. Johann S, Heitzer M, Kanagaratnam M, Goswami A, Rizo T, Weis J, et al. NLRP3 inflammasome is expressed by astrocytes in the SOD1 mouse model of ALS and in human sporadic ALS patients. *Glia*. 2015 Dec;63(12):2260-73.
170. McCarthy KD, de Vellis J. Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *The Journal of cell biology*. 1980 Jun;85(3):890-902.

171. Lin Y, Zhang JC, Yao CY, Wu Y, Abdelgawad AF, Yao SL, et al. Critical role of astrocytic interleukin-17 A in post-stroke survival and neuronal differentiation of neural precursor cells in adult mice. *Cell Death Dis.* 2016 Jun 23;7(6):e2273.
172. Morte B, Gil-Ibanez P, Bernal J. Regulation of Gene Expression by Thyroid Hormone in Primary Astrocytes: Factors Influencing the Genomic Response. *Endocrinology.* 2018 May 1;159(5):2083-92.
173. O'Callaghan JP, Sriram K, Miller DB. Defining "neuroinflammation". *Ann N Y Acad Sci.* 2008 Oct;1139:318-30.
174. Lehnardt S, Massillon L, Follett P, Jensen FE, Ratan R, Rosenberg PA, et al. Activation of innate immunity in the CNS triggers neurodegeneration through a Toll-like receptor 4-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* [Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. 2003 Jul 8;100(14):8514-9.
175. Pascual O, Ben Achour S, Rostaing P, Triller A, Bessis A. Microglia activation triggers astrocyte-mediated modulation of excitatory neurotransmission. *Proc Natl Acad Sci U S A.* [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2012 Jan 24;109(4):E197-205.
176. Saijo K, Winner B, Carson CT, Collier JG, Boyer L, Rosenfeld MG, et al. A Nurr1/CoREST pathway in microglia and astrocytes protects dopaminergic neurons from inflammation-induced death. *Cell.* 2009 Apr 3;137(1):47-59.
177. Nakano Y, Furube E, Morita S, Wanaka A, Nakashima T, Miyata S. Astrocytic TLR4 expression and LPS-induced nuclear translocation of STAT3 in the sensory circumventricular organs of adult mouse brain. *J Neuroimmunol.* 2015 Jan 15;278:144-58.
178. Ko HM, Lee SH, Kim KC, Joo SH, Choi WS, Shin CY. The Role of TLR4 and Fyn Interaction on Lipopolysaccharide-Stimulated PAI-1 Expression in Astrocytes. *Molecular neurobiology.* 2015 Aug;52(1):8-25.
179. Alfonso-Loeches S, Urena-Peralta JR, Morillo-Bargues MJ, Oliver-De La Cruz J, Guerri C. Role of mitochondria ROS generation in ethanol-induced NLRP3 inflammasome activation and cell death in astroglial cells. *Front Cell Neurosci.* 2014;8:216.
180. Jian Z, Ding S, Deng H, Wang J, Yi W, Wang L, et al. Probenecid protects against oxygen-glucose deprivation injury in primary astrocytes by regulating inflammasome activity. *Brain Res.* 2016 Jul 15;1643:123-9.
181. Slowik A, Lammerding L, Zendedel A, Habib P, Beyer C. Impact of steroid hormones E2 and P on the NLRP3/ASC/Casp1 axis in primary mouse astroglia and BV-2 cells after in vitro hypoxia. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2018 May 15.
182. Wang Y, Yang C, Mao K, Chen S, Meng G, Sun B. Cellular localization of NLRP3 inflammasome. *Protein Cell.* 2013 Jun;4(6):425-31.
183. Khakh BS, Sofroniew MV. Diversity of astrocyte functions and phenotypes in neural circuits. *Nat Neurosci.* 2015 Jul;18(7):942-52.
184. Tanaka J, Fujita H, Matsuda S, Toku K, Sakanaka M, Maeda N. Glucocorticoid- and mineralocorticoid receptors in microglial cells: the two receptors mediate differential effects of corticosteroids. *Glia.* 1997 May;20(1):23-37.
185. Vielkind U, Walencewicz A, Levine JM, Bohn MC. Type II glucocorticoid receptors are expressed in oligodendrocytes and astrocytes. *J Neurosci Res.* 1990 Nov;27(3):360-73.
186. de Kloet ER, Meijer OC, de Nicola AF, de Rijk RH, Joels M. Importance of the brain corticosteroid receptor balance in metaplasticity, cognitive performance and neuro-inflammation. *Front Neuroendocrinol.* 2018 Apr;49:124-45.

187. Mahfouz A, Lelieveldt BP, Grefhorst A, van Weert LT, Mol IM, Sips HC, et al. Genome-wide coexpression of steroid receptors in the mouse brain: Identifying signaling pathways and functionally coordinated regions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016 Mar 8;113(10):2738-43.
188. Ahima R, Krozowski Z, Harlan R. Type I corticosteroid receptor-like immunoreactivity in the rat CNS: distribution and regulation by corticosteroids. *J Comp Neurol*. 1991 Nov 15;313(3):522-38.
189. Jung-Testas I, Renoir M, Bugnard H, Greene GL, Baulieu EE. Demonstration of steroid hormone receptors and steroid action in primary cultures of rat glial cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1992 Mar;41(3-8):621-31.
190. Bohn MC, Howard E, Vielkind U, Krozowski Z. Glial cells express both mineralocorticoid and glucocorticoid receptors. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1991;40(1-3):105-11.
191. Johnson LR, Farb C, Morrison JH, McEwen BS, LeDoux JE. Localization of glucocorticoid receptors at postsynaptic membranes in the lateral amygdala. *Neuroscience*. 2005;136(1):289-99.
192. Pusceddu MM, Nolan YM, Green HF, Robertson RC, Stanton C, Kelly P, et al. The Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acid Docosahexaenoic Acid (DHA) Reverses Corticosterone-Induced Changes in Cortical Neurons. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2016 Jun 1;19(6).
193. Chou YC, Luttge WG, Sumners C. Expression of mineralocorticoid type I and glucocorticoid type II receptors in astrocyte glia as a function of time in culture. *Brain Res Dev Brain Res*. 1991 Jul 16;61(1):55-61.
194. Tatro ET, Everall IP, Kaul M, Achim CL. Modulation of glucocorticoid receptor nuclear translocation in neurons by immunophilins FKBP51 and FKBP52: implications for major depressive disorder. *Brain Res*. 2009 Aug 25;1286:1-12.
195. Batlle M, Ferri L, Andrade C, Ortega FJ, Vidal-Taboada JM, Pugliese M, et al. Astroglia-Microglia Cross Talk during Neurodegeneration in the Rat Hippocampus. *Biomed Res Int*. 2015;2015:102419.
196. Li X, Shaqura M, Mohamed D, Beyer A, Yamada S, Mousa SA, et al. Pro- versus Antinociceptive Nongenomic Effects of Neuronal Mineralocorticoid versus Glucocorticoid Receptors during Rat Hind Paw Inflammation. *Anesthesiology*. 2018 Apr;128(4):796-809.
197. Kaal EC, Vecht CJ. The management of brain edema in brain tumors. *Curr Opin Oncol*. 2004 Nov;16(6):593-600.
198. Novaes LS, Dos Santos NB, Batalhote RFP, Malta MB, Camarini R, Scavone C, et al. Environmental enrichment protects against stress-induced anxiety: Role of glucocorticoid receptor, ERK, and CREB signaling in the basolateral amygdala. *Neuropharmacology*. 2017 Feb;113(Pt A):457-66.
199. Lupien SJ, Nair NP, Briere S, Maheu F, Tu MT, Lemay M, et al. Increased cortisol levels and impaired cognition in human aging: implication for depression and dementia in later life. *Rev Neurosci*. 1999;10(2):117-39.
200. Sheline YI. 3D MRI studies of neuroanatomic changes in unipolar major depression: the role of stress and medical comorbidity. *Biol Psychiatry*. 2000 Oct 15;48(8):791-800.
201. Watanabe Y, Gould E, McEwen BS. Stress induces atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3 pyramidal neurons. *Brain Res*. 1992 Aug 21;588(2):341-5.
202. McEwen BS. Stress and hippocampal plasticity. *Annu Rev Neurosci*. 1999;22:105-22.
203. Tynan RJ, Beynon SB, Hinwood M, Johnson SJ, Nilsson M, Woods JJ, et al. Chronic stress-induced disruption of the astrocyte network is driven by structural atrophy and not loss of astrocytes. *Acta Neuropathol*. 2013 Jul;126(1):75-91.

204. Rajkowska G, Miguel-Hidalgo JJ. Gliogenesis and glial pathology in depression. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2007 Jun;6(3):219-33.
205. Rajkowska G, Legutko B, Moulana M, Syed M, Romero DG, Stockmeier CA, et al. Astrocyte pathology in the ventral prefrontal white matter in depression. *J Psychiatr Res*. 2018 Apr 7;102:150-8.
206. Cobb JA, O'Neill K, Milner J, Mahajan GJ, Lawrence TJ, May WL, et al. Density of GFAP-immunoreactive astrocytes is decreased in left hippocampi in major depressive disorder. *Neuroscience*. 2016 Mar 1;316:209-20.
207. Rubinow MJ, Mahajan G, May W, Overholser JC, Jurjus GJ, Dieter L, et al. Basolateral amygdala volume and cell numbers in major depressive disorder: a postmortem stereological study. *Brain Struct Funct*. 2016 Jan;221(1):171-84.
208. Yao YY, Liu DM, Xu DF, Li WP. Memory and learning impairment induced by dexamethasone in senescent but not young mice. *Eur J Pharmacol*. 2007 Nov 21;574(1):20-8.
209. Roy M, Sapolsky RM. The exacerbation of hippocampal excitotoxicity by glucocorticoids is not mediated by apoptosis. *Neuroendocrinology*. 2003 Jan;77(1):24-31.
210. Nakatani Y, Tsuji M, Amano T, Miyagawa K, Miyagishi H, Saito A, et al. Neuroprotective effect of yokukansan against cytotoxicity induced by corticosterone on mouse hippocampal neurons. *Phytomedicine*. 2014 Sep 25;21(11):1458-65.
211. Liu B, Zhang H, Xu C, Yang G, Tao J, Huang J, et al. Neuroprotective effects of icariin on corticosterone-induced apoptosis in primary cultured rat hippocampal neurons. *Brain Res*. 2011 Feb 23;1375:59-67.
212. Zhu MY, Wang WP, Bissette G. Neuroprotective effects of agmatine against cell damage caused by glucocorticoids in cultured rat hippocampal neurons. *Neuroscience*. 2006 Sep 15;141(4):2019-27.
213. Kurek A, Kucharczyk M, Detka J, Slusarczyk J, Trojan E, Glombik K, et al. Pro-apoptotic Action of Corticosterone in Hippocampal Organotypic Cultures. *Neurotox Res*. 2016 Aug;30(2):225-38.
214. Crochemore C, Lu J, Wu Y, Liposits Z, Sousa N, Holsboer F, et al. Direct targeting of hippocampal neurons for apoptosis by glucocorticoids is reversible by mineralocorticoid receptor activation. *Mol Psychiatry*. 2005 Aug;10(8):790-8.
215. Latt HM, Matsushita H, Morino M, Koga Y, Michiue H, Nishiki T, et al. Oxytocin Inhibits Corticosterone-induced Apoptosis in Primary Hippocampal Neurons. *Neuroscience*. 2018 May 21;379:383-9.
216. Llorens-Martin M, Trejo JL. Mifepristone prevents stress-induced apoptosis in newborn neurons and increases AMPA receptor expression in the dentate gyrus of C57/BL6 mice. *PLoS One*. 2011;6(11):e28376.
217. Noguchi KK, Walls KC, Wozniak DF, Olney JW, Roth KA, Farber NB. Acute neonatal glucocorticoid exposure produces selective and rapid cerebellar neural progenitor cell apoptotic death. *Cell Death Differ*. 2008 Oct;15(10):1582-92.
218. Lanshakov DA, Sukhareva EV, Kalinina TS, Dygalo NN. Dexamethasone-induced acute excitotoxic cell death in the developing brain. *Neurobiol Dis*. 2016 Jul;91:1-9.
219. Henkel AW, Alali H, Devassy A, Alawadi MM, Redzic ZB. Antagonistic interactions between dexamethasone and fluoxetine modulate morphodynamics and expression of cytokines in astrocytes. *Neuroscience*. 2014 Nov 7;280:318-27.
220. Gonzalez-Perez O, Chavez-Casillas O, Jauregui-Huerta F, Lopez-Virgen V, Guzman-Muniz J, Moy-Lopez N, et al. Stress by noise produces differential effects on the proliferation rate of

radial astrocytes and survival of neuroblasts in the adult subgranular zone. *Neurosci Res.* 2011 Jul;70(3):243-50.

221. Morita K, Ishimura K, Tsuruo Y, Wong DL. Dexamethasone enhances serum deprivation-induced necrotic death of rat C6 glioma cells through activation of glucocorticoid receptors. *Brain Res.* 1999 Jan 23;816(2):309-16.

222. Behl C, Lezoualc'h F, Trapp T, Widmann M, Skutella T, Holsboer F. Glucocorticoids enhance oxidative stress-induced cell death in hippocampal neurons in vitro. *Endocrinology.* 1997 Jan;138(1):101-6.

223. Xu Y, Zhang C, Wang R, Govindarajan SS, Barish PA, Vernon MM, et al. Corticosterone induced morphological changes of hippocampal and amygdaloid cell lines are dependent on 5-HT7 receptor related signal pathway. *Neuroscience.* 2011 May 19;182:71-81.

224. Yan J, Liu Q, Dou Y, Hsieh Y, Liu Y, Tao R, et al. Activating glucocorticoid receptor-ERK signaling pathway contributes to ginsenoside Rg1 protection against beta-amyloid peptide-induced human endothelial cells apoptosis. *J Ethnopharmacol.* 2013 May 20;147(2):456-66.

225. Katychiev A, Wang X, Duffy A, Dore-Duffy P. Glucocorticoid-induced apoptosis in CNS microvascular pericytes. *Dev Neurosci.* 2003 Nov-Dec;25(6):436-46.

226. Sze CI, Lin YC, Lin YJ, Hsieh TH, Kuo YM, Lin CH. The role of glucocorticoid receptors in dexamethasone-induced apoptosis of neuroprogenitor cells in the hippocampus of rat pups. *Mediators Inflamm.* 2013;2013:628094.

227. de Pablos RM, Herrera AJ, Espinosa-Oliva AM, Sarmiento M, Munoz MF, Machado A, et al. Chronic stress enhances microglia activation and exacerbates death of nigral dopaminergic neurons under conditions of inflammation. *J Neuroinflammation.* 2014;11:34.

228. Espinosa-Oliva AM, de Pablos RM, Villaran RF, Arguelles S, Venero JL, Machado A, et al. Stress is critical for LPS-induced activation of microglia and damage in the rat hippocampus. *Neurobiol Aging.* 2011 Jan;32(1):85-102.

229. Frank MG, Baratta MV, Sprunger DB, Watkins LR, Maier SF. Microglia serve as a neuroimmune substrate for stress-induced potentiation of CNS pro-inflammatory cytokine responses. *Brain Behav Immun.* 2007 Jan;21(1):47-59.

230. Frank MG, Miguel ZD, Watkins LR, Maier SF. Prior exposure to glucocorticoids sensitizes the neuroinflammatory and peripheral inflammatory responses to E. coli lipopolysaccharide. *Brain Behav Immun.* 2010 Jan;24(1):19-30.

231. Johnson JD, O'Connor KA, Deak T, Stark M, Watkins LR, Maier SF. Prior stressor exposure sensitizes LPS-induced cytokine production. *Brain Behav Immun.* 2002 Aug;16(4):461-76.

232. Sorrells SF, Munhoz CD, Manley NC, Yen S, Sapolsky RM. Glucocorticoids increase excitotoxic injury and inflammation in the hippocampus of adult male rats. *Neuroendocrinology.* 2014;100(2-3):129-40.

233. Fonken LK, Frank MG, Kitt MM, D'Angelo HM, Norden DM, Weber MD, et al. The Alarmin HMGB1 Mediates Age-Induced Neuroinflammatory Priming. *J Neurosci.* 2016 Jul 27;36(30):7946-56.

234. Wohleb ES, Fenn AM, Pacenta AM, Powell ND, Sheridan JF, Godbout JP. Peripheral innate immune challenge exaggerated microglia activation, increased the number of inflammatory CNS macrophages, and prolonged social withdrawal in socially defeated mice. *Psychoneuroendocrinology.* 2012 Sep;37(9):1491-505.

235. Frank MG, Watkins LR, Maier SF. The permissive role of glucocorticoids in neuroinflammatory priming: mechanisms and insights. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2015 Aug;22(4):300-5.

236. Sun Q, Scott MJ. Caspase-1 as a multifunctional inflammatory mediator: noncytokine maturation roles. *Journal of leukocyte biology*. 2016 Nov;100(5):961-7.
237. Mariathasan S, Newton K, Monack DM, Vucic D, French DM, Lee WP, et al. Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf. *Nature*. 2004 Jul 8;430(6996):213-8.
238. Feldmeyer L, Keller M, Niklaus G, Hohl D, Werner S, Beer HD. The inflammasome mediates UVB-induced activation and secretion of interleukin-1beta by keratinocytes. *Curr Biol*. 2007 Jul 3;17(13):1140-5.
239. Gross O, Yazdi AS, Thomas CJ, Masin M, Heinz LX, Guarda G, et al. Inflammasome activators induce interleukin-1alpha secretion via distinct pathways with differential requirement for the protease function of caspase-1. *Immunity*. 2012 Mar 23;36(3):388-400.
240. Keller M, Ruegg A, Werner S, Beer HD. Active caspase-1 is a regulator of unconventional protein secretion. *Cell*. 2008 Mar 7;132(5):818-31.
241. Caraci F, Spampinato SF, Morgese MG, Tascetta F, Salluzzo MG, Giambirtone MC, et al. Neurobiological links between depression and AD: The role of TGF-beta1 signaling as a new pharmacological target. *Pharmacol Res*. 2018 Apr;130:374-84.
242. Qin L, Wu X, Block ML, Liu Y, Breese GR, Hong JS, et al. Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. *Glia*. 2007 Apr 1;55(5):453-62.
243. Nimmervoll B, White R, Yang JW, An S, Henn C, Sun JJ, et al. LPS-induced microglial secretion of TNFalpha increases activity-dependent neuronal apoptosis in the neonatal cerebral cortex. *Cereb Cortex*. 2013 Jul;23(7):1742-55.
244. Cadepond F, Ulmann A, Baulieu EE. RU486 (mifepristone): mechanisms of action and clinical uses. *Annu Rev Med*. 1997;48:129-56.
245. Arbo BD, Bennetti F, Ribeiro MF. Astrocytes as a target for neuroprotection: Modulation by progesterone and dehydroepiandrosterone. *Prog Neurobiol*. 2016 Sep;144:27-47.
246. Meffre D, Labombarda F, Delespierre B, Chastre A, De Nicola AF, Stein DG, et al. Distribution of membrane progesterone receptor alpha in the male mouse and rat brain and its regulation after traumatic brain injury. *Neuroscience*. 2013 Feb 12;231:111-24.
247. Mani SK. Signaling mechanisms in progesterone-neurotransmitter interactions. *Neuroscience*. 2006;138(3):773-81.
248. Jung-Testas I, Hu ZY, Baulieu EE, Robel P. Neurosteroids: biosynthesis of pregnenolone and progesterone in primary cultures of rat glial cells. *Endocrinology*. 1989 Oct;125(4):2083-91.
249. Sun F, Nguyen T, Jin X, Huang R, Chen Z, Cunningham RL, et al. Pgrmc1/BDNF Signaling Plays a Critical Role in Mediating Glia-Neuron Cross Talk. *Endocrinology*. 2016 May;157(5):2067-79.
250. Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Agostinis P, et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ*. 2018 Mar;25(3):486-541.
251. MacPherson A, Dinkel K, Sapolsky R. Glucocorticoids worsen excitotoxin-induced expression of pro-inflammatory cytokines in hippocampal cultures. *Exp Neurol*. 2005 Aug;194(2):376-83.
252. Johnson RF, Rennie N, Murphy V, Zakar T, Clifton V, Smith R. Expression of glucocorticoid receptor messenger ribonucleic acid transcripts in the human placenta at term. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008 Dec;93(12):4887-93.
253. Liu X, Quan N. Microglia and CNS Interleukin-1: Beyond Immunological Concepts. *Front Neurol*. 2018;9:8.

254. Zhang YP, Wang HY, Zhang C, Liu BP, Peng ZL, Li YY, et al. Mifepristone attenuates depression-like changes induced by chronic central administration of interleukin-1 β in rats. *Behav Brain Res*. 2018 Jul 16;347:436-45.
255. Song C, Zhang Y, Dong Y. Acute and subacute IL-1 β administrations differentially modulate neuroimmune and neurotrophic systems: possible implications for neuroprotection and neurodegeneration. *J Neuroinflammation*. 2013 May 7;10:59.
256. Taepavarapruk P, Song C. Reductions of acetylcholine release and nerve growth factor expression are correlated with memory impairment induced by interleukin-1 β administrations: effects of omega-3 fatty acid EPA treatment. *J Neurochem*. 2010 Feb;112(4):1054-64.
257. Kelly KA, Michalovicz LT, Miller JV, Castranova V, Miller DB, O'Callaghan JP. Prior exposure to corticosterone markedly enhances and prolongs the neuroinflammatory response to systemic challenge with LPS. *PLoS One*. 2018;13(1):e0190546.
258. Chen J, Song Y, Yang J, Zhang Y, Zhao P, Zhu XJ, et al. The contribution of TNF- α in the amygdala to anxiety in mice with persistent inflammatory pain. *Neurosci Lett*. 2013 Apr 29;541:275-80.
259. Cheng X, Shen Y, Li R. Targeting TNF: a therapeutic strategy for Alzheimer's disease. *Drug Discov Today*. 2014 Nov;19(11):1822-7.
260. Sapolsky RM. Stress and the brain: individual variability and the inverted-U. *Nat Neurosci*. 2015 Oct;18(10):1344-6.
261. Kaltschmidt B, Kaltschmidt C. NF- κ B in the nervous system. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2009 Sep;1(3):a001271.
262. van Loo G, Sze M, Bougarne N, Praet J, McGuire C, Ullrich A, et al. Antiinflammatory Properties of a Plant-Derived Nonsteroidal, Dissociated Glucocorticoid Receptor Modulator in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Endocr Rev*. 2009 Dec 1;30(7):931.
263. Sofroniew MV. Astrocyte barriers to neurotoxic inflammation. *Nat Rev Neurosci*. 2015 May;16(5):249-63.
264. Brambilla R, Bracchi-Ricard V, Hu WH, Frydel B, Bramwell A, Karmally S, et al. Inhibition of astroglial nuclear factor κ B reduces inflammation and improves functional recovery after spinal cord injury. *J Exp Med*. 2005 Jul 4;202(1):145-56.
265. Jayakumar AR, Tong XY, Ruiz-Cordero R, Bregy A, Bethea JR, Bramlett HM, et al. Activation of NF- κ B mediates astrocyte swelling and brain edema in traumatic brain injury. *J Neurotrauma*. 2014 Jul 15;31(14):1249-57.
266. Hsiao HY, Chen YC, Chen HM, Tu PH, Chern Y. A critical role of astrocyte-mediated nuclear factor- κ B-dependent inflammation in Huntington's disease. *Hum Mol Genet*. 2013 May 1;22(9):1826-42.
267. Jang S, Suh SH, Yoo HS, Lee YM, Oh S. Changes in iNOS, GFAP and NR1 expression in various brain regions and elevation of sphingosine-1-phosphate in serum after immobilized stress. *Neurochemical research*. 2008 May;33(5):842-51.
268. Liu Q, Li B, Zhu HY, Wang YQ, Yu J, Wu GC. Glia atrophy in the hippocampus of chronic unpredictable stress-induced depression model rats is reversed by electroacupuncture treatment. *J Affect Disord*. 2011 Feb;128(3):309-13.
269. Champeil-Potokar G, Hennebelle M, Latour A, Vancassel S, Denis I. Docosahexaenoic acid (DHA) prevents corticosterone-induced changes in astrocyte morphology and function. *J Neurochem*. 2015 Dec 28.

270. Rao NA, McCalman MT, Moulos P, Francoijs KJ, Chatziioannou A, Kolisis FN, et al. Coactivation of GR and NFKB alters the repertoire of their binding sites and target genes. *Genome Res.* 2011 Sep;21(9):1404-16.
271. Widen C, Gustafsson JA, Wikstrom AC. Cytosolic glucocorticoid receptor interaction with nuclear factor-kappa B proteins in rat liver cells. *Biochem J.* 2003 Jul 1;373(Pt 1):211-20.
272. Patel PD, Katz M, Karssen AM, Lyons DM. Stress-induced changes in corticosteroid receptor expression in primate hippocampus and prefrontal cortex. *Psychoneuroendocrinology.* 2008 Apr;33(3):360-7.
273. Yu S, Patchev AV, Wu Y, Lu J, Holsboer F, Zhang JZ, et al. Depletion of the neural precursor cell pool by glucocorticoids. *Ann Neurol.* 2010 Jan;67(1):21-30.
274. Ogita K, Sugiyama C, Acosta GB, Kuramoto N, Shuto M, Yoneyama M, et al. Opposing roles of glucocorticoid receptor and mineralocorticoid receptor in trimethyltin-induced cytotoxicity in the mouse hippocampus. *Neurosci Lett.* 2012 Mar 9;511(2):116-9.
275. Joels M, Karst H, DeRijk R, de Kloet ER. The coming out of the brain mineralocorticoid receptor. *Trends Neurosci.* 2008 Jan;31(1):1-7.
276. Brocca ME, Pietranera L, Meyer M, Lima A, Roig P, de Kloet ER, et al. Mineralocorticoid receptor associates with pro-inflammatory bias in the hippocampus of spontaneously hypertensive rats. *J Neuroendocrinol.* 2017 Jul;29(7).
277. Rocha R, Chander PN, Khanna K, Zuckerman A, Stier CT, Jr. Mineralocorticoid blockade reduces vascular injury in stroke-prone hypertensive rats. *Hypertension.* 1998 Jan;31(1 Pt 2):451-8.
278. Frieler RA, Meng H, Duan SZ, Berger S, Schutz G, He Y, et al. Myeloid-specific deletion of the mineralocorticoid receptor reduces infarct volume and alters inflammation during cerebral ischemia. *Stroke.* 2011 Jan;42(1):179-85.
279. Liu W, Wang J, Sauter NK, Pearce D. Steroid receptor heterodimerization demonstrated in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Dec 19;92(26):12480-4.
280. Trapp T, Holsboer F. Heterodimerization between mineralocorticoid and glucocorticoid receptors increases the functional diversity of corticosteroid action. *Trends Pharmacol Sci.* 1996 Apr;17(4):145-9.
281. Ou XM, Storrington JM, Kushwaha N, Albert PR. Heterodimerization of mineralocorticoid and glucocorticoid receptors at a novel negative response element of the 5-HT1A receptor gene. *J Biol Chem.* 2001 Apr 27;276(17):14299-307.
282. Savory JG, Prefontaine GG, Lamprecht C, Liao M, Walther RF, Lefebvre YA, et al. Glucocorticoid receptor homodimers and glucocorticoid-mineralocorticoid receptor heterodimers form in the cytoplasm through alternative dimerization interfaces. *Mol Cell Biol.* 2001 Feb;21(3):781-93.
283. Nishi M. Dynamics of corticosteroid receptors: lessons from live cell imaging. *Acta Histochem Cytochem.* 2011 Feb 26;44(1):1-7.
284. Mifsud KR, Reul JM. Acute stress enhances heterodimerization and binding of corticosteroid receptors at glucocorticoid target genes in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016 Oct 4;113(40):11336-41.
285. Presman DM, Ganguly S, Schiltz RL, Johnson TA, Karpova TS, Hager GL. DNA binding triggers tetramerization of the glucocorticoid receptor in live cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016 Jul 19;113(29):8236-41.
286. Presman DM, Hager GL. More than meets the dimer: What is the quaternary structure of the glucocorticoid receptor? *Transcription.* 2017 Jan;8(1):32-9.

287. Holmes MC, Yau JL, Kotelevtsev Y, Mullins JJ, Seckl JR. 11 Beta-hydroxysteroid dehydrogenases in the brain: two enzymes two roles. *Ann N Y Acad Sci.* 2003 Dec;1007:357-66.
288. Gadek-Michalska A, Spyрка J, Rachwalska P, Tadeusz J, Bugajski J. Influence of chronic stress on brain corticosteroid receptors and HPA axis activity. *Pharmacol Rep.* 2013;65(5):1163-75.
289. Han F, Ding J, Shi Y. Expression of amygdala mineralocorticoid receptor and glucocorticoid receptor in the single-prolonged stress rats. *BMC Neurosci.* 2014 Jun 19;15:77.
290. Chiba S, Numakawa T, Ninomiya M, Richards MC, Wakabayashi C, Kunugi H. Chronic restraint stress causes anxiety- and depression-like behaviors, downregulates glucocorticoid receptor expression, and attenuates glutamate release induced by brain-derived neurotrophic factor in the prefrontal cortex. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2012 Oct 1;39(1):112-9.
291. Groeneweg FL, Karst H, de Kloet ER, Joels M. Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors at the neuronal membrane, regulators of nongenomic corticosteroid signalling. *Mol Cell Endocrinol.* 2012 Mar 24;350(2):299-309.
292. Ayroldi E, Riccardi C. Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ): a new important mediator of glucocorticoid action. *FASEB J.* 2009 Nov;23(11):3649-58.
293. Zannas AS, Wiechmann T, Gassen NC, Binder EB. Gene-Stress-Epigenetic Regulation of FKBP5: Clinical and Translational Implications. *Neuropsychopharmacology.* 2016 Jan;41(1):261-74.
294. Norden DM, Trojanowski PJ, Villanueva E, Navarro E, Godbout JP. Sequential activation of microglia and astrocyte cytokine expression precedes increased Iba-1 or GFAP immunoreactivity following systemic immune challenge. *Glia.* 2016 Feb;64(2):300-16.
295. Pinkernelle J, Fansa H, Ebmeyer U, Keilhoff G. Prolonged minocycline treatment impairs motor neuronal survival and glial function in organotypic rat spinal cord cultures. *PLoS One.* 2013;8(8):e73422.
296. Yamada J, Jinno S. Alterations in neuronal survival and glial reactions after axotomy by ceftriaxone and minocycline in the mouse hypoglossal nucleus. *Neurosci Lett.* 2011 Oct 31;504(3):295-300.
297. Chew SS, Johnson CS, Green CR, Danesh-Meyer HV. Role of connexin43 in central nervous system injury. *Exp Neurol.* 2010 Oct;225(2):250-61.
298. Rovegno M, Soto PA, Saez PJ, Naus CC, Saez JC, von Bernhardt R. Connexin43 hemichannels mediate secondary cellular damage spread from the trauma zone to distal zones in astrocyte monolayers. *Glia.* 2015 Jul;63(7):1185-99.
299. Ren Q, Wang ZZ, Chu SF, Xia CY, Chen NH. Gap junction channels as potential targets for the treatment of major depressive disorder. *Psychopharmacology (Berl).* 2018 Jan;235(1):1-12.
300. Yi C, Mei X, Ezan P, Mato S, Matias I, Giaume C, et al. Astroglial connexin43 contributes to neuronal suffering in a mouse model of Alzheimer's disease. *Cell Death Differ.* 2016 Oct;23(10):1691-701.
301. Giaume C, Leybaert L, Naus CC, Saez JC. Connexin and pannexin hemichannels in brain glial cells: properties, pharmacology, and roles. *Front Pharmacol.* 2013;4:88.
302. Pekny M, Pekna M, Messing A, Steinhäuser C, Lee JM, Párpura V, et al. Astrocytes: a central element in neurological diseases. *Acta Neuropathol.* 2016 Mar;131(3):323-45.

APÊNDICE: Trabalho Publicado

The Pro-inflammatory Effects of Glucocorticoids in the Brain

Erica de Almeida Duque and Carolina Demarchi Munhoz*

Department of Pharmacology, Institute of Biomedical Science, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

OPEN ACCESS

Edited by:

Ralf Jockers,
Institut national de la santé et de la
recherche médicale (Inserm), France

Reviewed by:

Yves Combarnous,
Centre National de la Recherche
Scientifique (CNRS), France
Sylvie Babajko,
Hôpital Saint Antoine, France

***Correspondence:**

Carolina Demarchi Munhoz
cdmunhoz@usp.br

Specialty section:

This article was submitted to
Cellular Endocrinology,
a section of the journal
Frontiers in Endocrinology

Received: 15 December 2015

Accepted: 17 June 2016

Published: 28 June 2016

Citation:

Duque EA and Munhoz CD (2016)
The Pro-inflammatory Effects of
Glucocorticoids in the Brain.
Front. Endocrinol. 7:78.
doi: 10.3389/fendo.2016.00078

Glucocorticoids are a class of steroid hormones derived from cholesterol. Their actions are mediated by the glucocorticoid and mineralocorticoid receptors, members of the superfamily of nuclear receptors, which, once bound to their ligands, act as transcription factors that can directly modulate gene expression. Through protein-protein interactions with other transcription factors, they can also regulate the activity of many genes in a composite or tethering way. Rapid non-genomic signaling was also demonstrated since glucocorticoids can act through membrane receptors and activate signal transduction pathways, such as protein kinases cascades, to modulate other transcription factors and activate or repress various target genes. By all these different mechanisms, glucocorticoids regulate numerous important functions in a large variety of cells, not only in the peripheral organs but also in the central nervous system during development and adulthood. In general, glucocorticoids are considered anti-inflammatory and protective agents due to their ability to inhibit gene expression of pro-inflammatory mediators and other possible damaging molecules. Nonetheless, recent studies have uncovered situations in which these hormones can act as pro-inflammatory agents depending on the dose, chronicity of exposure, and the structure/organ analyzed. In this review, we will provide an overview of the conditions under which these phenomena occur, a discussion that will serve as a basis for exploring the mechanistic foundation of glucocorticoids pro-inflammatory gene regulation in the brain.

Keywords: glucocorticoids, glucocorticoids receptors, brain, steroid hormones, inflammation, cytokines, pro-inflammatory

INTRODUCTION

Inflammation and Glucocorticoids

Inflammation is described as a response to infection or injury. The cells of innate immunity, such as neutrophils and macrophages in the periphery (1) and microglia (2) in the CNS, express receptors called pattern recognition receptors (PRRs) (3, 4) that are able to recognize parts of conserved evolutionarily microbial molecules called pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) (5). They also can recognize endogenous molecules called alarmins or danger-associated molecular patterns (DAMPs), which are host-derived proteins released from cells following tissue injury (1, 6). It has been greatly demonstrated that chronic inflammation is associated with several pathologies, such as obesity (7), cardiovascular diseases (8), rheumatoid arthritis (9), inflammatory bowel disease (10, 11), asthma (12, 13), diabetes (14, 15), neurodegenerative diseases (16), and cancer (17). These diseases are mostly characterized by a dysregulated inflammatory response, when the normally

protective role of inflammation becomes detrimental as the response becomes excessive in magnitude or duration.

Glucocorticoids (GCs, cortisol in primates and corticosterone – CORT – in rodents) are steroid hormones that essentially regulate a variety of physiological processes, including embryonic development, metabolism of carbohydrates, lipids, and proteins, the stress response, and the resolution of inflammation (6). GCs have potent anti-inflammatory and immunosuppressive action, reflecting the fact that they are the most widely prescribed drug for the treatment of a variety of inflammatory and autoimmune diseases (18). They are mainly synthesized in the suprarenal cortex as result of the activation of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis (HPA axis).

In general, GCs are considered anti-inflammatory and protective agents, since they inhibit gene expression of pro-inflammatory mediators and other possible damaging molecules, e.g., reactive oxygen species (ROS), in peripheral organs and in the CNS. Despite the primary anti-inflammatory actions of GCs to resolve inflammatory process and restore homeostasis, it is becoming increasingly common studies, suggesting that GCs are not uniformly anti-inflammatory and in some cases may even increase certain parameters of the inflammatory response, mainly in the CNS (19), depending on the dose, chronicity of exposure, and structure/organ analyzed.

In this review, we will provide an overview of the conditions under which these phenomena occur, a discussion that will serve as a basis for exploring the mechanistic foundation of glucocorticoid potentiation of pro-inflammatory gene regulation.

Glucocorticoid Receptor

As other steroids, GCs are lipophilic molecules that easily reach the cytoplasm of target cells *via* peripheral circulation, where they are bound to carrier proteins and then diffuse promptly through cell membranes to modulate gene transcription through their two different nuclear receptors: the mineralocorticoid receptor (MR) or the glucocorticoid receptor (GR) (20, 21). The affinity of CORT for MR is 10-fold higher than for GR, consequently, MR is heavily occupied by basal CORT levels, being mainly responsible for the physiological effects of GCs, and GR is only heavily occupied during pharmacological levels of CORT or during peak secretion of this hormone, commonly observed in stressful situations (22).

The GR molecular structure consists of three functional domains: (1) the N-terminal amino domain (NTD) that contains one of the main transactivation domain, called the activation function 1 (AF1). This domain is functionally important, since it is required for transcriptional activity of steroid hormones; (2) the DNA-binding domain (DBD), which binds to the glucocorticoid responsive elements (GRE) sites in the promoter region of target genes; and (3) ligand-binding domain (LBD) that contains the binding domain to glucocorticoids as well as important sequences for interaction with coregulators, whether coactivators and/or corepressors (23).

Two human isoforms of GR have been identified, GR α and GR β , which are originated by alternative splicing of the primary transcript GR. The GR α is the predominant isoform of the receptor, and it is the one that transduces GCs signal (23). The GR β differs from GR α in the carboxy terminal sequence, where the last

50 amino acids are replaced by a sequence of 15 non-homologous amino acids, making GR β non-responsive to GCs (23, 24), with no transcription of target genes when GCs binds to GR β through a mechanism involving the formation of heterodimers GR α –GR β (23). The GR β has been described in some cells, especially inflammatory cells, such as lymphocytes and macrophages, and related with GCs resistance in diseases, such as asthma (12) and chronic lymphocytic leukemia (25). Recently, GR β was reported in liver of mice (26) and rats (27) with a role in metabolism control by insulin.

Glucocorticoid receptor isoforms are subject to various posttranslational alterations that further modulate receptor activity. After binding to GC, the conformational changes make them susceptible to modifications, i.e., phosphorylation, acetylation, ubiquitination, and sumoylation (23, 28–30), which influence DNA-binding complex force, affecting transcription and selection of genes regulated by this complex. The multiple phosphorylation events affecting GR NTD lead to changes in the spectrum of GR target genes and is thought to influence both transcriptional activity and nuclear trafficking (23, 30–32).

In conclusion, gene regulation by GCs is complex. The sequence of the DNA-binding site influences the conformation of the GC–GR, leading to different patterns of gene expression, including the pro-inflammatory ones. In addition, the recruitment of the GC–GR and their regulatory elements, as coactivators and RNA polymerase II to DNA binding, is also dependent on the existence of accessible chromatin, which appears to be cell type specific (29).

Glucocorticoid Signal Transduction

Upon reaching the target tissue, GCs bind to nuclear receptors, classical GRs, in the cytoplasm (33). GR binding promotes their release from a multiprotein complex composed by chaperones, e.g., Hsp70, Hsp90, p23, and immunophilins (FKBP51, FKBP52) (18, 30), allowing the GC–GR complex to interact with other cytosolic proteins, or in most cases, to translocate to the nucleus as a result of the exposure of a nuclear localization domain (18). Upon ligation and translocation, GR dimerizes and binds to DNA at palindromic GRE sites, activating the promoter as a transcription factor (transactivation), altering gene expression of various proteins. The GRE structure is not exclusive for GR binding, as it is also common for other nuclear receptors, such as MR, progesterone, and androgen receptors. For that reason, it is referred from some authors as hormonal response elements (HREs) rather than GRE (34).

The GC–GR complex also acts without dimerization, as a monomeric complex, and binds to DNA together with other transcription factor, in this way cooperatively enhancing gene expression (composite transactivation). In addition, the GC–GR complex can also physically interact with transcription factors without interacting with DNA itself, thereby inhibiting the transcription factor and repressing transcription. This is the predominant transrepression mechanism and is called tethering; it is the mechanism responsible to inhibit the pro-inflammatory transcription factors, NF κ B (35, 36) and activator protein 1 (AP-1) (37), and also other transcription factors, such as CREB (38),

accounting for the anti-inflammatory and immunosuppressive GCs effects.

In addition to the GR-mediated genomic mechanisms, several rapid non-genomic pathways have also been reported. According to them, GCs can have direct effects on cell membrane, interacting with membrane GR (mGR), as reported in human lymphocytes and monocytes (39), and in skeletal muscle fibers in mice (40). GCs can also interact with classical GRs targeting signaling proteins, such as kinases, and/or with classic GRs translocating into the mitochondria, one of the probable mechanisms of apoptosis induced by GC-GR complex on T cells (41–43). These pathways can result in the induction of downstream signaling cascades, changes in cytoplasmic calcium, sodium, or potassium concentrations, and increase in mitochondrial production of ROS (21, 34, 44).

The Pro-inflammatory Glucocorticoid Effects

The evidence supporting the pro-inflammatory GC effects is very robust and suggests that they occur in specific and very intricate situations. Timing, concentration, and duration of GC exposure are all critical in determining whether these hormones will be immunoactivator or immunosuppressor, but the specific situations leading to each outcome are not well documented.

Munhoz et al. (45, 46) have shown that chronic unpredictable stress (CUS), which chronically augment plasma CORT, and mid-to-high levels of CORT enhance the LPS-induced NF κ B activation as well as the expression of pro-inflammatory genes (iNOS, IL-1 β , TNF- α), while decrease the expression of classical anti-inflammatory ones (IL-1ra, IL-10, and MKP-1) in the frontal cortex and in a lesser extent in the hippocampus of rats. These pro-inflammatory GCs effects were region-dependent and GR-mediated, since they were not evident in the hypothalamus or heart of rats, and the pretreatment with the RU486 reversed them (45, 46).

Microglia are an important player in the GC endangerment to neurons. Sorrells et al. (47) have shown that the concurrent treatment with minocycline, a microglia inhibitor, but not indomethacin, a non-steroid anti-inflammatory drug, prevented GC endangerment in a model of neuronal death using kainic acid. High GC levels did not substantially affect the levels of the chemokines, CCL2, CINC-1, or baseline NF κ B activity, but they did suppress mRNA levels of CX3CL1, CX3CR1, and CD22 in the hippocampus – factors that restrain inflammatory responses – while increased by twofold the IL-1 β mRNA expression (47). In another study, using transgenic mice lacking GR expression in myeloid cells (microglia included), the same group showed that GC effects on myeloid cells have detrimental consequences for neuron survival in a kainic acid and transitory MCAO occlusion model (48). Indeed, GCs can activate microglia, putting them in a “primed” state (49–51). The primed microglia can undergo changes such as cell surface upregulation of receptors (e.g., TLRs and NLRs) (52, 53) and myeloid markers (e.g., MHC II) (54, 55), promoting a “sensitized” state without production of inflammatory or anti-inflammatory mediators, but, with further stimulus, can produce exaggerated levels of inflammatory

mediators. It has been showed increased plasma levels of TNF α and IL-1 β , and IL-1 β content in various CNS regions (pituitary, hypothalamus, hippocampus, and cerebellum) shortly after the LPS challenge (56).

Timing is an important variable to determine the outcome of GCs actions. Frank et al. (50, 57) reported that CORT administered acutely before an LPS challenge facilitated the inflammatory response to the challenge, both in the periphery and in the brain. In contrast, CORT administered after the same immune challenge resulted in suppression of the inflammatory response (50). They further demonstrated that prior *in vivo* administration of CORT potentiated the pro-inflammatory response of isolated hippocampal microglia exposed, *ex vivo*, to LPS (51), establishing a direct relationship between CORT elevation and sensitizing hippocampal microglia.

Corticosterone is also important in the sensitization of microglia in aging. Aged rats, submitted to an immune challenge, show potentiated and longer inflammatory response. Such potentiation has been associated with impairments in hippocampal synaptic plasticity and in contextual and spatial forms of memory (57–59). Interestingly, these aged rats exhibited higher corticosterone levels in the hippocampus, but not in the plasma, throughout the diurnal inactive phase only. Furthermore, the elevated diurnal hippocampal CORT was associated with an increased expression of hippocampal 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11 β -HSD1), the enzyme that catalyzes GCs inactive form, 1-dehydrocorticosterone, to the active one, CORT, and to a greater hippocampal GR activation, also only in the inactive phase of the day. Moreover, nuclear-specific expression of GR during the inactive phase was significantly higher in aged rats (59).

Although the molecular mechanism of GC pro-inflammatory actions is largely unknown, new players have been set in action. GCs upregulate the expression of the TLR2 and TLR4, both involved in the recognition of PAMPs and DAMPs and in the activation of signaling cascades that lead to the synthesis and release of inflammatory mediators (60). *In vitro* and *in vivo* studies have demonstrated that GCs can upregulate TLR2 expression by the activation of MAPK phosphatase-1 (MKP-1), which, in turn, inhibits p38 MAPK activity, a negative regulator for TLR2. The increased expression of TLR2 leads to enhanced cytokine expression, such as TNF- α , IL-1 β , and IL-8, upon challenge with an inflammatory stimulus. In addition, TNF- α and GCs cooperate to stimulate the promoter for TLR2 and potentially TLR4, increasing receptor expression (57, 61, 62) (Figures 1A,B).

The scientific literature provides growing information about the recently described new class of intracellular PRRs, the nucleotide-binding domain, leucine-rich repeat-containing (NBD-LRR, referred as NLRs) (63). Of the several NLRs recognized, NLRP1, NLRP3, AIM2, and NLRC4 are able to assemble and form a multiprotein complex known as the inflammasome. This complex regulates the activation of caspase-1 and the subsequent maturation and release of pro-inflammatory cytokines, such as IL-1 β and IL-18, in response to a wide variety of intracellular PRRs [for subject review, see Ref. (64)]. NLRP3 could be involved in GCs pro-inflammatory actions, as GCs potentiates the LPS-induced pro-inflammatory cytokine IL-1 β (45, 46). Indeed, Busillo et al. (65) demonstrated that NLRP3 is a GC-responsive gene in

macrophages, an effect GR-dependent. Glucocorticoid induction of NLRP3 sensitizes macrophages to extracellular ATP, which results in the secretion of pro-inflammatory cytokines, such as IL-1β, TNF-α, and IL-6 (65). Furthermore, GCs have been suggested to induce the expression of the purinergic receptor P2Y2R, which once activated, enhances IL-6 secretion by endothelial cells in response to ATP (66). Therefore, GC-mediated activation of TLR2, NLRP3, P2Y2R, and potentiation of TNF-α- and pro-inflammatory genes provide a potential mechanism by which these hormones exert pro-inflammatory actions (Figure 1C).

In addition, Weber and colleagues reported a new stress-induced pro-inflammatory mediator, the alarmin high-mobility group box-1 protein (HMGB-1) (67). HMGB-1 has been reported to be present in the CNS and to play a role in mediating neuro-inflammatory responses to ischemia and other injuries, such as immune disorders and neurodegenerative diseases [extensively reviewed in Ref. (68)]. Severe acute stress increases HMGB-1 protein levels in the hippocampus, specifically in the cytosol of hippocampal microglia isolated from severely acute stressed rats. NLRP3, IKKβ, and NFκB proteins levels are also increased immediately after severe acute stress. Interestingly, Box A (a HMGB-1 antagonist) pretreatment blocked the stress-induced increase in microglial IL-1β, IKKβ, and NLRP3 mRNA expression in response to a bacterial challenge (67). These results suggest that HMGB-1 participates in stress-inducing NLRP3 priming, adding

another mechanism by which GCs could have pro-inflammatory effects in the brain (67, 69).

MINERALOCORTICOIDS

Aldosterone is the steroidal hormone produced in the cortex of suprarenal gland that specifically binds to the MR. Although aldosterone is the related ligand of the MR, GCs can also bind to this receptor with equivalent affinity. The production and secretion of this hormone are majorly triggered in response to alterations in blood perfusion, perceived by cells in the juxtaglomerular complex. The main goal of this action is to maintain the blood pressure in a normal range in terms of control of water and electrolyte homeostasis (70). Mineralocorticoids can also modulate inflammation. MR expression is observed in cells of the immune system and aldosterone has been associated with pro-inflammatory immune effects, such as the release of pro-inflammatory cytokines, generating oxidative stress and inducing fibrosis (71).

Clinical studies have demonstrated that MR antagonism in cardiovascular diseases can blunt inflammatory damage, an important step in the induction of cardiac fibrosis (72). *In vitro* studies, using myeloid murine cells, have suggested an important role of mineralocorticoid in inducing changes in macrophages phenotype and, therefore, function.

In response to different inflammatory stimuli, macrophages can undergo classical M1 activation (stimulated by TLR ligands and IFN- γ) or alternative M2 activation (stimulated by IL-4/IL-13 cytokines); these states would correspond to the Th1–Th2 polarization of T cells [for review, see Ref. (73)]. In this sense, in dendritic cells from mice, it was shown that aldosterone induces the secretion of IL-6 and TGF- β , two pro-inflammatory cytokines necessary for the polarization of the adaptive immune response toward a Th17 phenotype, proning the system to autoimmunity (74). In peritoneal macrophages, aldosterone treatment promoted the activation of M1 macrophages, inducing TNF α , MCP-1, and IL12 gene expression, all those prevented by MR antagonism (75).

Regarding molecular mechanisms, it has been suggested that aldosterone, through MR, could regulate the expression of several genes. Indeed, cytokine promoters contain HREs, which can be modulated by GCs and potentially by mineralocorticoids (20). Despite it was suggested that ligand–receptor binding to simple HRE is enough to induce gene expression, many other proteins are able to modulate these interactions, adding specificity to gene transcription induced by MR. Also, this interaction could be more complex once the HRE also contains binding sites for non-receptor factors, the composite HREs (76).

In the brain, MR activation is important to maintain many functions of this tissue [for review, see Ref. (77)]. Under pathological conditions, such as cerebral stroke, MR antagonism or ablation has been associated with reduction of ischemic area, lower markers of remodeling process in cerebral vessels, and reduction of microglial/macrophages infiltration and activation, with decreased expression of cytokines and chemokines, such as IL-1 β , IL-6, TNF- α , MCP-1, and MIP-1. It was also reported that the MR activation in myeloid cells exacerbates inflammation and alters the M1/M2 inflammatory response to stroke (78). Finally, a study using microglial cells BV-2 reported that the stimulation with aldosterone resulted in NF κ B activation and the nuclear translocation of its p65 subunit, further upregulating the expression of IL-6 and TNF α , reinforcing the evidence of pro-inflammatory actions of mineralocorticoids in the brain (79).

CONCLUDING REMARKS

Together, these findings suggest that exposure to steroid hormones in special conditions can shift the (neuro)immune microenvironment toward a pro-inflammatory state, predisposing certain regions of the CNS to a stronger pro-inflammatory response, if the organism is exposed to a subsequent challenge. Given the clinical implications of the pro-inflammatory steroid hormones actions, it is important to emphasize the need for continued basic investigations to understand the unexpected capacity of these hormones to increase CNS inflammation. Future research must be directed at determining how steroid hormones act on different cell types and regions to produce such markedly different immunomodulatory outcomes.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

ED made substantial intellectual contributions to the conception, design, interpretation, drafting, and revising of the work, critically. CM made substantial contributions to conception, design, interpretation; revision critically for important intellectual content; and final approval of the version to be published.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors gratefully thank Leonardo Santana Novaes, Nilton Barreto dos Santos, Eduardo Listik, and Marília B. Malta for helpful discussions.

FUNDING

This work was supported by research grants to CM from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP: 2008/55178-0 and 2012/24727-4) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq: 479153/2009-4). ED was supported by FAPESP (2010/13932-0). ED and CM are research fellows from CNPq.

REFERENCES

- Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* (2008) 454(7203):428–35. doi:10.1038/nature07201
- Saigo K, Glass CK. Microglial cell origin and phenotypes in health and disease. *Nat Rev Immunol* (2011) 11(11):775–87. doi:10.1038/nri3086
- Palm NW, Medzhitov R. Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity. *Immunol Rev* (2009) 227(1):221–33. doi:10.1111/j.1600-065X.2008.00731.x
- Akira S. Innate immunity and adjuvants. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* (2011) 366(1579):2748–55. doi:10.1098/rstb.2011.0106
- Strowig T, Henao-Mejia J, Elinav E, Flavell R. Inflammasomes in health and disease. *Nature* (2012) 481(7381):278–86. doi:10.1038/nature10759
- Medzhitov R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell* (2010) 140(6):771–6. doi:10.1016/j.cell.2010.03.006
- Wensveen FM, Jelencic V, Valentic S, Sestan M, Wensveen TT, Theurich S, et al. NK cells link obesity-induced adipose stress to inflammation and insulin resistance. *Nat Immunol* (2015) 16(4):376–85. doi:10.1038/ni.3120
- Golia E, Limongelli G, Natale F, Fimiani F, Maddaloni V, Parigiano I, et al. Inflammation and cardiovascular disease: from pathogenesis to therapeutic target. *Curr Atheroscler Rep* (2014) 16(9):435. doi:10.1007/s11883-014-0435-z
- Muller-Ladner U, Pap T, Gay RE, Neidhart M, Gay S. Mechanisms of disease: the molecular and cellular basis of joint destruction in rheumatoid arthritis. *Nat Clin Pract Rheumatol* (2005) 1(2):102–10. doi:10.1038/ncprheum0047
- Baumgart DC, Sandborn WJ. Crohn's disease. *Lancet* (2012) 380(9853):1590–605. doi:10.1016/S0140-6736(12)60026-9
- Pedersen J, LaCasse EC, Seidelin JB, Coskun M, Nielsen OH. Inhibitors of apoptosis (IAPs) regulate intestinal immunity and inflammatory bowel disease (IBD) inflammation. *Trends Mol Med* (2014) 20(11):652–65. doi:10.1016/j.molmed.2014.09.006
- Sousa AR, Lane SJ, Cidlowski JA, Staynov DZ, Lee TH. Glucocorticoid resistance in asthma is associated with elevated in vivo expression of the glucocorticoid receptor beta-isoform. *J Allergy Clin Immunol* (2000) 105(5):943–50. doi:10.1067/mai.2000.106486
- Wenzel S. Severe asthma: from characteristics to phenotypes to endotypes. *Clin Exp Allergy* (2012) 42(5):650–8. doi:10.1111/j.1365-2222.2011.03929.x
- Donath MY, Shoelson SE. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nat Rev Immunol* (2011) 11(2):98–107. doi:10.1038/nri2925
- Esser N, Paquot N, Scheen AJ. Anti-inflammatory agents to treat or prevent type 2 diabetes, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Expert Opin Investig Drugs* (2015) 24(3):283–307. doi:10.1517/13543784.2015.974804

16. Glass CK, Saijo K, Winner B, Marchetto MC, Gage FH. Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell* (2010) 140(6):918–34. doi:10.1016/j.cell.2010.02.016
17. Colotta F, Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis* (2009) 30(7):1073–81. doi:10.1093/carcin/bgp127
18. Schweingruber N, Reichardt SD, Luhder F, Reichardt HM. Mechanisms of glucocorticoids in the control of neuroinflammation. *J Neuroendocrinol* (2012) 24(1):174–82. doi:10.1111/j.1365-2826.2011.02161.x
19. Sorrells SF, Caso JR, Munhoz CD, Sapolsky RM. The stressed CNS: when glucocorticoids aggravate inflammation. *Neuron* (2009) 64(1):33–9. doi:10.1016/j.neuron.2009.09.032
20. Beato M, Klug J. Steroid hormone receptors: an update. *Hum Reprod Update* (2000) 6(3):225–36. doi:10.1093/humupd/6.3.225
21. Sakamoto H, Takahashi H, Matsuda K, Nishi M, Takanami K, Ogoshi M, et al. Rapid signaling of steroid hormones in the vertebrate nervous system. *Front Biosci (Landmark Ed)* (2012) 17:996–1019. doi:10.2741/3970
22. McEwen BS, Biron CA, Brunson KW, Bulloch K, Chambers WH, Dhabhar FS, et al. The role of adrenocorticoids as modulators of immune function in health and disease: neural, endocrine and immune interactions. *Brain Res Brain Res Rev* (1997) 23(1–2):79–133. doi:10.1016/S0165-0173(96)00012-4
23. Oakley RH, Cidlowski JA. Cellular processing of the glucocorticoid receptor gene and protein: new mechanisms for generating tissue-specific actions of glucocorticoids. *J Biol Chem* (2011) 286(5):3177–84. doi:10.1074/jbc.R110.179325
24. Ligr M, Li Y, Logan SK, Taneja S, Melamed J, Lepor H, et al. Mifepristone inhibits GRβ coupled prostate cancer cell proliferation. *J Urol* (2012) 188(3):981–8. doi:10.1016/j.juro.2012.04.102
25. Shahidi H, Vottero A, Stratakis CA, Taymans SE, Karl M, Longui CA, et al. Imbalanced expression of the glucocorticoid receptor isoforms in cultured lymphocytes from a patient with systemic glucocorticoid resistance and chronic lymphocytic leukemia. *Biochem Biophys Res Commun* (1999) 254(3):559–65. doi:10.1006/bbrc.1998.9980
26. Hinds TD Jr, Ramakrishnan S, Cash HA, Stechschulte LA, Heinrich G, Najjar SM, et al. Discovery of glucocorticoid receptor-beta in mice with a role in metabolism. *Mol Endocrinol* (2010) 24(9):1715–27. doi:10.1210/me.2009-0411
27. DuBois DC, Sukumaran S, Jusko WJ, Almon RR. Evidence for a glucocorticoid receptor beta splice variant in the rat and its physiological regulation in liver. *Steroids* (2013) 78(2):312–20. doi:10.1016/j.steroids.2012.11.014
28. Meising SH, Pufall MA, So AY, Bates DL, Chen L, Yamamoto KR. DNA binding site sequence directs glucocorticoid receptor structure and activity. *Science* (2009) 324(5925):407–10. doi:10.1126/science.1164265
29. John S, Sabo PJ, Thurman RE, Sung MH, Biddie SC, Johnson TA, et al. Chromatin accessibility pre-determines glucocorticoid receptor binding patterns. *Nat Genet* (2011) 43(3):264–8. doi:10.1038/ng.759
30. Oakley RH, Cidlowski JA. The biology of the glucocorticoid receptor: new signaling mechanisms in health and disease. *J Allergy Clin Immunol* (2013) 132(5):1033–44. doi:10.1016/j.jaci.2013.09.007
31. Ratman D, Vanden Berghe W, Dejager L, Libert C, Tavernier J, Beck IM, et al. How glucocorticoid receptors modulate the activity of other transcription factors: a scope beyond tethering. *Mol Cell Endocrinol* (2013) 380(1–2):41–54. doi:10.1016/j.mce.2012.12.014
32. Carruthers CW, Suh JH, Gustafsson JA, Webb P. Phosphorylation of glucocorticoid receptor tau1c transactivation domain enhances binding to CREB binding protein (CBP) TAZ2. *Biochem Biophys Res Commun* (2015) 457(1):119–23. doi:10.1016/j.bbrc.2014.12.021
33. Li MD, Yang X. A retrospective on nuclear receptor regulation of inflammation: lessons from GR and PPARs. *PPAR Res* (2011) 2011:742785. doi:10.1155/2011/742785
34. Falkenstein E, Tillmann HC, Christ M, Feuring M, Wehling M. Multiple actions of steroid hormones – a focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacol Rev* (2000) 52(4):513–56.
35. De Bosscher K, Vanden Berghe W, Haegeman G. Cross-talk between nuclear receptors and nuclear factor kappaB. *Oncogene* (2006) 25(51):6868–86. doi:10.1038/sj.onc.1209935
36. Beck IM, Vanden Berghe W, Vermeulen L, Yamamoto KR, Haegeman G, De Bosscher K. Crosstalk in inflammation: the interplay of glucocorticoid receptor-based mechanisms and kinases and phosphatases. *Endocr Rev* (2009) 30(7):830–82. doi:10.1210/er.2009-0013
37. Karin M, Chang L. AP-1 – glucocorticoid receptor crosstalk taken to a higher level. *J Endocrinol* (2001) 169(3):447–51. doi:10.1677/joe.0.1690447
38. Whitehead D, Carter DA. cAMP response element-binding protein phosphorylation and DNA binding activity are increased in the anterior pituitary gland following glucocorticoid depletion. *J Mol Endocrinol* (1997) 19(3):291–7. doi:10.1677/jme.0.0190291
39. Bartholome B, Spies CM, Gaber T, Schuchmann S, Berki T, Kunkel D, et al. Membrane glucocorticoid receptors (mGCR) are expressed in normal human peripheral blood mononuclear cells and up-regulated after in vitro stimulation and in patients with rheumatoid arthritis. *FASEB J* (2004) 18(1):70–80. doi:10.1096/fj.03-0328com
40. Boncompagni S, Artherton L, Akujuru E, Pearson T, Steverding D, Protasi F, et al. Membrane glucocorticoid receptors are localised in the extracellular matrix and signal through the MAPK pathway in mammalian skeletal muscle fibres. *J Physiol* (2015) 593(12):2679–92. doi:10.1113/jp270502
41. Rhen T, Cidlowski JA. Antiinflammatory action of glucocorticoids – new mechanisms for old drugs. *N Engl J Med* (2005) 353(16):1711–23. doi:10.1056/NEJMra050541
42. Sionov RV, Cohen O, Kfir S, Zilberman Y, Yefenof E. Role of mitochondrial glucocorticoid receptor in glucocorticoid-induced apoptosis. *J Exp Med* (2006) 203(1):189–201. doi:10.1084/jem.20050433
43. Sundahl N, Bridelance J, Libert C, De Bosscher K, Beck IM. Selective glucocorticoid receptor modulation: new directions with non-steroidal scaffolds. *Pharmacol Ther* (2015) 152:28–41. doi:10.1016/j.pharmthera.2015.05.001
44. Smith LK, Cidlowski JA. Glucocorticoid-induced apoptosis of healthy and malignant lymphocytes. *Prog Brain Res* (2010) 182:1–30. doi:10.1016/S0079-6123(10)82001-1
45. Munhoz CD, Lepsch LB, Kawamoto EM, Malta MB, Lima Lde S, Avellar MC, et al. Chronic unpredictable stress exacerbates lipopolysaccharide-induced activation of nuclear factor-kappaB in the frontal cortex and hippocampus via glucocorticoid secretion. *J Neurosci* (2006) 26(14):3813–20. doi:10.1523/JNEUROSCI.4398-05.2006
46. Munhoz CD, Sorrells SF, Caso JR, Scavone C, Sapolsky RM. Glucocorticoids exacerbate lipopolysaccharide-induced signaling in the frontal cortex and hippocampus in a dose-dependent manner. *J Neurosci* (2010) 30(41):13690–8. doi:10.1523/JNEUROSCI.0303-09.2010
47. Sorrells SF, Munhoz CD, Manley NC, Yen S, Sapolsky RM. Glucocorticoids increase excitotoxic injury and inflammation in the hippocampus of adult male rats. *Neuroendocrinology* (2014) 100(2–3):129–40. doi:10.1159/000367849
48. Sorrells SF, Caso JR, Munhoz CD, Hu CK, Tran KV, Miguel ZD, et al. Glucocorticoid signaling in myeloid cells worsens acute CNS injury and inflammation. *J Neurosci* (2013) 33(18):7877–89. doi:10.1523/JNEUROSCI.4705-12.2013
49. Frank MG, Baratta MV, Sprunger DB, Watkins LR, Maier SE. Microglia serve as a neuroimmune substrate for stress-induced potentiation of CNS pro-inflammatory cytokine responses. *Brain Behav Immun* (2007) 21(1):47–59. doi:10.1016/j.bbi.2006.03.005
50. Frank MG, Miguel ZD, Watkins LR, Maier SE. Prior exposure to glucocorticoids sensitizes the neuroinflammatory and peripheral inflammatory responses to *E. coli* lipopolysaccharide. *Brain Behav Immun* (2010) 24(1):19–30. doi:10.1016/j.bbi.2009.07.008
51. Frank MG, Thompson BM, Watkins LR, Maier SE. Glucocorticoids mediate stress-induced priming of microglial pro-inflammatory responses. *Brain Behav Immun* (2012) 26(2):337–45. doi:10.1016/j.bbi.2011.10.005
52. Lehnardt S, Massillon I, Follett P, Jensen FE, Ratan R, Rosenberg PA, et al. Activation of innate immunity in the CNS triggers neurodegeneration through a toll-like receptor 4-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2003) 100(14):8514–9. doi:10.1073/pnas.1432609100
53. Lehnardt S. Innate immunity and neuroinflammation in the CNS: the role of microglia in toll-like receptor-mediated neuronal injury. *Glia* (2010) 58(3):253–63. doi:10.1002/glia.20928
54. Juedes AE, Ruddle NH. Resident and infiltrating central nervous system APCs regulate the emergence and resolution of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* (2001) 166(8):5168–75. doi:10.4049/jimmunol.166.8.5168

55. Olson JK, Miller SD. Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs. *J Immunol* (2004) 173(6):3916–24. doi:10.4049/jimmunol.173.6.3916
56. Johnson JD, O'Connor KA, Deak T, Stark M, Watkins LR, Maier SF. Prior stressor exposure sensitizes LPS-induced cytokine production. *Brain Behav Immun* (2002) 16(4):461–76. doi:10.1006/brbi.2001.0638
57. Frank MG, Barrientos RM, Watkins LR, Maier SF. Aging sensitizes rapidly isolated hippocampal microglia to LPS ex vivo. *J Neuroimmunol* (2010) 226(1–2):181–4. doi:10.1016/j.jneuroim.2010.05.022
58. Chapman TR, Barrientos RM, Ahrendsen JT, Maier SF, Patterson SL. Synaptic correlates of increased cognitive vulnerability with aging: peripheral immune challenge and aging interact to disrupt theta-burst late-phase long-term potentiation in hippocampal area CA1. *J Neurosci* (2010) 30(22):7598–603. doi:10.1523/JNEUROSCI.5172-09.2010
59. Barrientos RM, Thompson VM, Kitt MM, Amat J, Hale MW, Frank MG, et al. Greater glucocorticoid receptor activation in hippocampus of aged rats sensitizes microglia. *Neurobiol Aging* (2015) 36(3):1483–95. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2014.12.003
60. Weber MD, Frank MG, Sobesky JL, Watkins LR, Maier SF. Blocking toll-like receptor 2 and 4 signaling during a stressor prevents stress-induced priming of neuroinflammatory responses to a subsequent immune challenge. *Brain Behav Immun* (2013) 32:112–21. doi:10.1016/j.bbi.2013.03.004
61. Hermoso MA, Matsuguchi T, Smoak K, Cidlowski JA. Glucocorticoids and tumor necrosis factor alpha cooperatively regulate toll-like receptor 2 gene expression. *Mol Cell Biol* (2004) 24(11):4743–56. doi:10.1128/MCB.24.11.4743-4756.2004
62. Wohleb ES, Hanke ML, Corona AW, Powell ND, Stiner LM, Bailey MT, et al. beta-Adrenergic receptor antagonism prevents anxiety-like behavior and microglial reactivity induced by repeated social defeat. *J Neurosci* (2011) 31(17):6277–88. doi:10.1523/JNEUROSCI.0450-11.2011
63. Meylan E, Tschopp J, Karin M. Intracellular pattern recognition receptors in the host response. *Nature* (2006) 442(7098):39–44. doi:10.1038/nature04946
64. Man SM, Kanneganti TD. Regulation of inflammasome activation. *Immunol Rev* (2015) 265(1):6–21. doi:10.1111/imr.12296
65. Busillo JM, Azzam KM, Cidlowski JA. Glucocorticoids sensitize the innate immune system through regulation of the NLRP3 inflammasome. *J Biol Chem* (2011) 286(44):38703–13. doi:10.1074/jbc.M111.275370
66. Ding Y, Gao ZG, Jacobson KA, Suffredini AF. Dexamethasone enhances ATP-induced inflammatory responses in endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther* (2010) 335(3):693–702. doi:10.1124/jpet.110.171975
67. Weber MD, Frank MG, Tracey KJ, Watkins LR, Maier SF. Stress induces the danger-associated molecular pattern HMGB-1 in the hippocampus of male Sprague Dawley rats: a priming stimulus of microglia and the NLRP3 inflammasome. *J Neurosci* (2015) 35(1):316–24. doi:10.1523/JNEUROSCI.3561-14.2015
68. Kang R, Chen R, Zhang Q, Hou W, Wu S, Cao L, et al. HMGB1 in health and disease. *Mol Aspects Med* (2014) 40:1–116. doi:10.1016/j.mam.2014.05.001
69. van Zoelen MA, Yang H, Florquin S, Meijers JC, Akira S, Arnold B, et al. Role of toll-like receptors 2 and 4, and the receptor for advanced glycation end products in high-mobility group box 1-induced inflammation in vivo. *Shock* (2009) 31(3):280–4. doi:10.1097/SHK.0b013e318186262d
70. Briet M, Schiffrin EL. Aldosterone: effects on the kidney and cardiovascular system. *Nat Rev Nephrol* (2010) 6(5):261–73. doi:10.1038/nrneph.2010.30
71. Azibani F, Fazal L, Chatziantoniou C, Samuel JL, Delcayre C. Aldosterone mediates cardiac fibrosis in the setting of hypertension. *Curr Hypertens Rep* (2013) 15(4):395–400. doi:10.1007/s11906-013-0354-3
72. Rossignol P, Menard J, Fay R, Gustafsson F, Pitt B, Zannad F. Eplerenone survival benefits in heart failure patients post-myocardial infarction are independent from its diuretic and potassium-sparing effects. Insights from an EPHEUS (eplerenone post-acute myocardial infarction heart failure efficacy and survival study) substudy. *J Am Coll Cardiol* (2011) 58(19):1958–66. doi:10.1016/j.jacc.2011.04.049
73. Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest* (2012) 122(3):787–95. doi:10.1172/JCI59643
74. Herrada AA, Contreras FJ, Marini NP, Amador CA, Gonzalez PA, Cortes CM, et al. Aldosterone promotes autoimmune damage by enhancing Th17-mediated immunity. *J Immunol* (2010) 184(1):191–202. doi:10.4049/jimmunol.0802886/jimmunol.0802886
75. Usher MG, Duan SZ, Ivashchenko CY, Frieler RA, Berger S, Schutz G, et al. Myeloid mineralocorticoid receptor controls macrophage polarization and cardiovascular hypertrophy and remodeling in mice. *J Clin Invest* (2010) 120(9):3350–64. doi:10.1172/JCI41080
76. Cruz-Topete D, Cidlowski JA. One hormone, two actions: anti- and pro-inflammatory effects of glucocorticoids. *Neuroimmunomodulation* (2015) 22(1–2):20–32. doi:10.1159/000362724
77. Reul JM, Gesing A, Droste S, Stec IS, Weber A, Bachmann C, et al. The brain mineralocorticoid receptor: greedy for ligand, mysterious in function. *Eur J Pharmacol* (2000) 405(1–3):235–49. doi:10.1016/S0014-2999(00)00677-4
78. Frieler RA, Meng H, Duan SZ, Berger S, Schutz G, He Y, et al. Myeloid-specific deletion of the mineralocorticoid receptor reduces infarct volume and alters inflammation during cerebral ischemia. *Stroke* (2011) 42(1):179–85. doi:10.1161/STROKEAHA.110.598441
79. Chantong B, Kratschmar DV, Nashev LG, Balazs Z, Odermatt A. Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors differentially regulate NF-kappaB activity and pro-inflammatory cytokine production in murine BV-2 microglial cells. *J Neuroinflammation* (2012) 9:260. doi:10.1186/1742-2094-9-260

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2016 Duque and Munhoz. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.